

**Präparation spezieller Biokatalysatoren für die chemisch-
technische Nutzung zur Bereitstellung von Aromaten und chiralen
 α -Hydroxyketonen**

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Nora Christiane Bieler
aus Düsseldorf

von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Peter Hildebrandt (TU Berlin)
Berichterin/Gutachterin:	Prof. Dr. Marion Ansorge-Schumacher (TU Berlin)
Berichterin/Gutachterin:	Prof. Dr. Antje Spieß (RWTH Aachen)

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10. Februar 2011

Berlin 2011

D 83

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Rahmen meiner Zeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der TU Berlin am Lehrstuhl für Technische Chemie in der AG Enzymtechnologie.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Antje Spieß von der RWTH Aachen für Ihr Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Koreferats.

Bei Dr. Lasse Greiner möchte ich mich ganz herzlich für die ausgezeichnete und sehr fruchtbare Zusammenarbeit bedanken.

Ganz besonders großer Dank gilt meinen drei Diplomandinnen Neha Garg, Alida Nooke und Lisa Schumacher, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch bei Anna Clemens, die ich während ihres Forschungspraktikums betreuen durfte, möchte ich mich aufs aller Herzlichste bedanken.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Astrid Müller-Klauke für ihre Unterstützung bei IR- und NMR-Messungen. Herrn Jörg Nissen vom ZELMI Berlin danke ich für die Durchführung der REM-Messungen.

Zudem danke ich meinen lieben Kollegen für die sehr nette Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank für zahlreiche fachliche Diskussionen und vor allem für seelische Unterstützung gilt Andy Maraite, Valantina Yazbik, Juliane Ratzka und Anja Wilming.

Meinen Eltern schulde ich tiefen Dank für die fortwährende moralische und finanzielle Unterstützung während meiner gesamten naturwissenschaftlichen Ausbildung. Auch meinen Freunden und meinem Freund gegenüber bin ich zu großem Dank verpflichtet. Es tut gut zu wissen, dass mich viele Menschen auch in schweren Zeiten unterstützen und an meiner Seite bleiben.

Inhaltsverzeichnis

TEIL 1 BEREITSTELLUNG DER BIOKATALYSATOREN LAC, LiP UND MnP FÜR DEREN CHEMISCH-TECHNISCHE NUTZUNG	1
1. EINLEITUNG	1
1.1 Lignin als nachwachsender Rohstoff	1
1.2 Ligninstruktur	2
1.3 Ligninabbau	4
1.3.1 Chemischer Abbau	5
1.3.2 Enzymatischer Abbau	7
1.4 Expressionssysteme Lignin abbauender Enzyme	11
1.5 Zielsetzung	16
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	18
2.1.2 Stämme und Plasmide	19
2.1.3 Primer	20
2.2 Methoden	22
2.2.1 Langzeitlagerung der Pilze <i>Cyathus bulleri</i> und <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	22
2.2.2 Kultivierung der Pilze unter ligninolytischen Bedingungen	23
2.2.3 RNA Isolation	24
2.2.4 Amplifikation der Zielgenesequenzen	24
2.2.5 Klonierung der Zielgene in den Replikationsvektor pCR4-TOPO	28
2.2.6 Klonierung der Zielgene in die entsprechenden Hefe-Shuttle-Vektoren und deren Trans- formation in <i>E. coli</i> bzw. die entsprechenden Hefeexpressionsstämme	28
2.2.7 Expression der Zielenzyme	31
2.2.8 Aktivitätstests	34
2.2.9 Laccasecharakterisierung	36
2.2.10 Sonstige Methoden	37
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	39
3.1 Expression der Laccase aus <i>Cyathus bulleri</i> in <i>Pichia pastoris</i>	39
3.1.1 Ermittlung der Laccasesequenz	40
3.1.2 Klonierung des Laccasegens	41
3.1.3 Expression der Laccase in <i>Pichia pastoris</i>	42
3.1.4 Charakterisierung der rekombinanten Laccase	44
3.1.5 Zusammenfassung	59
3.2 Expression der Ligninperoxidase aus <i>Phanerochaete chrysosporium</i> in <i>Pichia methanolica</i> und <i>Pichia pastoris</i>	61
3.2.1 Klonierung und Expression der Ligninperoxidase in <i>Pichia methanolica</i>	61
3.2.2 Klonierung und Expression der Ligninperoxidase in <i>Pichia pastoris</i>	65
3.2.3 Zusammenfassung	68

3.3	Expression der Manganperoxidase aus <i>Phanerochaete chrysosporium</i> in <i>Kluyveromyces lactis</i>	71
3.3.1	Klonierung des Manganperoxidasegens in <i>K. lactis</i>	72
3.3.2	Expression der Manganperoxidase in <i>K. lactis</i>	73
3.3.3	Zusammenfassung	75
3.4	Ausblick	77
4.	ANHANG	79
5.	LITERATURVERZEICHNIS	84
TEIL 2 PRÄPARATION DER BAL FÜR DEREN CHEMISCH-TECHNISCHE NUTZUNG		96
1.	EINLEITUNG	96
1.1	Bedeutung enantiomerenreiner α -Hydroxyketone	96
1.2	Synthese chiraler α -Hydroxyketone	97
1.2.1	Chemische Synthese	97
1.2.2	Biokatalytische Synthese	100
1.3	Reaktionssysteme für den Einsatz organischer Lösungsmittel	104
1.3.1	Einphasensystem	105
1.3.2	Zweiphasensystem	106
1.3.3	Gelstabilisiertes Zweiphasensystem	107
1.4	Zielsetzung	108
2.	MATERIAL UND METHODEN	110
2.1	Materialien	110
2.1.1	Chemikalien	110
2.1.2	Katalysatoren	111
2.1.3	Geräte	113
2.2	Methoden	113
2.2.1	Herstellung der PVA/PEG-Immobilisate	113
2.2.2	Analyse der PVA/PEG-Immobilisate	114
2.2.3	BAL-Aktivitätstests	116
2.2.4	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten	117
2.2.5	Reaktionsansätze der (<i>R</i>)-2,2'-Furoinsynthese im kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor	118
2.2.6	Berechnung der Reaktionsparameter im kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor	119
2.2.7	Synthese von 4,4'-Dibrombenzoin für die Suzuki-Kupplung	120
2.2.8	Reaktionsansätze der Suzuki-Kupplung	120
2.2.9	Charakterisierung der BAL-katalysierten Carboligation für die Eintopfsynthese	121
2.2.10	Einfluss der Phenylboronsäure auf die BAL-Aktivität	122
2.2.11	Reaktionsansätze der Eintopfsynthese von (<i>R</i>)-4,4'-Biphenylbenzoin	123
2.2.12	Analytik	123
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	127
3.1	Automatisierte Produktion von PVA/PEG-Immobilisaten im Labormaßstab	127

3.1.1	Aufbau der Apparatur und Produktion der PVA/PEG-Immobilisate	129
3.1.2	Größe und Form der PVA/PEG-Immobilisate	130
3.1.3	Gelmorphologie	133
3.1.4	Diffusionsverhalten des Additivs PEG 1000	134
3.1.5	Zusammenfassung	136
3.2	Optimierung der BAL-katalysierten (<i>R</i>)-2,2'-Furoinsynthese	137
3.2.1	Lösungsmittelwechsel	138
3.2.2	BAL-Variante	146
3.2.3	Zusammenfassung	150
3.3	Chemoenzymatische Eintopfsynthese von (<i>R</i>)-4,4'-Biphenylbenzoin durch Kombination Pd-katalysierter Kreuzkupplung und BAL-katalysierter Carboligation	152
3.3.1	Suzuki-Kupplung	152
3.3.2	Charakterisierung der BAL-katalysierten Carboligation	154
3.3.3	Einfluss der Phenylboronsäure auf die BAL-Aktivität	156
3.3.4	Kombination der Pd-katalysierten Suzuki-Kupplung und der BAL-katalysierten Carboligation	158
3.3.5	Zusammenfassung	159
3.4	Ausblick	162
4.	LITERATURVERZEICHNIS	164

Abbildungsverzeichnis

Teil 1 Bereitstellung der Biokatalysatoren LAC, LiP und MnP für deren chemisch-technische Nutzung

Abbildung 1.1. Monomere Phenylpropanoidstruktureinheiten des Lignins.	3
Abbildung 1.2. Strukturmodell von Weichholzlignin aus Fichten.	4
Abbildung 1.3. Schema des Katalysezyklus der Ligninperoxidase (LiP).	9
Abbildung 1.4. Schema des Katalysezyklus der Manganperoxidase (MnP).	10
Abbildung 1.5. Schema des Katalysezyklus der Laccase.	11
Abbildung 3.1. Verlauf der volumetrischen Laccaseaktivität, der optischen Dichte (OD) und der Gesamtproteinkonzentration im Medium während der heterologen Expression der Laccase aus <i>Cyathus bulleri</i> in <i>P. pastoris</i> .	43
Abbildung 3.2. SDS-Gelelektrophorese der über Gelfiltration partiell aufgereinigten rekombinanten Laccas	45
Abbildung 3.3. pH-Optimumskurve der rekombinant in <i>P. pastoris</i> exprimierten Laccase aus <i>C. bulleri</i> .	47
Abbildung 3.4. Relative Aktivität der rekombinanten Laccase in Abhängigkeit von der Ionenstärke der NaCl-Lösung.	53
Abbildung 3.5. Relative Restaktivität der rekombinant in <i>P. pastoris</i> exprimierten Laccase aus <i>C. bulleri</i> in Abhängigkeit von der Zeit bei Inkubation in reinem Wasser (Rauten), 50% (v/v) Wasser/DMSO (Quadrate), 50% (v/v) Wasser/Ethanol (Dreiecke), 50% (v/v) Wasser/Aceton (Kreise) bzw. 50% (v/v) Wasser/THF (Balken) bei 4 °C.	56
Abbildung 3.6. Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus der Colony-PCR mit ausgewählten <i>Pichia pastoris</i> Klonen.	67
Abbildung 3.7. Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus der Colony-PCR mit ausgewählten <i>K. lactis</i> Klonen.	73
Abbildung 3.8. SDS-Gel Analyse der Zellaufschlüsse von <i>K. lactis</i> Klonen und Negativkontrollen und von den jeweiligen Kulturüberständen nach Kultivierung unter Expressionsbedingungen.	74
Abbildung 4.1. Identifizierte Nukleotidsequenz (GenBank Database accession number EU195884) der Laccase aus <i>Cyathus bulleri</i> .	79
Abbildung 4.2. Vektorkarte der <i>Pichia pastoris</i> Hefeexpressionsvektoren pPICZA, B und C und pPICZaA, B und C (Invitrogen).	80
Abbildung 4.3. Vektorkarte des Hefeexpressionsvektors pMET α A, B und C (Invitrogen).	80
Abbildung 4.4. Nukleotidsequenz des LipH8-Gens kloniert in den pMET α A Hefeexpressionsvektor.	81
Abbildung 4.5. Nukleotidsequenz des LipH8-Gens kloniert in den pPICZaA Hefeexpressionsvektor.	81
Abbildung 4.6. Vektorkarte des pKLAC1 Hefe-Shuttle-Vektors (NewEngland BioLabs).	82
Abbildung 4.7. Sequenzierung des pKLAC1/MnP Plasmids vom Startcodon des α -Mating Sekretionssignals bis zum natürlichen Stoppcodon des Gens.	83

Teil 2 Präparation der BAL für deren chemisch-technische Nutzung

Abbildung 1.1. Schematischer Überblick über chemische Synthesemöglichkeiten von α -Hydroxyketonen.	97
Abbildung 1.2. Benzaldehydlyase (BAL)-katalysierte Spaltung und Bildung von (<i>R</i>)-Benzoin.	104
Abbildung 2.1. Reaktionsschema des gekoppelten Aktivitätstest der BAL.	116
Abbildung 3.1. Aufbau der Apparatur zur automatisierten Produktion von PVA/PEG-Immobilisaten.	130
Abbildung 3.2. Größenverteilung der automatisch produzierten PVA/PEG-Immobilisate in Abhängigkeit von der Öffnungszeit der Düse.	131
Abbildung 3.3. REM-Aufnahmen der automatisch produzierten PVA/PEG-Kugeln.	133
Abbildung 3.4. IR-Spektrum von reinem Wasser (blau) und der wässrigen Phase nach 2-stündiger Inkubation von PVA/PEG-Immobilisaten darin (pink).	135
Abbildung 3.5. Reaktionsschema der BAL-katalysierten Carboligation von 2-Furaldehyd zu (<i>R</i>)-2,2'-Furoin.	137

Abbildung 3.6. Kontinuierlich betriebener Wirbelschichtreaktor mit PVA/PEG-BAL-Immobilisaten.	141
Abbildung 3.7. Prozentuale Umsätze der BAL-katalysierten (<i>R</i>)-2,2'-Furoinsynthese im gelstabilisierten Zweiphasensystem mit <i>n</i> -Hexan, MTBE, MIBK und 2-Methyl-THF als Lösungsmittelphase in Abhängigkeit von der Zeit.	142
Abbildung 3.8. Prozentuale Umsätze der (<i>R</i>)-2,2'-Furoinsynthese im gelstabilisierten Zweiphasensystem mit MTBE als Lösungsmittelphase und der nativen BAL (Rauten) bzw. der BAL-Variante (V175N, I176D, I177T) (Quadrate) als Katalysator in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer.	148
Abbildung 3.9. Reaktionsschema der chemoenzymatischen Eintopfsynthese von (<i>R</i>)-4,4'-Biphenylbenzoin durch Kombination der Palladium-katalysierten Suzuki-Kupplung und der anschließenden BAL-katalysierten Carboligation.	152
Abbildung 3.10. Strukturformel des Bis-(triphenylphosphin)-palladiumdichloridkatalysators.	153
Abbildung 3.11. Mechanismus der Disproportionierung arylischer Aldehyde bei hoher Temperatur und in Gegenwart starker Basen nach Cannizzaro [1853].	154
Abbildung 3.12. Reaktionsschema der chemoenzymatischen Eintopfsynthese von (<i>R</i>)-4,4'-Biphenylbenzoin mit der BAL-katalysierten Carboligation im ersten Schritt und nachfolgender Pd-katalysierter Suzuki-Kupplung.	156
Abbildung 3.13. Relative Aktivität der BAL in Abhängigkeit verschiedener Phenylboronsäurekonzentrationen (19,0 mmol L ⁻¹ ; 37,0 mmol L ⁻¹ ; 75,0 mmol L ⁻¹ und 150 mmol L ⁻¹).	157

Tabellenverzeichnis

Teil 1 Bereitstellung der Biokatalysatoren LAC, LiP und MnP für deren chemisch-technische Nutzung

Tabelle 2.1. Bezeichnung und Nukleotidsequenzen aller Primer, die bei der Laccaseklonierung eingesetzt wurden.	20
Tabelle 2.2. Bezeichnung und Nukleotidsequenzen aller Primer, die bei der LiP-Klonierung eingesetzt wurden.	21
Tabelle 2.3. Bezeichnung und Nukleotidsequenzen aller Primer, die bei der MnP-Klonierung eingesetzt wurden.	21
Tabelle 2.4. Temperaturprogramm der Touchdown PCR zur Identifizierung der 5'- und 3'-Enden des Laccasegens aus <i>Cyathus bulleri</i> .	26
Tabelle 2.5. Temperaturprogramm der PCR zur Amplifikation des Laccasegens aus <i>C. bulleri</i> .	27
Tabelle 2.6. Temperaturprogramm der Amplifikation des LiP- und des MnP-Gens aus <i>P. chrysosporium</i> .	28
Tabelle 2.7. Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-Page Gelelektrophorese.	38
Tabelle 3.1. Halbwertszeiten der in <i>P. pastoris</i> rekombinant produzierten Laccase aus <i>C. bulleri</i> .	49
Tabelle 3.2. Vergleich der Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der in <i>P. pastoris</i> rekombinant exprimierten und der nativen Laccase aus <i>C. bulleri</i> bei Temperaturen zwischen 25 und 80 °C.	51
Tabelle 3.3. Halbwertszeiten der rekombinanten Laccase bei Inkubation in NaCl-Lösungen verschiedener Ionenstärke bei 4 °C.	54
Tabelle 3.4. Halbwertszeiten der rekombinanten Laccase bei Inkubation in reinem Wasser, 50% (v/v) Wasser/DMSO, 50% (v/v) Wasser/Aceton, 50% (v/v) Wasser/Ethanol Gemischen bei 4 °C.	58

Teil 2 Präparation der BAL für die chemisch-technische Nutzung

Tabelle 2.1. Parameter der GC-Benzoin-Analyse.	124
Tabelle 2.2. Parameter der HPLC-Analyse zur Bestimmung des Umsatzes der 2,2'-Furoinsynthese.	124
Tabelle 2.3. Parameter der HPLC-Analyse zur Bestimmung des Enantiomerenüberschuss der 2,2'-Furoinsynthese.	125
Tabelle 2.4. Parameter der HPLC-Analyse zur Bestimmung der Ausbeuten bei der Eintopfsynthese von 4,4'-Biphenylbenzoin.	125
Tabelle 2.5. Parameter der HPLC-Analytik zur Bestimmung des <i>ees</i> der Eintopfsynthese von (<i>R</i>)-4,4'-Biphenylbenzoin.	126
Tabelle 3.1. Verteilungskoeffizienten P des Substrats 2-Furaldehyd in wässrig/organischen Zweiphasensystemen mit <i>n</i> -Hexan, MTBE bzw. MIBK als Lösungsmittelphase.	139
Tabelle 3.2. Verteilungskoeffizienten P des Produktes 2,2'-Furoin in wässrig/organischen Zweiphasensystemen mit <i>n</i> -Hexan, MTBE bzw. MIBK als Lösungsmittelphase.	140
Tabelle 3.3. Halbwertszeiten der BAL beim Einsatz im gelstabilisierten Zweiphasensystem mit <i>n</i> -Hexan, MTBE, MIBK und 2-Methyl-THF als Lösungsmittel im kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor.	145

Abkürzungsverzeichnis

AAO	Aryl-Alkoholoxidase
ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)
ADH	Alkoholdehydrogenase
Amp	Ampicillin
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BAL	Benzaldehydlyase
BFD	Benzoylformiatdecarboxylase
BMDY	Buffered Dextrose-complex Medium
BMGY	Buffered Glycerol-complex Medium
BMMY	Buffered Methanol-complex Medium
bp	basepair
CAI	Codon Adaptation Index
<i>C. bulleri</i>	<i>Cyathus bulleri</i>
CDH	Cellobiosedehydrogenase
cDNA	copy DNA
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
DCM	Dichlormethan
DH	Dehydrogenase
DKR	Dynamisch kinetische Racematspaltung
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	<i>enantiomeric excess (Enantiomerenüberschuss)</i>
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie

G	Guaiacylrest
g	Erdschwerebeschleunigung
GC	Gas chromatography
GLOX	Glyoxaloxidase
h	Stunde (engl. hour)
H	<i>p</i> -Hydroxyphenylrest
HBT	Hydroxybenzotriazol
HL-ADH	Horse Liver-Alcohol Dehydrogenase
HPLC	High performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Inaktivierungskoeffizient [1/h]
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LAC	Laccase
LB	Luria Bertani
LiP	Ligninperoxidase
MD	Minimal Dextrose Medium
MDH	Minimal Dextrose Histidin Medium
MG	Molekulargewicht
MIBK	Methylisobutylketon
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MM	Minimal Methanol Medium
MMH	Minimal Methanol Histidin Medium
MnP	Manganperoxidase
ms	Millisekunde
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
OD	Optische Dichte
OX	Oxidase

PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pd	Palladium
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PEG	Polyethylenglycol
<i>P. chrysosporium</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>P. methanolica</i>	<i>Pichia methanolica</i>
Ppm	parts per million
PVA	Polyvinylalkohol
RACE-PCR	Rapid Amplification of cDNA ends with Polymerase Chain Reaction
REM	Rasterlektronenmikroskopie
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	ribosomal ribonucleic Acid
mRNA	messenger ribonucleic acid
Rpm	Rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
S	Syringylrest
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
T	Temperatur
$t_{1/2}$	Halbwertszeit [h]
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	Tobacco Acid Pyrophosphatase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
<i>T. versicolor</i>	<i>Trametes versicolor</i>
<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
U	Unit (Einheit)
V	Volumen

V	Volt
Vol. Aktivität	volumetrische Aktivität [U/mL]
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose Medium
YPGal	Yeast Peptone Galaktose Medium

Formelzeichen

A	Aktivität [U]
c	Konzentration [mol L^{-1}]
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
ee	Enantiomerenüberschuss [%]
ΔE	Extinktionsänderung [min^{-1}]
ε	molarer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
c	Umsatz (conversion) [%]
d	Schichtdicke [cm]
F	Flussrate [L h^{-1}]
V_{Reaktor}	Volumen des Reaktors [L]
P	Verteilungskoeffizient
[R]	Konzentration des (<i>R</i>)-Enantiomers [mol L^{-1}]
[S]	Konzentration des (<i>S</i>)-Enantiomers [mol L^{-1}]
τ	Verweilzeit [h]

Teil 1 Bereitstellung der Biokatalysatoren LAC, LiP und MnP für deren chemisch-technische Nutzung

1. Einleitung

1.1 Lignin als nachwachsender Rohstoff

Wälder repräsentieren ungefähr 27% der Erdoberfläche und Holz ist das vorherrschende daraus kommerziell genutzte Produkt. Der weltweite Holzverbrauch stieg von 1960 bis 1995 insgesamt um 60% auf über 3,3 Milliarden m³ an und belief sich im Jahr 2002 bereits auf 4,4 Milliarden m³ pro Jahr. Heute, im Jahr 2010, werden jährlich weltweit 5,3 Milliarden m³ Holz geerntet, was einer erneuten Steigerung der Holznachfrage um 60% in nur 15 Jahren entspricht. Bisher werden mehr als 50% des geernteten Rohstoffs lediglich als Brennstoff genutzt. Die verbleibenden ~50% der jährlichen Holzernte werden überwiegend für die Herstellung von Papierprodukten und als Baumaterial verwendet [Martinez, Speranza *et al.*, 2005].

Cellulose, ein lineares, hoch strukturiertes, oft kristallines Polymer aus Cellobiose, ist der Hauptbestandteil von Holz und macht insgesamt über 50% des Holzgewichtes aus. Der zweite Holzhauptbestandteil ist das sehr komplexe, nicht-lineare Polymer Lignin, welches bei Weichhölzern ~30% und bei Harthölzern ~20% des Trockengewichts ausmacht [Lanzalunga, Bietti, 2000]. Die dritte strukturelle Komponente im Holz ist Hemicellulose, ein Polymer mittlerer Komplexität aus verschiedenen, oftmals acetylierten Pentose- und Hexosemonomeren. Des Weiteren finden sich nicht-strukturelle Komponenten im Holz, die entweder mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden können (Extrakte) oder die wasserlöslich sind, wie z. B. Zucker und Stärke. Zu den Extrakten gehören polare Substanzen, wie Phenole und Tannine, und apolare Substanzen, wie Fette und Sterole. Weitere Bestandteile sind Proteine und Asche. Die Summe der nicht-strukturellen Komponenten machen durchschnittlich jedoch weniger als 5% des Holztrockengewichtes aus [Martinez, Speranza *et al.*, 2005].

Lignin ist ein äußerst wichtiger nachwachsender Rohstoff, da es nach Cellulose die zweit häufigste organische Substanz der Erde ist [Reale, Di Tullio *et al.*, 2004]. Auch in der Industrie fallen jährlich 30-50 Millionen Tonnen Lignin bei der Papierproduktion als Abfallprodukt an [Reale, Di Tullio *et al.*, 2004; Glasser, Kelley, 1987]. Somit stehen große Mengen dieses kostengünstigen Rohstoffs für einen Prozess zur Verfügung, in dem es gelingt, Lignin zu einem technisch wertvollen Produkt aufzuarbeiten. Im Gegensatz zur lang bekannten und etablierten Hydrolyse isolierter Cellulosen und Hemicellulosen durch Hydrolasen aus cellulolytischen und ligninolytischen Pilzen [Leonowicz, Matuszewska *et al.*, 1999] gibt es bisher jedoch kaum einen industriell etablierten Ligninabbauprozess. Der ungleich kompliziertere Ligninaufschluss ist mit der hoch komplexen, im Unterschied zu Cellulosen und Hemicellulosen unregelmäßigen Struktur des Polymers zu begründen.

1.2 Ligninstruktur

Obwohl seit den 40er Jahren intensiv an der Strukturaufklärung von Lignin gearbeitet wird, ist es bis heute nicht gelungen diese vollständig aufzuklären [Holtman, Chang *et al.*, 2003]. Dies liegt daran, dass es nicht möglich ist, Lignin von den übrigen Holzkomponenten zu isolieren, ohne dabei dessen Struktur zu verändern [Reale, Di Tullio *et al.*, 2004]. Bewiesen ist jedoch, dass Lignin *in situ* ein amorphes Polymer ist, das aus dimethoxylierten (Syringyl, S), monomethoxylierten (Guaiacyl, G) und nicht-methoxylierten (*p*-Hydroxyphenyl, H) Phenylpropanoidvorstufen (s. Abb. 1.1), die über verschiedene Kohlenstoff-Kohlenstoff und Etherbindungen miteinander verknüpft sind, besteht [Lewis, Yamamoto, 1990; Lanzalunga, Bietti, 2000; Reale, Di Tullio *et al.*, 2004].

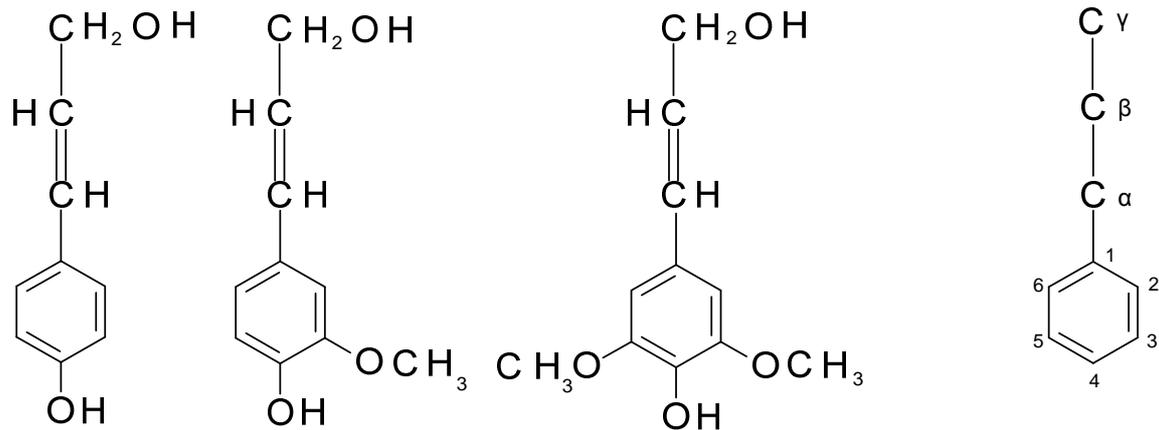


Abbildung 1.1. Monomere Phenylpropanoidstruktureinheiten des Lignins.

Von links nach rechts: *p*-Hydroxyphenylrest (H), Guaiacylrest (G), Syringylrest (S) und ein Modell für die Nummerierung des Kohlenstoffgerüsts.

Das Lignin-typische heterogene Bindungsmuster der drei Phenylpropanoidmonomere ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Das gezeigte Ligninstrukturmodell wurde 1968 von Freudenberg und Neish erstellt und ist bis heute fast allgemein akzeptiert.

Trotz der starken Heterogenität des Ligninpolymers lässt es sich aufgrund typischer H:G:S Verhältnisse in die drei Hauptgruppen Weichholzlignin, Hartholzlignin und Graslignin einteilen [Higuchi, 1990]. Weichhölzer bestehen überwiegend aus Guaiacyl, Harthölzer aus Guaiacyl und Syringyl. Grashölzer bestehen ebenfalls überwiegend aus Guaiacyl und Syringyl, allerdings kann hier auch ein geringer Gehalt an *p*-Hydroxyphenylen detektiert werden [Reale, Di Tullio *et al.*, 2004].

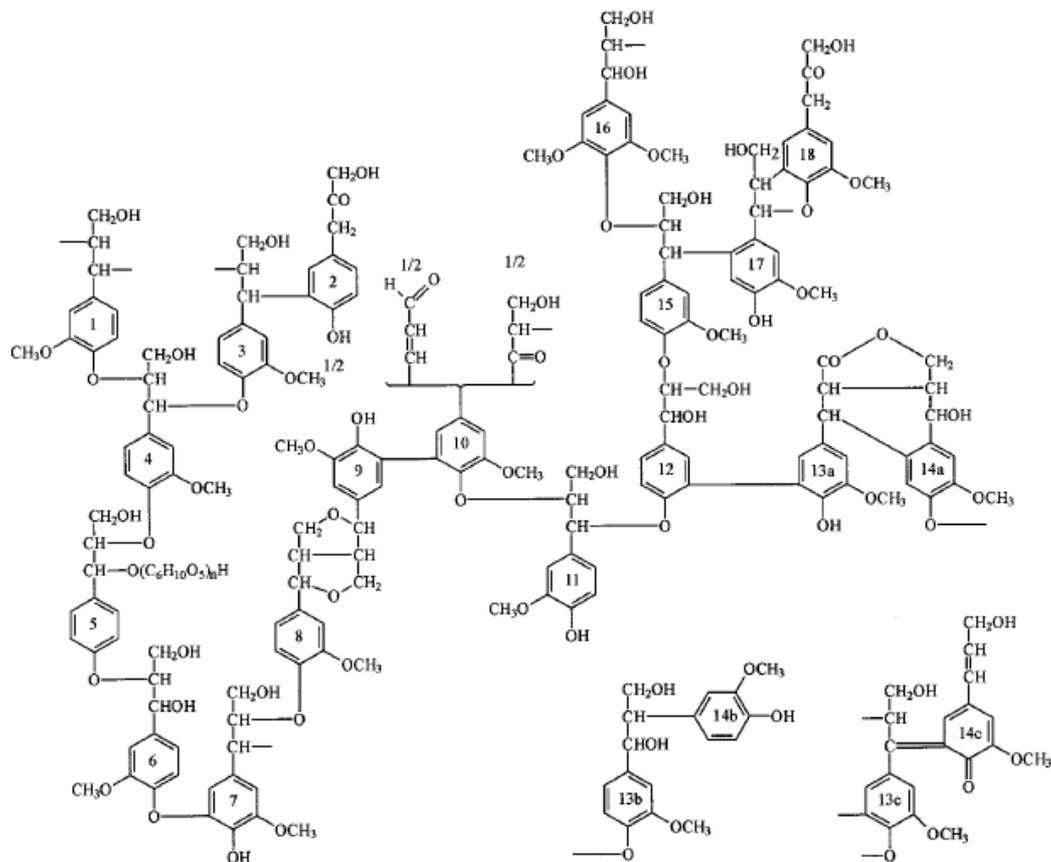


Abbildung 1.2. Strukturmodell von Weichholzlignin aus Fichten.

Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags aus Freudenberg und Neish [1968] übernommen.

1.3 Ligninabbau

Aufgrund des heterogenen Bindungsmusters des Ligninpolymers (s. 1.2), ist dieses gegenüber mikrobiellem Abbau sehr resistent. Auch die Spaltung des Polymers in seine Phenylpropanoidmonomere auf chemischem Wege ist schwierig, da vor allem die verschiedenen Etherbindungen chemisch resistent sind [Reale, Di Tullio *et al.*, 2004]. Dennoch gibt es sowohl Möglichkeiten Lignin auf mikrobiologischem als auch auf chemischem Wege abzubauen bzw. zu modifizieren.

1.3.1 Chemischer Abbau

Der technische Ligninabbau spielt vor allem bei der Papier- und Zellstoffproduktion eine wichtige Rolle. Die chemische Separation des Lignins von Cellulose, die anschließend weiter verarbeitet wird, ist einer der komplexesten Prozesse in der Pulp- und Papierindustrie. Aufschlussprozesse des Lignocellulosekomplexes lassen sich generell in zwei Hauptklassen aufteilen, die mechanische und die chemische Methode. Während es beim mechanischen Aufschluss zu keiner Abtrennung des Lignins kommt, werden dagegen im chemischen Aufschluss durch teilweisen Abbau und Lösung des Lignins von der Holzzellwand Cellulosefasern frei gesetzt. Allerdings ist hier die Ausbeute mit 40 bis 50% generell niedrig und es werden umweltschädliche Chemikalien und hohe Prozessdrücke und -temperaturen eingesetzt [Lanzalunga, Bietti, 2000]. Der chemische Ligninabbau lässt sich grundsätzlich in vier Hauptverfahren, das Sulfit- und Sulfatverfahren, das Sodaaufschlussverfahren und das Solventverfahren (Organosolv), einteilen [Blehschmidt, 2009].

Sulfitaufschlussverfahren

Der Sulfitaufschluss ist das historisch älteste Verfahren nach dem aus Holz Zellstoff gewonnen wird. Das wirksame Agens aller Sulfitverfahren ist Schwefeldioxid (SO_2), das in Wasser als Schwefelsäure (H_2SO_3) vorliegt und mit den dissoziierten Anionen HSO_3^{1-} und SO_3^{2-} in einem pH-Wert abhängigen Gleichgewicht steht. Der pH-Wert des Aufschlusses kann durch das Mengen-Verhältnis Säure zu Base zwischen stark sauer bis stark basisch eingestellt werden. Daher lassen sich Sulfitaufschlussverfahren je nach pH-Bereich in den sauren, den neutralen und den alkalischen Aufschluss einteilen. Beim sauren Aufschlussverfahren wird Calcium (CaO bzw. $\text{Ca}(\text{OH})_2$), beim neutralen Aufschluss Magnesium oder Ammonium (NH_3 bzw. NH_4OH) und beim alkalischen Prozess Natrium (NaOH) als Base eingesetzt. Der Sulfitaufschluss führt zur Sulfonierung von Ligninbausteinen, wobei das Bisulfition am α -C-Atom angreift. Dadurch kommt es sowohl zur Einführung hydrophiler Gruppen als auch zur Fragmentierung der Ligninmakromoleküle über Lösung der Etherbindungen am α -C-Atom [Blehschmidt, 2009].

Sodaaufschlussverfahren

Der Sodaufschluss gehört zu den chemischen Teilaufschlüssen, weil es nicht gelingt, Holz vollständig zu delignifizieren. Heute wird trotz der Bezeichnung als Sodaverfahren meist die stärkere Base Natronlauge anstelle von Natriumcarbonat (Soda) als Aufschlussreagenz eingesetzt. Das Pflanzenmaterial wird zunächst mit Natronlauge imprägniert und anschließend einige Stunden bei 160-170 °C unter dem sich im Reaktionsgefäß einstellenden Druck gekocht. Unter diesen Bedingungen werden Protonen der phenolischen Hydroxylgruppen der Phenylpropanoidmonomere abgespalten, so dass Phenolatgruppen entstehen. Durch diese Ionisierung der phenolischen OH-Gruppen wird ein Teil der Vernetzung im Lignin gelöst. Neben den Hydroxylgruppen können auch Methoxylgruppen der Ligninmonomere zu Phenolatgruppen gespalten werden. Dabei entsteht Methanol als Abbauprodukt, welches ein relativ gutes Lösungsmittel für Lignin ist und somit das Herauslösen des Lignins aus dem Lignocellulosekomplex unterstützt. Zusätzlich werden während dieses Prozesses Etherbindungen am α -C-Atom der Phenylpropanoideinheiten teilweise hydrolytisch gespalten. Der Sodaufschluss gelingt jedoch nur bei wenig verholzten Pflanzengeweben, wie sie z. B. in Einjahrespflanzen vorkommen [Blechsmidt, 2009].

Sulfataufschlussverfahren

Das Sulfatverfahren wird auch Kraftverfahren genannt, weil hierbei besonders fester Zellstoff, der sogenannte Kraftzellstoff, entsteht. Dieser findet vor allem in Papier als Verstärkungsfaser Anwendung. Dieses Aufschlussverfahren findet analog zum Sodaufschlussverfahren unter Verwendung von Natronlauge bei einem stark basischen pH-Wert und einer Temperatur von 170 °C statt. Im Gegensatz zum reinen Sodaverfahren wird jedoch neben der Natronlauge Natriumsulfid als Aufschlussreagenz eingesetzt, wobei die durch Hydrolyse entstehenden Hydrogensulfidionen das eigentliche Aufschlussagens darstellen. Der Name Sulfataufschluss ist daher irreführend, weil als Aufschlusschemikalie Sulfid und nicht Sulfat wirkt. Im Vergleich zum reinen Sodaprozess verläuft bei Anwesenheit der sehr nukleophilen Hydrogensulfidionen die Spaltungsreaktion am Lignin wesentlich schneller und effektiver. Es findet eine bedeutend bessere Delignifizierung statt. Neben der Spaltung von Etherbindungen am α -C-Atom, können im Sulfatverfahren zusätzlich Etherbindungen am β -C-Atom gespalten werden. Sogar Methoxylgruppen können unter Bildung von Methylmercaptan abgespalten werden, was allerdings eine unerwünschte Nebenreaktion ist, weil sie auch zur Bildung der

sehr intensiv nach Schwefelwasserstoff riechenden und giftigen Verbindungen Dimethylsulfid und Dimethyldisulfid führen kann [Blechsmidt, 2009].

Lösungsmittelaufschlussverfahren (Organosolv-Verfahren)

Als Lösungsmittel- oder Organosolv-Verfahren bezeichnet man Holzaufschluss-Prozesse, bei denen organische Lösungsmittel eingesetzt werden, die bevorzugt Lignin lösen. Im einfachsten und ökologisch unbedenklichsten Verfahren werden Alkohole (Methanol und Ethanol) (50%) als Lösungsmittel eingesetzt. Durch Kochen in den niedrig siedenden Alkoholen wird das Ligninpolymer geringfügig hydrolysiert und zumindest teilweise im Alkohol gelöst. Das Organosolv-Verfahren eignet sich besonders zum Aufschluss von Laubhölzern. Nadelhölzer können dagegen kaum aufgeschlossen werden [Blechsmidt, 2009].

1.3.2 Enzymatischer Abbau

Der Abbau von Lignocellulose ist ein zentraler Schritt in der Rückgewinnung des Kohlenstoffs im terrestrischen Ökosystem und im Gegensatz zu chemischen Abbaumethoden kann Lignin auf biokatalytischem Wege vollständig zu CO₂ assimiliert werden. Hierbei sind Weißfäulepilze mit Abstand die schnellsten und effektivsten delignifizierenden Mikroorganismen. Sie können Lignin unter optimalen Bedingungen mit einer Ausbeute von 50-70% zu CO₂ assimilieren [Tuomela, Vikman *et al.*, 2000]. Die meisten Weißfäulepilze gehören zu den Basidiomyceten und können sowohl Hartholz als auch Weichholz abbauen [Kirk, Farrell, 1987]. Die ligninolytische Aktivität der Weißfäulepilze tritt im Sekundärmetabolismus als Folge von Stickstoff- und Kohlenstofflimitierung auf [Brown, 1985; Kirk, Farrell, 1987]. Generell muss zwischen selektiver und nicht-selektiver Delignifikation unterschieden werden. Bei der selektiven Delignifikation kommt es zum Abbau von Lignin ohne erheblichen Celluloseabbau, während bei der nicht-selektiven Delignifikation alle Hauptkomponenten der Zellwand abgebaut werden [Eriksson, Blanchette *et al.*, 1990; Blanchette, 1995]. Zu den am besten untersuchten Weißfäulepilzen gehören *Phanerochaete chrysosporium*, der Lignin selektiv abbaut und *Trametes versicolor*, der Lignin nicht-selektiv abbaut [Hatakka, 1994].

Neben den Weißfäulepilzen spielen auch Braunfäulepilze bei der Holzmineralisierung eine Rolle. Diese können zwar Cellulosen und Hemicellulosen vollständig abbauen, der Ligninabbau ist jedoch stark limitiert [Buswell, Odier, 1987; Kirk, Farrell, 1987]. Insgesamt machen Braunfäulepilze, die hauptsächlich Weichhölzer befallen, nur 6% aller ligninolytischen Basidiomyceten aus [Rayner, Boddy, 1988]. Eine weitere Gruppe ligninabbauender Pilze sind die Knollennassfäulepilze, die zu den Ascomyceten oder Deuteromyceten gehören. Sie können sowohl Weichhölzer als auch Harthölzer assimilieren, allerdings im Vergleich zu Weiß- und Braunfäulepilzen nur zu einem minimalen Grad [Eriksson, Blanchette *et al.*, 1990]. Auch einige wenige Bakterien, die zu den Actinomyceten oder Myxobakterien gehören wie z. B. *Streptomyces* und *Pseudomonas*, können Lignin aus dem Lignocellulosekomplex herauslösen und zumindest teilweise langsam verstoffwechseln. Im Gegensatz zu den Weißfäulepilzen bauen sie Lignin nicht im Sekundär-, sondern im Primärmetabolismus ab [Eriksson, Blanchette *et al.*, 1990; Godden, Ball *et al.*, 1992].

Alle ligninolytischen Mikroorganismen bauen Lignin mithilfe von oxidativen Enzymen (Oxidoreduktasen) ab. Aufgrund der Beschaffenheit und Größe des Ligninmoleküls müssen die Oxidoreduktasen extrazellulär vorliegen und eine relativ unspezifische Aktivität vorweisen [Kirk, Farrell, 1987; Hatakka, 1994]. Die drei am besten untersuchten und wichtigsten extrazellulären Enzyme, die an der Delignifikation beteiligt sind, sind die Ligninperoxidase (LiP; EC 1.11.1.14), die Manganperoxidase (MnP; EC 1.11.1.13) und die Laccase (LAC; EC 1.10.3.2). Im Folgenden werden diese drei Oxidoreduktasen genauer betrachtet.

Ligninperoxidase und Manganperoxidase

Die Ligninperoxidase und die Manganperoxidase wurden Anfang der 80er Jahre erstmals in *P. chrysosporium* identifiziert [Tien, Kirk, 1983; Glenn, Morgan *et al.*, 1983]. Beide Glykoproteine gehören zu den Hämperoxidasen, sind zwischen 40-50 kDa groß und benötigen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Elektronenakzeptor. Zwischen beiden Peroxidasen liegt eine Sequenzsimilarität von ~57% vor und auch die Reaktionsmechanismen sind sehr ähnlich.

Da die LiP ein höheres Redoxpotential als die MnP aufweist [Vares, 1996], katalysiert sie sowohl die Oxidation phenolischer als auch nicht-phenolischer Phenylpropanoideinheiten, wobei letztere ~90% des Lignins ausmachen und ein sehr hohes Redoxpotential von 1,4 V aufweisen [Martinez, Speranza *et al.*, 2005; Blodig, Smith *et al.*, 2001]. Der Katalysemechanismus der Häm enthaltenden LiP beginnt mit der Oxidation des Enzyms durch H_2O_2 zur Enzymkomponente I, die ein Zwei-Elektronen oxidiertes Intermediat darstellt. In dieser Enzymkomponente I wird ein Oxidationsäquivalent als Oxo-Ferryl Spezies $[\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}]^{2+}$ und das zweite Äquivalent entweder als Porphyrin π -Radikal (P^\bullet) oder als Protein basiertes radikalisches Kation gespeichert [Choinowski, Blodig *et al.*, 1999]. Das so oxidierte Enzymintermediat I wird anschließend durch ein Substratmolekül zum zweiten Enzymintermediat, der Ein-Elektronen oxidierten Komponente II, reduziert. Eine weitere Reduktion der Enzymkomponente II in die Enzymausgangsform kann entweder durch dasselbe oder aber ein weiteres Substratmolekül erfolgen. Die arylischen Substrate werden dabei zu arylischen Kation-Radikalen (Ar^\bullet) oxidiert (s. Abb. 1.3) [Gold, Alic, 1993].

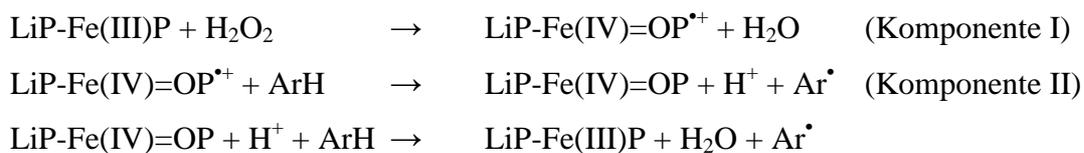


Abbildung 1.3. Schema des Katalysezyklus der Ligninperoxidase (LiP). Die Abkürzungen P und Ar stehen für Porphyrin bzw. für das arylische Substrat.

Der Katalysemechanismus der zweiten Hämperoxidase, der MnP, verläuft analog zu dem der LiP. Da die MnP jedoch ein niedrigeres Redoxpotential aufweist, oxidiert sie vornehmlich phenolische Ligninbausteine, die niedrigere Redoxpotentiale als nicht-phenolische Ligninbestandteile haben. Nicht-phenolische Komponenten kann die MnP lediglich mithilfe geeigneter Cooxidantien (Mediatoren), wie z. B. ungesättigten Fettsäuren und deren Derivate, oxidieren. Es gibt Hinweise, dass sich ungesättigte Fettsäuren tatsächlich in der Mikroumgebung von ligninolytischen Pilzen befinden [Enoki, Watanabe *et al.*, 1999] und dass solche Substanzen sogar im Holz selbst vorkommen [Hofrichter, Lundell *et al.*, 2001].

Der Hauptunterschied zwischen den beiden Hämperoxidasen ist die Natur des reduzierenden Substrates [Gold, Wariishi *et al.*, 1989; Kirk, Farrell, 1987; Schoemaker, 1990]. Während die LiP Lignineinheiten direkt oxidiert, oxidiert die MnP diese lediglich indirekt über freie

Manganionen (Mn) [Gold, Wariishi *et al.*, 1989; Paszczynski, Huynh *et al.*, 1986]. Analog zum LiP-Katalysemechanismus wird die MnP zunächst durch H_2O_2 in einer Zwei-Elektronen-Reaktion zur Enzymkomponente I (MnPI) oxidiert. Mn(II)-Ionen reduzieren anschließend sowohl die Enzymkomponente I zu der Ein-Elektronen oxidierten Komponente II (MnPII) als auch diese Enzymkomponente II (MnPII) zur Ausgangsform der MnP (s. Abb. 1.4).

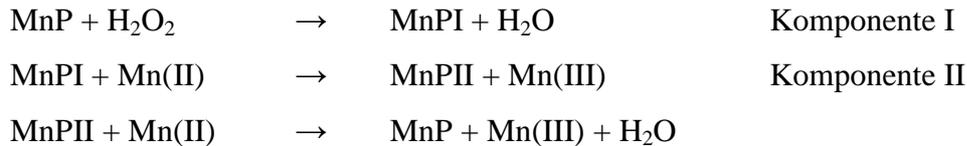


Abbildung 1.4. Schema des Katalysezyklus der Manganperoxidase (MnP).

Die im Katalysezyklus der MnP zu Mn(III) oxidierten Manganionen oxidieren anschließend wiederum die phenolischen Substrate zu Phenoxy-Radikalen und werden dabei selbst zurück zu Mn(II)-Ionen reduziert. Organische Säuren wie Malonat und Oxalat, die von Weißfäulepilzen sekretiert werden, stimulieren die MnP Reaktion, in dem sie die entstehenden Mn(III) Ionen stabilisieren. Dadurch können sich diese von der Enzymoberfläche lösen [Gold, Alic, 1993]. Im Ligninabbau kommt der MnP aufgrund dessen eine wichtige Sonderrolle zu, da die freien Mn(III)-Ionen in das Makromolekül Lignin hinein diffundieren können und es somit durch erste Modifikationen für die weiteren Peroxidasen LiP und LAC zugänglich machen [Tuomela, Vikman *et al.*, 2000].

Laccase

Im Gegensatz zur Li- und MnP ist die Laccase (MG 50-70 kDa) keine Hämperoxidase, sondern eine Kupfer enthaltende Phenoloxidase. Ein weiterer Unterschied ist, dass die Laccase anstelle von H_2O_2 molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor nutzt [Thurston, 1994]. Laccasen haben wesentlich niedrigere Redoxpotentiale (~0,5-0,8 V) als die LiP und können daher, wie auch die MnP, lediglich Ligninkomponenten mit freien Phenolgruppen zu Phenoxy-Radikalen oxidieren. Dies geschieht nicht, wie bei der Li- und MnP, über eine Zwei-Elektronen, sondern über eine Ein-Elektronen Reaktion (s. Abb. 1.5).

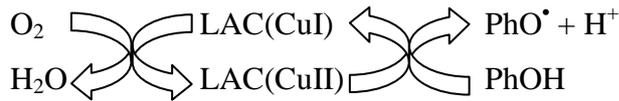


Abbildung 1.5. Schema des Katalysezyklus der Laccase.
PhOH steht für phenolisches Substrat, PhO• für Phenoxyradikal.

In Gegenwart passender Mediatoren wie z. B. ABTS (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)) oder HBT (Hydroxybenzotriazol) können Laccasen auch einige nicht-phenolische Komponenten oxidieren [Bourbonnais, Paice, 1990].

Allen beschriebenen Katalysemechanismen der drei Oxidoreduktasen ist gemeinsam, dass die arylischen Reste im Ligninpolymer zu arylischen Kation-Radikalen oxidiert werden. Diese Kation-Radikale führen im Ligninpolymer anschließend über nicht-enzymatisch kontrollierte Reaktionen zur Spaltung verschiedener C-C- und Etherbindungen, wobei auch Ringöffnungen stattfinden.

Weitere Enzyme

Weitere extrazelluläre Enzyme, die an der Delignifikation beteiligt sind, sind H₂O₂-generierende Oxidasen und Myzelium assoziierte Dehydrogenasen, die aus Lignin gewonnene Komponenten weiter reduzieren [Levasseur, Piumi *et al.*, 2008]. Zu den H₂O₂-generierenden Oxidasen gehören die Aryl-Alkoholoxidase (AAO; EC1.1.3.7), die aus *Pleurotus eryngii* und anderen Pilzen isoliert wurde [Guillen, Martinez *et al.*, 1992], und die Glyoxaloxidase (GLOX; EC 1.2.3.5) aus *P. chrysosporium* [Kersten, 1990]. Eine typische Dehydrogenase, die an der Lignin-mineralisierung beteiligt ist, ist die Aryl-Alkoholdehydrogenase (AAD; EC 1.1.1.90) [Gutierrez, Caramelo *et al.*, 1994].

1.4 Expressionssysteme Lignin abbauender Enzyme

Die drei ligninolytischen Oxidoreduktasen LiP, MnP und LAC sind relativ substratunspezifisch und bauen daher, neben dem interessanten nachwachsenden Rohstoff Lignin, viele verschiedene chemische Substanzen wie chlorierte Phenole, Pestizide, polychlorierte Biphenyle (PCBs), Dioxine, phosphoorganische Substrate, Nitrotoluole, Chloraniline, Farbstoffe und weitere wichtige umweltschädliche Stoffe ab [Barr, Aust, 1994;

Pointing, 2001; Reddy, 1995]. Obwohl die ligninolytischen Oxidoreduktasen daher von großem biotechnologischen Interesse sind, sind technische Anwendungen bis heute hauptsächlich aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit der Enzyme stark limitiert.

Die kostenintensive Bereitstellung der Oxidoreduktasen aus Pilzen ist auf die schwierigen Kultivierungs- und Expressionsbedingungen der Weißfäulepilze zurückzuführen [Ayala, Pickard *et al.*, 2008]. Weißfäulepilze exprimieren ligninolytische Enzyme generell im Sekundärmetabolismus in der späten Tropho- und frühen Idiophase als Antwort auf Kohlenstoff- und/oder Stickstoff- und/oder Schwefellimitierung. Die Wachstumsphase dauert nach Inokulation der Kulturen 6 bis 10 Tage. Erst danach kann erste Enzymaktivität im Medium nachgewiesen werden. Die Expressionsrate kann durch hohe Sauerstoffkonzentrationen im Medium gesteigert werden. Da Weißfäulepilze in geschüttelten, submersen Kulturen jedoch nur schwer zu kultivieren sind, müssen statische Kulturen täglich mit reinem Sauerstoff begast werden [Kirk, Schultz *et al.*, 1978; Faison, Kirk, 1985; Kirk, Croan *et al.*, 1986; Brown, Glenn *et al.*, 1990]. Erschwerend kommt hinzu, dass die extrazellulären ligninolytischen Enzyme oft schon kurze Zeit nach Erreichen der maximalen Proteinkonzentration durch pilzeigene Proteasen abgebaut werden. Zudem liegen alle drei Oxidoreduktasen in ligninolytischen Pilzen als Serie mehrerer Isoenzyme vor, deren Expressionsmuster nicht von deren genomischer Organisation abhängt, sondern in Abhängigkeit vom Stamm, den Kultivierungsbedingungen, den Substraten und dem Zeitverlauf der Kultivierung stark variiert und damit schwer kontrollierbar ist [Conesa, Punt *et al.*, 2002]. Die Simplifizierung der Produktion und eine damit verbundene Senkung der Kosten sind Grundvoraussetzung für alle technischen Anwendungen der ligninolytischen Enzyme.

Beim Versuch die homologe Expression zu optimieren, wurden verschiedene Kultivierungsaspekte wie geschüttelte oder stationäre Kultivierung, die Verwendung von freien oder immobilisierten Myzelien, kontinuierliche oder diskontinuierliche Reaktorführung, Nährstofflimitierung oder Überschuss und die Verwendung verschiedenster Inducer untersucht [Kirk, Schultz *et al.*, 1978; Faison, Kirk, 1985; Kirk, Croan *et al.*, 1986; Brown, Glenn *et al.*, 1990; Ayala, Pickard *et al.*, 2008]. Generell ließen sich auf diese Weise jedoch nur geringe Steigerungen der Expressionsrate erzielen. Daher scheint die

rekombinante Expression die einzige Option für höhere Proteinausbeuten und die Vereinfachung von Fermentation und Proteinaufreinigung zu sein.

Rekombinante Expression von Laccasen aus verschiedenen Pilzen wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. So wurden Laccasegensequenzen sowohl in verschiedene Hefestämme [Bulter, Alcalde *et al.*, 2003; Cassland, Jönsson, 1999; Colao, Lupino, 2006; Hong, Xiao *et al.*, 2006; Jönsson, Saloheimo *et al.*, 1997; Li, Hong *et al.*, 2007; Liu, Chao *et al.*, 2003; Otterbein, Record *et al.*, 2000; Soden, O'Callaghan *et al.*, 2002] als auch in unterschiedliche filamentöse Pilze [Hoshida, Fujita *et al.*, 2005; Record, Punt *et al.*, 2002; Yaver, Overjero *et al.*, 1999] kloniert und erfolgreich exprimiert. Rekombinante Laccasen unterscheiden sich in ihren biochemischen Eigenschaften oft nicht signifikant von denen nativer Enzyme. In den beiden erfolgreichsten Laccase Expressionssystemen, der Expression einer Laccase aus *Coprinus cinereus* in *Aspergillus oryzae* [Yaver, Overjero *et al.*, 1999] und einer Laccase aus *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris* [Hong, Meinander *et al.*, 2002], wurden Proteinkonzentrationen von bis zu 100 mg L⁻¹ erzielt.

Die heterologe Expression der beiden Hämperoxidasen LiP und MnP ist dagegen bis heute trotz intensiver Forschung deutlich weniger erfolgreich. Da Hämperoxidasen aus Pilzen einer posttranslationalen Modifikation unterliegen, müssen in Frage kommende Expressionssysteme diese ebenfalls ermöglichen. Hierzu gehören die korrekte Proteinfaltung, inklusive einer erfolgreichen Koordination der prosthetischen Hämgruppe, die Bildung von Disulfidbrücken und die Einbringung struktureller Ca-Ionen [Conesa, Punt *et al.*, 2002a]. Auch ein pilzähnliches Glykosilierungsmuster der Oxidoreduktasen ist bezüglich der Enzymstabilität wünschenswert [Nie, Reading *et al.*, 1999]. Aufgrund der genannten Schwierigkeiten scheint eine homologe Produktion der Hämperoxidasen in genetisch manipulierten ligninolytischen Pilzen eine Alternative zur heterologen Expression zu sein. Allein Tsukihara *et al.* [2006] gelang jedoch bisher eine Überproduktion einer MnP in einem genetisch modifizierten *Pleurotus ostreatus* Weißfäulepilz. Hierbei konnte immerhin eine Steigerung der durchschnittlich erreichten Enzymkonzentration um den Faktor 10 auf 20 mg L⁻¹ erzielt werden [Conesa, Punt *et al.*, 2002a]. Da dies nach dem gegenwärtigen Wissensstand das einzige veröffentlichte Positivbeispiel ist, erscheint die rekombinante Produktion der Hämperoxidasen erfolgversprechender.

Aufgrund der hohen Ansprüche an das Expressionssystem kommen prokaryotische Bakterien wie *Escherichia coli* nicht in Frage, da hier posttranslationale Modifikationen nicht möglich sind. Aufgrund dessen konnte bis heute in *E. coli* lediglich das inaktive Apoprotein in Einschlusskörpern exprimiert werden [Doyle, Smith, 1996; Dongho, Dong-Hyun, 1999; Miki, Morales *et al.*, 2009]. Die zum Erhalt eines aktiven Proteins anschließend durchgeführte *in vitro* Rückfaltung des Enzyms verursacht hohe Kosten und ist zudem uneffizient. Im Baculovirus-Insekten-Zellexpressionssystem konnten sowohl die LiP [Johnson, Li, 1991] als auch die MnP [Pease, Aust *et al.*, 1991] aktiv exprimiert werden. Die hohen Kosten dieses Expressionssystems lassen jedoch keine Enzymproduktion im industriellen Maßstab zu. Besser geeignete Expressionssysteme sind daher Hefen und filamentöse Pilze.

Bis heute ist keine zufriedenstellende Expression der LiP in filamentösen Pilzen gelungen. Die Klonierung der LiP in *Aspergillus niger* führte bei Verwendung eines Protease defizienten Stammes unter der Kontrolle eines induzierbaren Glucoamylase Promotors lediglich zur Expression von inaktivem Protein [Conesa, van den Hondel *et al.*, 2000] und unter Kontrolle eines konstitutiven Nopalinsynthase Promotors lediglich zur Expression des aktiven Enzyms in Spuren [Aifa, Sayadi *et al.*, 1999]. Die heterologe Expression einer LiP aus dem Weißfäulepilz *Phlebia radiata* in dem Pilz *Trichoderma reesei* unter Kontrolle eines induzierbaren Cellobiohydrolase Promotors gelang ebenfalls nicht. Es wurde keine LiP produziert [Saloheimo, Barajas *et al.*, 1989]. Die heterologe Expression der LiP in Hefen gelang lediglich in *Pichia methanolica*, wo mithilfe eines Protease defizienten Stammes unter Kontrolle eines induzierbaren Alkoholoxidase Promotors eine Expression von 100 mg L⁻¹ erzielt wurde [Wang, Lu *et al.*, 2004].

Die Expression der MnP ist dagegen in filamentösen Pilzen erfolgreicher als in Hefen. Die niedrigsten Proteinkonzentrationen wurden mit 3-7 mg L⁻¹ in *Aspergillus nidulans* und mit 5 mg L⁻¹ in *Aspergillus oryzae* jeweils unter Kontrolle eines induzierbaren TAKA Amylase Promotors erzielt [Larrondo, Lobos *et al.*, 2001; Stewart, Whitwam *et al.*, 1996]. In *Aspergillus niger* konnte eine ungleich höhere Expression von 70 mg L⁻¹, bei Verwendung eines Protease defizienten Stammes und bei Überexpression von Chaperonen unter Kontrolle eines konstitutiven Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase Promotors, erzielt werden [Conesa, Jeenes *et al.*, 2002b]. Bei Expression der MnP im selben Stamm, unter Kontrolle

eines induzierbaren Glucoamylase Promotors, konnte sogar eine noch höhere Expression von 100 mg L^{-1} erreicht werden [Conesa, van den Hondel *et al.*, 2000]. In der Hefe *Pichia pastoris* konnte dagegen bisher unter der Kontrolle des konstitutiven Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase Promotors lediglich eine Expression von $\sim 1 \text{ mg L}^{-1}$ detektiert werden [Gu, Lajoie *et al.*, 2003].

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, Möglichkeiten zur Bereitstellung der Biokatalysatoren LiP, MnP und LAC zu überprüfen. Da neben der niedrigen Prozessstabilität dieser Oxidoreduktasen vor allem deren zeitaufwändige und teure Produktion in den ligninolytischen Organismen industrielle Anwendungen limitieren, ist es notwendig diese drei Enzyme durch rekombinante Expression preisgünstig im Labormaßstab zur Verfügung zu stellen.

Der Weißfäulepilz *Cyathus bulleri* wächst auf Baumstämmen krautiger Pflanzen, Holzpellets, Dung, Reisig unter anderen hölzernen Nährstoffquellen und kann zur selektiven Delignifizierung eingesetzt werden [Wicklow, Langie *et al.*, 1984; Vasdev, Dhawan *et al.*, 2005; Salony, Mishra, 2006; Chhabra, Mishra *et al.*, 2008]. *C. bulleri* exprimiert eine Laccase, die verschiedene Methoxyphenole, phenolische Aldehyde und Säuren, hydroxy-substituierte Phenole und aromatische Amine oxidiert und somit ein breites Substratspektrum aufweist [Vasdev, Dhawan *et al.*, 2005]. Auch bei der Entfärbung verschiedener reaktiver Farbstoffe stellte sich diese Laccase als besonders effektiv heraus [Salony, Mishra *et al.*, 2006]. Zudem ist die LAC aus *C. bulleri* als eine der wenigen Laccasen gegenüber der chelatierenden Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) resistent. Auch gegen verschiedene zweiwertige Kationen ist die LAC sehr stabil und viele einwertige Kationen beeinflussen die Proteinaktivität überhaupt nicht [Vasdev, Dhawan *et al.*, 2005]. Daher wurde auch eine erhöhte Stabilität gegen andere Parameter erwartet. pH- und Temperaturstabilität des Enzyms sind mit anderen Laccasen zu vergleichen [Vasdev, Dhawan *et al.*, 2005].

Da diese LAC also einige technische Vorteile aufweist, ist die heterologe Expression dieses Proteins von großem Interesse. Die anschließende Charakterisierung des rekombinanten Enzyms fand mit besonderem Fokus auf dessen Stabilität statt. Da die Nukleotidsequenz der LAC aus *C. bulleri* noch nicht bekannt war, musste diese vor der Klonierung des Gens in einen geeigneten Wirtsorganismus zunächst identifiziert werden. Als Expressionssystem wurde die Hefe *P. pastoris* ausgewählt, da diese Hefe speziell für Fermentationen im industriellen Maßstab entwickelt wurde [Gu, Lajoie *et al.*, 2003] und da die Expression vieler

eukaryotischer Proteine, wie z. B. auch der LAC aus *Trametes versicolor*, bereits erfolgreich gelang [Hong, Meinander *et al.*, 2002].

Bei der LiP fiel die Wahl auf die bereits sehr gut untersuchte und sehr reaktive LiPH8 (*lipA*) aus dem Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* [Tien, Kirk, 1984; Kirk, Croan *et al.*, 1986; Hammel, Kalyanaraman *et al.*, 1986; Andrawis, Johnson *et al.*, 1988; Smith, Schalch *et al.*, 1988; Hammel, Moen, 1991; Blodig, Smith *et al.*, 2001]. Hier wurde zunächst die Reproduktion der Ergebnisse von Wang *et al.* [2004], dem erstmalig die Expression dieser LiP in der Hefe *Pichia methanolica* gelang, angestrebt. Als weiteres Hefeexpressionssystem wurde zudem die Hefe *Pichia pastoris* untersucht.

Bei der MnP-Klonierung wurde ebenfalls die bereits umfassend untersuchte MnP (*mnp1*) aus *P. chrysosporium* ausgewählt. Die Expression der MnP im Fadenpilz *Aspergillus niger* gelang bereits erfolgreich [Conesa, van den Hondel *et al.*, 2000; Conesa, Jeenes *et al.*, 2002b]. Ziel in der vorliegenden Arbeit war es jedoch die MnP, analog zur LiP, in einem Hefeexpressionssystem zu produzieren. Da die Expression der MnP in der Hefe *P. pastoris* zu keiner zufriedenstellenden Expressionsrate führte [Gu, Lajoie *et al.*, 2003], wurde hier auf das gut untersuchte Hefeexpressionssystem *Kluyveromyces lactis* zurückgegriffen. Im Vergleich zu anderen Hefen, wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, produziert *K. lactis* im Allgemeinen rekombinante Produkte in besserer Qualität und höherer Ausbeute [Gellissen, Hollenberg, 1997].

Gelingt die Bereitstellung dieser drei delignifizierenden Enzyme, so könnten langfristig technische Anwendungen mit Ziel der vollständigen Nutzung des wertvollen Rohstoffes Holz entwickelt werden. Beim Einsatz delignifizierender Mikroorganismen wird Lignin meist vollständig zu CO₂ und Wasser verstoffwechselt. Durch den Einsatz der isolierten Oxidoreduktasen wäre es dagegen möglich die aromatischen Phenylpropanoidmonomere aus Lignin zu isolieren. Diese sind von großem kommerziellem Wert, da sie in der chemischen Industrie als Vorstufen vielseitig Anwendung finden. Durch die Isolation phenolischer und nicht-phenolischer aromatischer Ausgangsstoffe aus dem nachwachsenden, leicht und preiswert verfügbaren Rohstoff Lignin, könnte die Abhängigkeit der Industriestaaten vom Rohstoff Öl gemindert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien

Agar	Sigma Aldrich (Steinheim)
Agarose	Peqlab (Erlangen)
Acrylamid-Mix 40 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Bacto Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
dATPs	Fermentas (St. Leon-Rot)
dNTPs	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA Loading Dye	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA-Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
Hefeextrakt	Merck (Darmstadt)
Malzextrakt	Merck (Darmstadt)
Protein Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
Page BlueProtein Staining Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)
Protein Roti Load I	Carl Roth (Karlsruhe)
RNA-Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
Sojapepton	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypton	Carl Roth (Karlsruhe)
Veratrylalkohol	Sigma Aldrich (Steinheim)
Yeast Nitrogen Base	Sigma Aldrich (Steinheim)
Yeast Carbon Base	Sigma Aldrich (Steinheim)

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden mindestens analysenrein (p.a.) von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Enzyme

FastDigest <i>AscI</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
FastDigest <i>BglII</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
FastDigest <i>EcoRI</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
FastDigest <i>BamHI</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
Reverse Transkriptase	New England BioLabs (Frankfurt a. Main)
Pfu DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
<i>PmeI</i>	New England BioLabs (Frankfurt a. Main)
<i>PstI</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>SacII</i>	New England BioLabs (Frankfurt a. Main)
Taq Polymerase	Promega (Mannheim)
Topoisomerase I	Invitrogen (Karlsruhe)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.2 Stämme und Plasmide*Pilzstämme*

Cyathus bulleri (Brodie) 195062; (Canadian type culture collection; erhalten von Prof. R. C. Kuhad, University of Delhi).

Phanerochaete chrysosporium 6909 (ATCC 24725); (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ)

E. coli Stämme

TOP10 [*F mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 lacX74recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*] (Invitrogen)

DH5α [*supE44 ΔlacUI69 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*] (Pharmacia)

Hefestämme

Pichia pastoris X-33 (Invitrogen) Wildtyp

Pichia methanolica PMAD16 (Invitrogen) [*ade2-11 pep4Δprb1Δ*]

Kluyveromyces lactis GG799 (New England BioLabs) Wildtyp

Plasmide

pCR4-TOPO, (Invitrogen)	3956 bp, <i>pUC_{ori}</i> , <i>P_{lac}</i> , <i>Amp^R</i> , <i>Kan^R</i>
pCR4-TOPO/LAC	5446 bp, <i>pUC_{ori}</i> , <i>P_{lac}</i> , <i>Amp^R</i> , <i>Kan^R</i>
pCR4-TOPO/LiP	4991 bp, <i>pUC_{ori}</i> , <i>P_{lac}</i> , <i>Amp^R</i> , <i>Kan^R</i>
pCR4-TOPO/MnP	5116 bp, <i>pUC_{ori}</i> , <i>P_{lac}</i> , <i>Amp^R</i> , <i>Kan^R</i>
pPICZαB, (Invitrogen)	3600 bp, <i>pUC_{ori}</i> , <i>P_{AOXI}</i> , <i>α-factor signal sequence</i> , <i>Zeocin^R</i>
pPICZαB/LAC	5090 bp, <i>pUC_{ori}</i> , <i>P_{AOXI}</i> , <i>α-factor signal sequence</i> , <i>Zeocin^R</i>
pMETαA, (Invitrogen)	8000 bp, <i>pUC_{ori}</i> , <i>P_{AUG1}</i> , <i>α-factor signal sequence</i> , <i>Amp^R</i> , <i>ADE2</i>
pMETαA/LiP	9035 bp, <i>P_{AUG1}</i> , <i>α-factor signal sequence</i> , <i>Amp^R</i> , <i>ADE2</i>
pPICZαA, (Invitrogen)	3600 bp, <i>pUC_{ori}</i> , <i>P_{AOXI}</i> , <i>α-factor signal sequence</i> , <i>Zeocin^R</i>
pPICZαA/LiP	4635 bp, <i>pUC_{ori}</i> , <i>P_{AOXI}</i> , <i>α-factor signal sequence</i> , <i>Zeocin^R</i>
pKLAC1, (NEB)	9091 bp, <i>pMB1_{ori}</i> , <i>P_{LAC4-PBI}</i> , <i>P_{ADHI}</i> , <i>amdS</i> , <i>Amp^R</i> , <i>α-MF</i>
pKLAC1/MnP	10227 bp, <i>pMB1_{ori}</i> , <i>P_{LAC4-PBI}</i> , <i>P_{ADHI}</i> , <i>amdS</i> , <i>Amp^R</i> , <i>α-MF</i>

2.1.3 Primer**Tabelle 2.1.** Bezeichnung und Nukleotidsequenzen aller Primer, die bei der Laccaseklonierung eingesetzt wurden.

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz
GeneRacer-RNA-Oligo	5'- CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGAC UGAAGGAGUAGAAA -3'
GeneRacer-Oligo-dT-Primer	5'- GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACA GTG(T) ₂₄ - 3'
GeneRacer-5'-Primer	5'- CGACTGGAGCACGAGGACACTGA -3'
GeneRacer-3'-Primer	5'- GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC G -5'
genspez. downstream Primer	5'- GGTGTCTGGTGCACCGGCATATC -3'
genspez. upstream Primer	5'- TAGCGCCGGAAGCAGCGTGTACAATA -3'
5'-RACE-genspez.-Primer	5'- AGGGGCGGGTGTGTGATACCAAT -3'
3'-RACE-genspez.-Primer	5'- GGGCAGCGGTACTCGTTTGTCTG -3'
Oligo 1	5'- ATTTCCCGCGGTCAGGTGCCGTTGG -3'
Oligo 2	5'- CCGCTGCAGCCATTGGCCCAGTTTCGGA -3'

Tabelle 2.2. Bezeichnung und Nukleotidsequenzen aller Primer, die bei der LiP-Klonierung eingesetzt wurden.

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz
Oligo-dT-Primer	5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'
<i>P. methanolica</i> genspez. upstream Primer	5'- CCGGAATTCGCCACCTGTTCCAACGGCA -3'
<i>P. methanolica</i> genspez. downstream Primer	5'- TTCGGATCCTTAAGCACCCGGAGGCGGA -3'
<i>P. pastoris</i> genspez. upstream Primer	5'- GAATTCGCCACCTGTTCCAACGGCA -3'
<i>P. pastoris</i> genspez. downstream Primer	5'- CCGCGGTTAAGCACCCGGAGGCGGAGG -3'
AUG1 Forward Primer	5'- CAATTTACATCTTTATTTATTAACG -3'
AUG1 Reverse Primer	5'- GAAGAGAAAAACATTAGTTGGC -3'
5'AOX1-Primer	5'- GACTGGTTCCAATTGACAAGC -3'
3'AOX1-Primer	5'- GCAAATGGCATTCTGACATCC -3'

Tabelle 2.3. Bezeichnung und Nukleotidsequenzen aller Primer, die bei der MnP-Klonierung eingesetzt wurden.

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz
Oligo-dT-Primer	5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'
genspez. upstream Primer	5'- CGAGATCTGCAGTCTGTCCAGACGGTAC -3'
genspez. downstream Primer	5'- GCGGCGCGCCGAATCGACATCTACTAAAG -3'
Integrationprimer 1	5'- TACCGACGTATATCAAGCCCA -3'
Integrationprimer 2	5'- ATCATCCTTGTCAGCGAAAGC -3'
Sequenzierungsprimer upstream	5'- GCGGATAACAAGCTCAAC -3'
Sequenzierungsprimer downstream	5'- TTATCGCACAAGACAATC -3'

2.1.4 Geräte

FPLC	Pump P-920, Monitor UPC-900, Valve INV-907, Mixer M-925, Fractioner Frac-920, Äkta (Freiburg), GE Healthcare (Freiburg)
Geldokumentation	Alpha Innotech (Hessisch Oldendorf)

Inkubator	Carl Roth (Karlsruhe)
Lyophile	Alpha 1-2 LD plus, Christ (Riedstadt)
Mikrotiterplattenlesegerät	Infinite M200, Tecan (Crailsheim)
PCR Thermal Cycler	Mastercycler personal, Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter	691, Metrohm
Rührelement UV/Vis Photometer	Variomag
Schüttler	Vibramax 110, Heidolph Instruments (Schwabach)
SDS-Gelkammer	Novex Mini Cell, Invitrogen (Darmstadt)
Thermoblock	Peqlab (Erlangen)
Ultraschallgerät	Labsonic M, Sartorius (Göttingen)
Ultrafiltration	Vivaspin 500, Sartorius (Göttingen) Viva Flow 50, Sartorius (Göttingen)
UV-Vis-Photometer	Cary 50 Scan, Varian (Darmstadt)
Vakuumentrifuge	RC1010, Jouan, Thermo Scientific (Karlsruhe)
Zentrifuge	Mini Spin, Eppendorf (Hamburg) Biofuge Stratos, Heraeus (Hanau)

2.2 Methoden

2.2.1 Langzeitlagerung der Pilze *Cyathus bulleri* und *Phanerochaete chrysosporium*

C. bulleri wurde auf Malzextraktmedium (pH 5,2) folgender Zusammensetzung 7 Tage lang bei 25 °C kultiviert: 20,0 g L⁻¹ Malzextrakt, 0,5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0,5 g L⁻¹ MgSO₄, 0,5 g L⁻¹ Ca(NO₃)₂, 20,0 g L⁻¹ Agar. Anschließend wurde der Pilz bei 4 °C gelagert und alle 2-3 Monate neu ausgestrichen.

P. chrysosporium wurde auf Malzagar (pH 5,6) folgender Zusammensetzung bei 35 °C mehrere Tage lang kultiviert: 30 g L⁻¹ Malzextrakt, 3 g L⁻¹ Sojapepton, 15 g L⁻¹ Agar. Anschließend wurde auch dieser Pilz bei 4 °C gelagert und alle 2-3 Monate umplattiert.

2.2.2 Kultivierung der Pilze unter ligninolytischen Bedingungen

Kultivierung von C. bulleri unter ligninolytischen Bedingungen

C. bulleri wurde in Basalmedium (pH 5,2) folgender Zusammensetzung (pro Liter) kultiviert: 10 g Glucose, 18,1 g Ammoniumtartrat, 14,6 g 2,2-Dimethylsuccinat, 20 g KH_2PO_4 , 5 g MgSO_4 , 1 g CaCl_2 , 0,5 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g NaCl , 0,1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g CuSO_4 , 0,01 g $\text{AlKSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g H_3BO_3 , 0,01 g Natriummolybdat, 1,5 g Nitrilotriacetat und 10 mL folgender Vitaminlösung 2 mg L^{-1} Biotin, 2 mg L^{-1} Folsäure, 5 mg L^{-1} Thiaminhydrochlorid, 5 mg L^{-1} Riboflavin, 10 mg L^{-1} Pyridoxinhydrochlorid, 0,1 mg L^{-1} Cyanocobalamin, 5 mg L^{-1} Nikotinsäure, 5 mg L^{-1} D/L Calciumpantothenat, 5 mg L^{-1} *p*-Aminobenzoessäure und 5 mg L^{-1} Thiocitronensäure. Jeweils 30 mL dieses Kultivierungsmediums wurden in 250 mL Erlenmeyerkolben mit Pilzmyzelium (1 cm \varnothing), das zuvor auf Malzagar kultiviert wurde (s. 2.2.1), angeimpft. Die Kulturen wurden 8 Tage unter statischen Bedingungen bei 26 °C kultiviert, bevor die Laccaseproduktion durch Zugabe von 2,6-Dimethylanilin in einer Endkonzentration von 100 μM induziert wurde [Eggert, Temp *et al.*, 1996]. Einen Tag später wurde das Myzelium durch Filtration abgeerntet, mehrmals mit sterilem Phosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) gewaschen, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Kultivierung von P. chrysosporium unter ligninolytischen Bedingungen

1 L des stickstofflimitierten Kultivierungsmediums bestand aus jeweils 100 mL Basalmedium (10x konz.), 100 mL Glukoselösung (10x konz., 560 mM), 0,5 mL Vitaminlösung, 5 mL Spurenelementlösung und 780 mL 2,2-Dimethylsuccinatpuffer (10 mM, pH 4,5). Das zehnfach konzentrierte Basalmedium bestand aus 2 g L^{-1} KH_2PO_4 , 0,5 g L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g L^{-1} CaCl_2 , 0,5 g L^{-1} NH_4NO_3 und 0,8 g L^{-1} L-Asparagin in 2,2-Dimethylsuccinatpuffer (10 mM; pH 4,5). Die Vitaminlösung bestand pro Liter aus 2 mg Biotin, 2 mg Folsäure, 5 mg Thiamin HCl, 5 mg Riboflavin, 10 mg Pyridoxin, 0,1 mg Cyanocobalmin, 5 mg Nikotinsäure, 5 mg Calciumpantothenat, 5 mg *p*-Aminobenzolsäure und 5 mg α -Liponsäure. Die Spurenelementlösung bestand pro Liter aus 15 g Nitriloacetat, 20 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,4g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,7 g NaCl , 0,7 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,7 g CoSO_4 , 0,7 g CaCl_2 , 0,7 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,07 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,07 g $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$, 0,07 g Borsäure und 0,07 g Natriummolybdat [Kirk, Schultz *et al.*, 1978]. 20 mL des so zusammengesetzten

Kultivierungsmediums wurden in 200 mL Erlenmeyerkolben mit einem Zweihalskolbenaufsatz, welcher an beiden Ausgängen mit Sterilfiltern versehen war, gegeben. Für die LiP-Produktion wurde steril filtrierter Veratrylalkohol in einer Endkonzentration von 0,4 mM als Inducer hinzugegeben. Für die MnP-Produktion wurde MnSO_4 in einer Endkonzentration von 30 mg L^{-1} als Inducer hinzugegeben. Angeimpft wurden die Kulturen mit jeweils 1 mL Konidien suspension, die so mit sterilem dest. Wasser verdünnt wurde, dass die $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 0,5 betrug. Der Pilz wurde bei 37-40 °C unter statischen Bedingungen 5-7 Tage inkubiert und jeden Tag 10-15 min über den Zweihalskolbenaufsatz mit reinem Sauerstoff begast. Nach Erreichen der maximalen Enzymaktivität wurde das Myzel vom Medium abgetrennt und nach mehrmaligem Waschen mit dest. Wasser in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung des Pilzmyzels erfolgte bei -80 °C.

2.2.3 RNA Isolation

Die Gesamt-RNA beider Pilze wurde mithilfe des RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Hierzu wurde das gefrorene Myzel zunächst unter flüssigem Stickstoff gemörsert. 100 g gemörsertes Myzel wurden anschließend nach Anleitung des Kits behandelt, bevor es auftauen konnte. Die Extraktion und die Integrität der RNA wurden durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.4 Amplifikation der Zielensequenzen

Aus der isolierten Gesamt-RNA beider Pilze wurde anschließend lediglich die mRNA in einer Reverse Transkriptase (RT) Reaktion in cDNA transkribiert. Im Falle der LiP und der MnP geschah dies mithilfe des ProtoScript® II RT-PCR Kits (New England BioLabs, Frankfurt a. M.) unter Verwendung der Oligo-dT-Primer (s. 2.1.3). Anschließend wurde das jeweilige Zielgen mit genspezifischen Primern (s. 2.1.3) mittels PCR amplifiziert.

Bei der Amplifikation des Laccasegens musste zuvor die Gesamtsequenz des Gens, ausgehend von einem mit degenerierten Primern bereits amplifizierten Teilfragment, über eine RACE-PCR ermittelt werden. Die RT Reaktion und die RACE-PCR wurden in diesem Fall mit dem GeneRACER™ RLM-Race Kit (Invitrogen, Darmstadt) durchgeführt.

Amplifikation des Laccasegens

Die isolierte Gesamt-RNA des Pilzes wurde zunächst mit Calf Intestinal Phosphatase (CIP) behandelt, um Phosphatreste am 5'-Ende verkürzter mRNAs ohne 5'-Schutzkappe und von nicht-mRNAs abzubauen. Durch diesen Schritt wurden verkürzte mRNAs und andere RNA-Arten eliminiert, da sie an der nachfolgenden Ligation des GeneRacer-RNA-Oligos an freie 5'-Phosphatenden nicht mehr teilnehmen konnten. Anschließend wurde dieses RNA-Gemisch mit Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) behandelt, um die 5'-Schutzkappe intakter mRNAs zu entfernen. Hierdurch entstanden freie 5'-Phosphatenden, die für die Ligation des GeneRacer-RNA-Oligos benötigt wurden. Der GeneRacer-RNA-Oligo (s. 2.1.3) wurde an die so behandelte mRNA ligiert und anschließend unter Verwendung der Superscript III RT und des GeneRacer-Oligo-dTs (s. 2.1.3) in cDNA mit bekannten Primersequenzen am 5'- und 3'-Ende umgeschrieben.

Um bei der folgenden RACE-PCR das 5'-Ende des LAC-Gens zu amplifizieren, wurde der GeneRacer-5'-Primer (s. 2.1.3), der homolog zum GeneRacer-RNA-Oligo ist, als Forwardprimer eingesetzt. Der genspezifische downstream Primer (s. 2.1.3), der auf Basis des bereits mit degenerierten Primern amplifizierten und sequenzierten Teilfragments designiert worden war, wurde als Reverseprimer eingesetzt. Das 3'-Ende des LAC-Gens wurde dagegen mithilfe des genspezifischen upstream Primers, der ebenfalls auf Basis des bereits sequenzierten Teilfragments des Laccasegens designiert worden war, und dem GeneRacer-3'-Primer, der homolog zum GeneRacer-Oligo-dT Primer ist, amplifiziert (s. 2.1.3). Zur Minimierung der Hintergrund-Amplifikation wurde eine Touchdown-PCR (s. Tabelle 2.4) durchgeführt.

Die Größe der so erhaltenen 5'- und 3'-Enden-PCR-Produkte wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft, mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) wurden die PCR-Produkte aus dem Agarosegel aufgereinigt und zur Sequenzierung eingeschickt (Eurofins MWG Operon, Ebersberg).

Tabelle 2.4. Temperaturprogramm der Touchdown-PCR zur Identifizierung der 5'- und 3'-Enden des Laccasegens aus *Cyathus bulleri*.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95	2	1
Denaturierung	95	0,75	5
Annealing	70	0,75	5
Elongation	72	2	5
Denaturierung	95	0,75	5
Annealing	69	0,75	5
Elongation	72	2	5
Denaturierung	95	0,75	20
Annealing	68	0,75	20
Elongation	72	2	20
Finale Elongation	72	8	1

Für die Ermittlung der kompletten Nukleotidsequenz des Laccasegens wurde nachfolgend mit dem 5'-Ende-PCR-Produkt als Template die Primer Walking Technik angewandt. Hierfür wurde der 5'-RACE-genspezifische-Primer (s. 2.1.3) auf der Basis der zuvor erhaltenen Sequenz des 5'-Ende-PCR-Produktes designt und zusammen mit dem GeneRacer-5'-Primer (s. 2.1.3) für die PCR eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde erneut zur Sequenzierung eingeschickt. Für die Überprüfung der Sequenz der 3'-Enden wurde ein weiterer Primer, der 3'-RACE-genspezifische-Primer (s. 2.1.3), komplementär zu dieser neu ermittelten Sequenz entwickelt. Dieser Primer wurde zusammen mit dem GeneRacer-3'-Primer in der PCR eingesetzt. Auch dieses PCR Produkt wurde zur Sequenzierung eingeschickt. Alle beschriebenen Schritte wurden nach Anleitung des Kits durchgeführt. Aus der Summe aller sequenzierten Teilfragmente wurde die vollständige LAC-Sequenz ermittelt.

Für die geplante extrazelluläre Expression der LAC in *P. pastoris* unter Kontrolle des auf dem pPICZ α B-Plasmid integrierten α -Sekretionssignals aus *S. cerevisiae*, wurde anschließend das LAC-Gen ohne natürliches Sekretionssignal des Pilzes amplifiziert. Zur Identifikation des natürlichen Sekretionssignals wurde die „von Heijne Signal Sequence Prediction Methode“ [von Heijne, 1986] angewandt und entsprechende Primer designt (Oligo 1 und 2; s. 2.1.3), die

nur das Laccasegen ohne dessen natürlichem Sekretionssignal amplifizieren und gleichzeitig *SacII* und *PstI* Schnittstellen regenerieren. Die PCR Reaktion wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Tabelle 2.5. Temperaturprogramm der PCR zur Amplifikation des Laccasegens aus *C. bulleri*.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95	2	1
Denaturierung	95	1	29
Annealing	55	1	29
Elongation	72	2	29
Finale Elongation	72	10	1

Amplifikation des LiP bzw. MnP Gens

Für die Amplifikation dieser beiden Gene wurde zunächst die *Taq* Polymerase und anschließend die *Pfu* Polymerase, die über eine Proof Reading Funktion verfügt, verwendet. Da beide Proteine mithilfe der auf dem jeweiligen Plasmid integrierten Sekretionssignale sekretiert werden sollten, wurden die genspezifischen Primer in beiden Fällen so gewählt, dass das Sekretionssignal des Pilzes nicht amplifiziert wurde. Das natürliche Stoppcodon lag dagegen im jeweils amplifizierten Bereich.

Bei der Klonierung der LiP in *P. methanolica* wurden mithilfe des *P. methanolica* genspez. upstream und downstream Primers (s. 2.1.3) die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* an die Genenden kloniert. Bei der Klonierung der LiP in *P. pastoris* wurden dagegen über die *P. pastoris* genspez. upstream bzw. downstream Primer (s. 2.1.3) die Schnittstellen *EcoRI* und *SacII* an die Genenden angefügt. Bei der Klonierung der MnP in *K. lactis* wurden über die verwendeten genspez. upstream bzw. downstream Primer (s. 2.1.3) die Schnittstellen *AscI* und *BglIII* zugefügt. Bei der Amplifikation beider Gene wurden die Primer jeweils in einer Endkonzentration von 0,5 µM eingesetzt. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 2.6 zu sehen.

Tabelle 2.6. Temperaturprogramm der Amplifikation des LiP- und des MnP-Gens aus *P. chrysosporium*.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95	2	1
Denaturierung	94	0,5	30
Annealing	52	0,5	30
Elongation	68	1	30
Finale Elongation	68	10	1

Zur Überprüfung der spezifischen Genamplifikation wurde das jeweilige PCR-Produkt mittels Agarosegelelektrophorese untersucht. Bei erfolgreicher Amplifikation wurde das PCR-Produkt aus dem Agarosegel aufgereinigt und die Korrektheit der Nukleotidsequenz durch Sequenzierung verifiziert.

2.2.5 Klonierung der Zielgene in den Replikationsvektor pCR4-TOPO

Die PCR Produkte aller drei Gene wurden mithilfe des TOPO TA Cloning[®] Kits (Invitrogen) nach Anleitung in den pCR4-TOPO Vektor kloniert. Die rekombinanten pCR4-TOPO Vektoren wurden anschließend gemäß Anleitung in kompetente One Shot[®] *E. coli* TOP10 Zellen (s. 2.1.2) transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Amp-Agarplatten (100 µg Amp mL⁻¹) selektiert. Die entstandenen Kolonien wurden mittels Colony-PCR unter Einsatz der jeweils genspezifischen Primer (s. 2.1.3) auf die Aufnahme rekombinanter Plasmide überprüft. Bei ausgewählten positiven Klonen wurde das Plasmid mithilfe des QIAprep[®] Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) isoliert und zur Sequenzierung eingeschickt. Positive Klone wurden als Glycerolstocks zur Langzeitaufbewahrung angelegt.

2.2.6 Klonierung der Zielgene in die entsprechenden Hefe-Shuttle-Vektoren und deren Transformation in *E. coli* bzw. die entsprechenden Hefeexpressionsstämme

Klonierung des LAC-Gens in pPICZαB und dessen Transformation in E. coli und P. pastoris

Zunächst wurde die Plasmid-DNA aus einem positiven pCR4-TOPO/LAC Klon (s. 2.2.5) isoliert. Anschließend wurden sowohl der Hefe-Shuttle-Vektor pPICZαB (s. 2.1.2) als auch

die isolierte Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *SacII* und *PstI* (s. 2.1.1) nach Anleitung geschnitten. Die Restriktionsreaktionen wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, aufgereinigt und mithilfe der T4 DNA Ligase ligiert. Nach Überprüfung der Ligation mittels Agarosegelelektrophorese wurde der rekombinante pPICZ α B/LAC Vektor nach Anleitung des EasySelect™ *Pichia* Expression Kits (Invitrogen) in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen (s. 2.1.2) transformiert. Die Selektion positiver Klone fand über Low Salt LB Platten (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,0) mit 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zeocin statt. Bei ausgewählten positiven Klonen wurde das Plasmid isoliert und sequenziert, um die Nukleotidsequenz des LAC-Gens und dessen Orientierung im Vektor zu überprüfen. Für die nachfolgende Transformation des pPICZ α B/LAC Vektors in *P. pastoris* X33 Zellen (s. 2.1.2) wurde der Vektor mit *SacI* linearisiert. Gemäß Anleitung des EasySelect™ *Pichia* Expression Kits wurden chemisch kompetente *P. pastoris* X33 Zellen hergestellt. Die Transformation erfolgte ebenfalls nach Protokoll. Als Negativkontrolle wurde neben dem rekombinanten pPICZ α B/LAC Vektors auch ein leerer pPICZ α B Vektor transformiert. Die Selektion der positiven Klone erfolgte über Ausplattieren auf Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (YPD; 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Glukose), das 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zeocin enthält.

Für die Selektion von Hefetransformanten, die aktive Laccase exprimieren, wurde ein Agarplatten-Test auf Minimal Methanol (MM) Platten mit 0,2 mmol L $^{-1}$ ABTS durchgeführt. Die ausgestrichenen Hefen wurden 3 Tage lang bei 30 °C inkubiert und auf die Entwicklung einer grünen Färbung untersucht. *P. pastoris* Zellen, die mit einem leeren pPICZ α B Vektor transformiert wurden, dienten als Negativkontrolle.

Klonierung des LiP-Gens in pMET α A bzw. in pPICZ α A und deren Transformation in E. coli und P. methanolica bzw. P. pastoris

Für die Klonierung des LiP-Gens mit *EcoRI* und *BamHI* Schnittstellen in den Hefe-Shuttle-Vektor pMET α A (s. 2.1.2) wurden sowohl das Genfragment als auch der Vektor mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* (s. 2.1.1) nach Anleitung verdaut. Die Ligation des Gens in den Vektor erfolgte nach Anleitung mithilfe der T4 DNA Ligase (s. 2.1.1). Nach Überprüfung der Ligation mittels Agarosegelelektrophorese erfolgte die Transformation des rekombinanten pMET α A/LiP Plasmids nach Anleitung des *P. methanolica* Expression Kits (Invitrogen) in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α Zellen. Die Selektion positiver Klone

erfolgte über LB-Amp Platten. Um Klone mit dem rekombinanten Plasmid pMET α A/LiP zu selektieren und um die korrekte Nukleotidsequenz des Gens und dessen korrekte Klonierung im Leseraster des Sekretionssignals zu überprüfen, wurde das pMET α A/LiP Plasmid eines ausgewählten Klons zur Sequenzierung eingeschickt. Als Primer wurden dabei der AUG1 Forward Primer, der upstream des α -Faktorsignals ansetzt, und der AUG1 Reverse Primer (s. 2.1.3), der nach der Multiple Cloning Site ansetzt, verwendet.

Das rekombinante Plasmid aus diesem positiv getesteten *E. coli* Klon wurde anschließend isoliert und mithilfe des Restriktionsenzym *AscI* (s. 2.1.1) linearisiert. Die so entstandene Expressionskassette wurde in *P. methanolica* PMAD16 Hefezellen (s. 2.1.2), die zuvor nach Anleitung des EasySelectTM *Pichia* Expression Kits chemisch kompetent gemacht wurden, transformiert. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich ein leerer pMET α A Vektor, der ebenfalls vor der Transformation mit *AscI* linearisiert worden war, in *P. methanolica* Zellen transformiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte über viertägige Inkubation bei 29 °C auf Minimal Dextrose (MD; 1,34% Yeast Nitrogen Base, 4*10⁻⁵% Biotin, 2% Dextrose, 15% Agar) Platten ohne Adeninzugabe. Hefekolonien, die auf diesem Selektionsmedium gewachsen waren, wurden einer Colony-PCR mit den *P. methanolica* genspezifischen Primern (s. 2.1.3) unterzogen. Hierdurch wurde überprüft, ob die Expressionskassette mitsamt des LiP-Gens in das Hefegenom integriert wurde.

Für die Klonierung des LiP-Gens mit *EcoRI* und *SacII* Schnittstellen in den Hefe-Shuttle-Vektor pPICZ α A (s. 2.1.2) wurden sowohl das Genfragment als auch der Vektor mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SacII* (s. 2.1.1) nach Anleitung verdaut, anschließend ligiert und in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Per Colony-PCR mit *P. pastoris* genspezifischen Primern (s. 2.1.3) wurde überprüft, ob die entstandenen Klone ein rekombinantes Plasmid aufgenommen hatten. Zur Überprüfung der Nukleotidsequenz des LiP-Gens und dessen Klonierung innerhalb des Leserasters des α -Faktorsekretionssignals aus *S. cerevisiae* wurde der pPICZ α A/LiP Vektor mit den Primern 5'AOX1, der vor dem Sekretionssignal ansetzt, und 3'AOX1 (s. 2.1.3), der hinter der Multiple Cloning Site ansetzt, zur Sequenzierung eingeschickt.

Aus einem positiv getesteten Klon wurde das pPICZ α A/*LiP* Plasmid isoliert, mit dem Restriktionsenzym *PmeI* (s. 2.1.1) linearisiert und anschließend nach Anleitung in chemisch kompetente *P. pastoris* X33 Zellen transformiert. Als Negativkontrolle wurde ein leerer, linearisierter pPICZ α A Vektor in *P. pastoris* Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte auf YPD Medium, das 100 μ g Zeocin mL⁻¹ enthielt.

Klonierung des MnP-Gens in pKLAC1 und dessen Transformation in E. coli und K. lactis

Das pCR4-TOPO/*MnP* Plasmidkonstrukt und der Hefe-Shuttle-Vektor pKLAC1 wurden mit den Restriktionsenzymen *AscI* und *BglII* geschnitten. Anschließend wurde das MnP-Gen in den Hefevektor ligiert und dieser in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte über Ampicillinresistenz und Colony-PCR mit genspezifischen Primern (s. 2.1.3). Zusätzlich wurde die Nukleotidsequenz des MnP-Gens und dessen korrekte Klonierung in den pKLAC1-Vektor innerhalb des Leserasters des Sekretionssignals durch Sequenzierung mit den Sequenzierungsprimern (s. 2.1.3) überprüft.

Positiv getestete pKLAC1/*MnP* Vektoren wurden isoliert und mit dem Restriktionsenzym *SacII* linearisiert, bevor die so entstandene Expressionskassette nach Anleitung des *K. lactis* Protein Expression Kits (New England BioLabs) in chemisch kompetente *K. lactis* GG799 Zellen (s. 2.1.2) transformiert wurde. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich ein leerer, ebenfalls linearisierter pKLAC1 Vektor in *K. lactis* Zellen transformiert. Als Selektionsmedium diente Yeast Carbon Base Agar (0,03% 1 M Tris/HCl (pH 7,0), 0,0117% Yeast Carbon Base, 0,02% Bacto Agar), der 5 mM Acetamid enthielt. Die transformierten Hefen wurden auf den Selektionsplatten bei 30 °C inkubiert.

2.2.7 Expression der Zielenzyme

Expression der LAC in P. pastoris

Die LAC-Expression wurde in 250 mL Schikanekolben untersucht. Die Hefeklone wurden bei 30 °C und 250 rpm in 50 mL YPD Medium kultiviert bis eine OD₆₀₀ von 2-6 erreicht war. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 2000 g über 5 min geerntet und anschließend in gepuffertem Komplex-Methanol-Medium (1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 100 mM KPO₄-Puffer (pH 6,0), 1,34% Yeast Nitrogen Base, 4*10⁻⁵% Biotin, 0,5% Methanol) auf eine OD₆₀₀

von 1 in 1 L Schikanekolben resuspendiert. Die Kultivierung erfolgte mit einem Füllvolumen von 100 mL bei 30 °C und 250 rpm. Zu den Kulturen wurde täglich 1% (v/v) Methanol hinzugegeben, um die induzierenden Bedingungen für den *AOXI* Promotor aufrecht zu erhalten. Alle 24 Stunden wurde die LAC-Aktivität im extrazellulären Medium gemessen (s. 2.2.8).

Um zu überprüfen, ob durch die Zugabe von Kupfer zum Medium die Expression der LAC in *P. pastoris* gesteigert werden kann, wurde der Hefeklon mit der höchsten Expressionsrate in gepuffertem Komplex-Methanol-Medium inklusive CuSO_4 kultiviert. CuSO_4 wurde dabei in den Konzentrationen 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 und 0,5 mmol L⁻¹ eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte 3 Tage bei 30 °C in 1 L Schikanekolben mit einem Füllvolumen von 100 mL. Die LAC-Aktivität im Medium wurde täglich gemessen (s. 2.2.8).

Expression der LiP in P. methanolica und P. pastoris

Zur Überprüfung der LiP-Expression in *P. methanolica* wurden einzelne positiv getestete Hefeklone in 10-50 mL Buffered Dextrose-complex Medium (BMDY; 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 100 mM KPO_4 -Puffer (pH 6,0), 1,34% Yeast Nitrogen Base, $4 \cdot 10^{-5}$ % Biotin, 2% Dextrose) bei 30 °C und 300 rpm in 250 mL Schikanekolben kultiviert bis eine OD_{600} von 10 erreicht war. Die Kulturen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 g geerntet und in 50 mL Buffered Methanol-complex Medium (BMMY; 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 100 mM KPO_4 -Puffer (pH 6,0), 1,34% Yeast Nitrogen Base, $4 \cdot 10^{-5}$ % Biotin, 0,5% Methanol) resuspendiert, um die Expression zu induzieren. Die Kulturen wurden bei 30 °C in 250 mL Schikanekolben mit einem Füllvolumen von 25 mL bei 300 rpm kultiviert. Um die induzierenden Bedingungen für den Promotor P_{AUG} aufrecht zu erhalten, wurde täglich Methanol in einer Endkonzentration von 0,5% hinzugegeben. Zudem wurde der Kulturüberstand täglich auf LiP-Aktivität hin geprüft (s. 2.2.8).

Neben dem Kulturüberstand wurde auch der Überstand nach Zellaufschluss auf LiP-Aktivität hin untersucht. Hierzu wurde aus den Kulturen täglich ein Aliquot von 1 mL entnommen. Der Zellaufschluss wurde mittels Ultraschall auf Eis durchgeführt. Zusätzlich wurde die Expression mittels SDS-Page-Gelelektrophorese analysiert. Neben den Kulturüberständen der Hefeklone wurde auch der Kulturüberstand der Negativkontrolle *P. methanolica* pMETaA

aufgetragen. Zudem wurden die Überstände der Zellaufschlüsse der Hefeklone aufgetragen (s. 2.2.10).

Zur Überprüfung der LiP-Expression in *P. pastoris* wurden positiv getestete Hefeklone zunächst solange in Buffered Glycerol-complex Medium (BMGY; 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 100 mM KPO₄-Puffer (pH 6,0), 1,34% Yeast Nitrogen Base, 4*10⁻⁵% Biotin, 1% Glycerol) bei 30 °C und 300 rpm kultiviert bis eine OD₆₀₀ von 2 erreicht wurde. Dann wurden die Kulturen abzentrifugiert (2000 g, 5 min) und das Pellet anschließend im Expressionsmedium BMMY so aufgenommen, dass die OD₆₀₀ 1 betrug. Alle Kulturen (25 mL) wurden bei 30 °C und 300 rpm in 250 mL Schikanekolben kultiviert. Jeden Tag wurden 0,5% des Inducers Methanol zugegeben und der Kulturüberstand wurde täglich auf LiP-Aktivität überprüft (s. 2.2.8). Als Negativkontrolle wurde ein X-33 Klon, der mit einem leeren pPICZαA-Plasmid transformiert worden war, mitgeführt.

Neben dem Kulturüberstand wurde auch der Überstand nach Zellaufschluss mittels Ultraschall auf LiP-Aktivität untersucht. Die Kulturüberstände und auch die Zellaufschlüsse der Hefeklone und der Negativkontrollen wurden des Weiteren per SDS-Gel analysiert (s. 2.2.10).

Expression der MnP in K. lactis

Zur Überprüfung der MnP-Expression in *K. lactis* wurden einzelne positiv getestete Hefeklone und die Negativkontrolle zur Induktion des P_{LAC4} Promoters in 25 mL Yeast Peptone Galaktose Flüssigmedium (YPGal; 0,01% Hefeextrakt, 0,02% Pepton, 2% Galaktose) bei 30 °C und 250 rpm in 250 mL Schikanekolben mit einem Füllvolumen von 25 mL kultiviert. Der erste MnP-Aktivitätstest (s. 2.2.8) wurde 2 Tage nach Erreichen einer gesättigten Kultur mit einer OD₆₀₀ von >30 durchgeführt. Von diesem Zeitpunkt an wurde der Kulturüberstand 7 Tage lang täglich auf MnP-Aktivität hin überprüft. Zusätzlich wurde täglich ein Aliquot aus den Kulturen entnommen, um einen Zellaufschluss mittels Ultraschall durchzuführen. Der Überstand des Zellaufschlusses wurde ebenfalls auf MnP-Aktivität überprüft.

Des Weiteren wurde die Expression mittels SDS-Gelelektrophorese (s. 2.2.10) analysiert. Hier wurden sowohl die Kulturüberstände verschiedener Hefeklone und der Negativkontrolle als auch die Überstände des Zellaufschlusses verschiedener Hefeklone und der Negativkontrolle aufgetragen.

In allen Hefeexpressionssystemen wurde der jeweilige Codon Adaptation Index (CAI) mithilfe einer Software der Firma GenScript ermittelt. Ein CAI von 1,0 zeigt eine ideale Übereinstimmung der Codon Usage von Fremdgen und Wirtsorganismus an. Je niedriger der CAI, desto unpassender ist die Codon Usage von Fremdgen und Wirtsorganismus.

2.2.8 Aktivitätstests

Laccaseaktivitätstests

Zur Bestimmung der LAC-Aktivität im Kulturüberstand mit ABTS ($\epsilon_{420\text{nm}} 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) als Substrat wurden 100 μL Kulturüberstand zu 900 μL 100 mM Natriumtartrat Puffer (pH 4,5), der 0,5 mM ABTS enthielt, gegeben und die Änderung der Absorption bei 420 nm und 25 °C über mindestens 5 min unter ständigem Rühren am UV/Vis Photometer verfolgt.

Für die LAC-Charakterisierung wurde derselbe ABTS-Aktivitätstest, allerdings im kleineren Maßstab, in Mikrotiterplatten (Carl Roth, Karlsruhe) angewendet. In der Mikrotiterplatte wurden 180 μL Puffer und 20 μL in dest. Wasser gelöstes Laccaselyophilisat gemischt. Die Absorption wurde im Mikrotiterplattenlesegerät gemessen.

LiP-Aktivitätstest

Zur Ermittlung der LiP-Aktivität im Kulturüberstand wurde die Oxidation von Veratrylalkohol zum entsprechenden Aldehyd genutzt. Die Entstehung des Veratrylaldehyds kann bei 310 nm ($\epsilon_{310\text{nm}} 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) photometrisch verfolgt werden. In einer Küvette aus Quarzglas (Hellma, Müllheim) wurden in der Regel 550 μL abzentrifugierter Kulturüberstand, 442,4 μL 0,1 M Natriumtartratpuffer (pH 3,0) und 2,9 μL Veratrylalkohol (1:10 verdünnt) gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4,7 μL 0,35%iger H_2O_2 -Lösung gestartet. Letztendlich lag Veratrylalkohol in einer Endkonzentration von 2 mM und H_2O_2 in einer Endkonzentration

von 0,54 mM vor. Der Aktivitätstest wurde bei 35 °C unter kontinuierlichem Rühren durchgeführt.

MnP-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der MnP-Aktivität im Kulturüberstand wurde die Oxidation von Mangan(II) zu Mangan (III) ($\epsilon_{270\text{nm}} 11590 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) photometrisch bei 270 nm verfolgt. 200 μL Kulturüberstand wurden hierfür mit 100 μL 20 mM MnCl_2 -Lösung und 690 μL 50 mM Natriummalonatpuffer (pH 4,0) in einer 1 mL Quarzglasküvette gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μL H_2O_2 (20 mM) gestartet und die Absorption unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur über 1 min aufgenommen.

Als Grundlage für die Berechnung der Aktivität aller drei Enzyme dient das Lambert-Beersche-Gesetz:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d ,$$

wobei E = Extinktion der Lösung

ϵ = Extinktionskoeffizient der gemessenen Substanz [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

c = Konzentration der Lösung [mol L^{-1}]

d = Schichtdicke der Küvette [cm] ist.

Damit gilt für die Reaktionsgeschwindigkeit bzw. die Enzymaktivität:

$$\frac{\Delta c}{t} = \frac{\Delta E}{t \cdot d \cdot \epsilon} ,$$

wobei $\Delta E/t$ die Anfangssteigung (m) der Absorptionsänderung ist und die Schichtdicke der verwendeten Küvette immer 1 cm betrug.

Für die Berechnung der volumetrischen Aktivität wurde folgende Formel angewendet:

$$Akt_{vol.} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\Delta E}{\min} * \frac{V_{Ges}}{d \cdot V_{Enzymprobe}} * f,$$

wobei V_{Gesamt} das Gesamtvolumen in der Küvette ist, $V_{Enzymprobe}$ das Volumen der Enzymprobe ist und f der jeweilige Verdünnungsfaktor ist.

2.2.9 Laccasecharakterisierung

Die Charakterisierung der rekombinanten LAC wurde mit partiell aufgereinigter LAC durchgeführt. Hierzu wurde der Kulturüberstand der Kultivierung von transformierter *P. pastoris* in gepuffertem Methanol-Komplex-Medium (s. 2.2.7) auf 1/5 des Ausgangsvolumens mittels Ultrafiltration reduziert. Dieses Konzentrat wurde anschließend einer Gelfiltration (Superdex 75; 30 cm x 1 cm; Pharmacia) mit 100 mM Natriumtartratpuffer (pH 5,0) als mobiler Phase unterzogen. Die Fraktionen, die LAC-Aktivität aufwiesen, wurden gepoolt, gegen dest. Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die Reinheit des Laccaselyophilisats wurde mittels SDS-Gelelektrophorese (s. 2.2.10) überprüft.

Die LAC-Aktivität wurde in der gesamten LAC-Charakterisierung mit dem ABTS-Aktivitätstest (s. 2.2.8) bestimmt. Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde die LAC-Aktivität bei pH-Werten von 2,0; 3,0; 3,2; 3,3; 3,4; 3,5; 3,6; 3,8; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 und 9,0 gemessen. Statt des sonst verwendeten Natriumtartratpuffers wurde für die pH-Werte 2,0-3,3 ein 300 mM Glycin HCl Puffer, für die pH-Werte 3,4-6,0 ein 300 mM Natriumcitratpuffer, für die pH-Werte 7,0-8,0 ein 300 mM Phosphatpuffer und für den pH-Werte 9,0 ein 300 mM TrisHCl Puffer verwendet.

Die pH-Stabilität wurde bei den pH-Werten 2,0; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 und 11,0 untersucht. 500 μ L des in dest. Wasser gelösten Laccaselyophilisats wurden in 1 mL des entsprechenden Puffers gegeben und bei 4 °C gelagert. Für die pH-Werte 2,0-7,0 wurde ein 100 mM Natriumtartratpuffer und für die pH-Werte zwischen 8,0 und 11,0 ein 300 mM TrisHCl Puffer verwendet.

Die Temperaturstabilität wurde bei Temperaturen von 25, 30, 40, 50, 55, 60, 70, 80 und 90 °C gemessen. Das Lyophilisat der LAC wurde in Natriumtartratpuffer (pH 7,0) gelöst und bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

Die Stabilität gegenüber Cl⁻-Ionen wurde gegen folgende Ionenkonz. untersucht: 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400 und 500 mol L⁻¹. Hierzu wurde Laccaselyophilisat in NaCl-Lösungen der jeweiligen Ionenstärke gelöst. Der pH-Wert wurde mit konz. HCl auf 8,0 eingestellt und die Ansätze wurden bei 4 °C gelagert.

Die Stabilität gegenüber wassermischbaren organischen Lösungsmitteln wurde gegen Aceton, DMSO, Ethanol und THF getestet. Das Lyophilisat der LAC wurde in einem Gemisch, das zu 50% (v/v) aus Wasser und zu 50% (v/v) aus dem entsprechenden Lösungsmittel bestand, bei 4 °C inkubiert.

Bei allen Stabilitätsmessungen wurde die Restaktivität unter Standardbedingungen (s. 2.2.8) im Mikrotiterplattenlesegerät ermittelt. Aus der Abnahme der Aktivität über die Zeit wurden, bei Annahme einer Reaktion erster Ordnung, die Inaktivierungskoeffizienten und die daraus resultierenden Halbwertszeiten bestimmt.

2.2.10 Sonstige Methoden

Agarosegelelektrophorese

Für die Herstellung der Agarosegele wurden in der Regel 1,2% Agarose in Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer gelöst und mit 3 µL Ethidiumbromidstammlösung (10 mg ml⁻¹) je 100 mL versetzt. Das Gel wurde mit 5-25 µL Probe, welche mit 20% (v/v) Loading Dye versehen wurde und 5 µL des entsprechenden Markers beladen. RNA-Proben wurden über Agarosegele, welche mit RNase freiem Puffer hergestellt wurden, analysiert. Die Laufzeit betrug zwischen 30 und 45 min bei 90 V. Die Banden wurden abschließend in der Geldokumentation fotografiert.

*SDS-PAGE Gelelektrophorese***Tabelle 2.7.** Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-Page Gelelektrophorese.

Reagenz	V im Sammelgel [mL]	V im Trenngel [mL]
Acrylamidmix 40%	0,75	2,250
1,5 M Tris/HCl Puffer pH 8,8		1,875
1 M Tris/HCl Puffer pH 6,8	0,75	
dest. Wasser	4,35	3,225
10% (w/v) SDS	0,06	0,75
10% (w/v) APS	0,06	0,75
TEMED	0,006	0,003

Die Proben wurden mit einem Ultrafiltrationsgefäß Vivaspin 500 (s. 2.1.3) aufkonzentriert, 1:1 mit dem Probenpuffer Roti[®]-Load1 (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt und bei 95 °C 5 min denaturiert. Anschließend wurden 10-25 µL in die Probetaschen des Gels aufgetragen. Die Laufzeit betrug 1,5 h bei 180 V. Das Gel wurde anschließend mit dest. Wasser gespült und über Nacht in PageBlue Protein Staining Solution eingelegt. Anschließend wurde der Farbstoff mit dest. Wasser entfernt und die Banden in der Geldokumentation fotografiert.

Bradfordtest

Proteinkonzentrationen wurden durch die Reaktion mit Coomassie Brilliant Blue spektrophotometrisch quantifiziert. Die Kalibrierung erfolgte unter Verwendung von Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 5-25 µg mL⁻¹. Jeweils 800 µL der entsprechenden Proben wurden mit 200 µL Bradfordreagenz versetzt und nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur bei 595 nm vermessen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Expression der Laccase aus *Cyathus bulleri* in *Pichia pastoris*

Obwohl die sehr reaktive und scheinbar sehr stabile LAC aus dem Weißfäulepilz *C. bulleri* eine äußerst erfolgversprechende LAC ist [Wicklow, Langie *et al.*, 1984; Vasdev, Dhawan *et al.*, 2005; Salony, Mishra *et al.*, 2006; Chhabra, Mishra *et al.*, 2008], ist die industrielle Anwendung dieses Biokatalysators aufgrund der zeitintensiven homologen Produktion limitiert. Bei der homologen LAC-Produktion wird der Pilz *C. bulleri* 7-8 Tage kultiviert, bevor die Kulturen geerntet und die LAC isoliert wird. Abhängig vom verwendeten Inducer, der verwendeten C- und N-Quelle und dem C/N Quotienten im Medium werden LAC-Aktivitäten zwischen 1,35 und maximal 98 U mL⁻¹ erzielt [Vasdev, Kuhad, 1994; Salony, Mishra *et al.*, 2006]. Zudem wächst *C. bulleri* vornehmlich in statischen Kulturen [Vasdev, Kuhad, 1994]. Eine Kultivierung ist somit fast ausschließlich in Emersverfahren, die generell eine schlechte Raum-Zeit-Ausbeute bieten, möglich. Des Weiteren produziert der Pilz Pigmente, die eine Aufreinigung der LAC erschweren [Vasdev, Dhawan *et al.*, 2005; Salony, Mishra *et al.*, 2006]. Aus diesen Gründen war es Ziel die LAC-Produktion durch heterologe Expression zu vereinfachen.

Da die vollständige Nukleotidsequenz der LAC aus *C. bulleri* bisher nicht bekannt war, musste diese vor der Klonierung des LAC-Gens in einen geeigneten Expressionsorganismus zunächst ermittelt werden. Da der natürliche Wirt *C. bulleri* ein eukaryotischer Weißfäulepilz ist, ist es sinnvoll ein ebenfalls eukaryotisches Expressionssystem zu benutzen. Hierdurch sollten posttranslationale Modifikationen gewährleistet werden. Die Wahl fiel auf das Hefeexpressionssystem *Pichia pastoris*, da diese Hefe gut charakterisiert und auch im größeren Maßstab leicht zu kultivieren ist. Zudem wurden weitere Laccasen, wie z. B. die LAC aus *Trametes versicolor* bereits sehr erfolgreich in *P. pastoris* exprimiert [Hong, Meinander *et al.*, 2002]. Im Anschluss an die heterologe Expression wurde die rekombinante LAC charakterisiert.

3.1.1 Ermittlung der Laccasesequenz

Die Laccaseregionen, die an der Bindung von Kupferionen beteiligt sind, sind bei allen Laccasen aus Pilzen stark konserviert. Daher konnten auf Basis dieser großen Sequenzhomologien degenerierte Primer für die LAC aus *C. bulleri* designt werden. Unter Verwendung der degenerierten Primer gelang die Amplifikation eines 435 bp großen Laccaseteilfragments [Salony, Mishra *et al.*, 2006]. Ausgehend von diesem sequenzierten Teilfragment wurde in der vorliegenden Arbeit mithilfe der RACE-PCR-Technik die vollständige Laccasenukleotidsequenz aufgeklärt.

Da der Weißfäulepilz *C. bulleri* zu den Eukaryoten gehört, befinden sich nicht codierende DNA-Abschnitte, die sogenannten Introns, innerhalb der Laccasegenesequenz. Die Introns werden zwar transkribiert, anschließend jedoch aus der prä-mRNA herausgespleißt bevor diese zur Translation aus dem Zellkern herausgeschleust wird. Aufgrund dessen wurde die Laccasesequenz ausgehend von der gespleißten mRNA ermittelt. Hierzu wurde zunächst die Gesamt-RNA aus *C. bulleri* isoliert (s. 2.2.3) und der Erfolg der Isolation mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.10) überprüft. Hierbei wurden zwei diskrete Banden, die der 28s und 18s rRNA entsprechen und die Integrität der RNA bestätigen, sichtbar.

Da für die Sequenzanalyse der LAC ausschließlich intakte mRNA in cDNA transkribiert werden sollte, wurde die isolierte Gesamt-RNA des Pilzes zunächst mit Calf Intestinal Phosphatase (CIP) behandelt. Die CIP baut frei liegende Phosphatreste am 5'-Ende ab, wie sie zum Einen bei verkürzten mRNAs ohne 5'-Schutzkappe und zum Anderen bei allen anderen RNA-Arten, die keine 5'-Schutzkappe tragen, vorkommen. Somit wurden verkürzte mRNAs und andere RNA-Arten eliminiert, da sie an der später folgenden Ligation des GeneRacer-RNA-Oligos an freie 5'-Phosphatenden nicht teilnehmen konnten. Die durch die CIP dephosphorylierte RNA wurde anschließend mit Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) behandelt, um die 5'-Schutzkappe intakter mRNAs zu entfernen. Hierdurch entstanden freie 5'-Phosphatenden, die für die Ligation des GeneRacer-RNA-Oligos benötigt wurden. Der GeneRacer-RNA-Oligo (s. 2.1.3) wurde an die so behandelte mRNA ligiert und diese anschließend in einer Reverse Transkriptase (RT) Reaktion unter Verwendung des

GeneRacer-Oligo-dTs (s. 2.1.3) in cDNA mit bekannten Primersequenzen am 5'- und 3'-Ende transkribiert.

Für die Amplifikation des 5'-Ende des LAC-Gens wurde in der folgenden RACE-PCR der GeneRacer-5'-Primer (s. 2.1.3), der homolog zum GeneRacer-RNA-Oligo ist, als Forwardprimer eingesetzt. Als Reverseprimer wurde der genspezifische downstream Primer (s. 2.1.3), der auf Basis des bereits mit degenerierten Primern amplifizierten und sequenzierten Teilfragments designt worden war, verwendet. Für die Amplifikation des 3'-Ende des LAC-Gens wurde der genspezifische upstream Primer (s. 2.1.3), der ebenfalls auf Basis des bereits sequenzierten Teilfragments des LAC-Gens designt worden war, benutzt. Als zweiter Primer diente der GeneRacer-3'-Primer, der homolog zum GeneRacer-Oligo-dT Primer ist (s. 2.1.3). Als 5'-RACE-PCR-Produkt wurde ein ca. 900 bp großes, als 3'-RACE-PCR-Produkt ein ca. 500 bp großes Fragment vervielfältigt. Beide PCR-Produkte wurden sequenziert und mit bereits veröffentlichten Laccasesequenzen mithilfe der Software BLASTN verglichen. Hohe Homologien zu anderen Laccasen bestätigten, dass es sich bei den amplifizierten Teilfragmenten tatsächlich um die Sequenz einer LAC handelt.

Ausgehend von diesen beiden sequenzierten Teilfragmenten wurden nun erneut genspezifische Primer designt, um mithilfe der Primer Walking Technik weitere Teilfragmente des Gens zu amplifizieren und zu sequenzieren (s. 2.2.4). Aus der Summe aller sequenzierten Teilfragmente wurde letztendlich die vollständige Basenfolge der LAC aus *C. bulleri* zusammengesetzt (s. Anhang, Abb. 4.1) und unter der Nummer EU195884 in Gendatenbanken veröffentlicht.

3.1.2 Klonierung des Laccasegens

Für die geplante Expression der LAC in *P. pastoris* wurde nun das vollständig sequenzierte LAC-Gen ohne natürliches Sekretionssignal des Pilzes amplifiziert (s. 2.2.4). Für die Identifikation des natürlichen Sekretionssignals wurde die „von Heijne Signal Sequence Prediction Methode“ [von Heijne, 1986] angewandt und entsprechende Primer designt (Oligo 1 und 2; s. 2.1.3). Gemäß den Erwartungen wurde in der PCR ein 1,49 kb großes DNA-Fragment amplifiziert, welches zur Replikation in einen pCR4-TOPO Vektor kloniert und in

kompetente Top10 *E. coli* Zellen transformiert wurde (s. 2.2.5). Ausgewählte Klone, die auf dem LB-Amp-Selektionsagar gewachsen waren, wurden mittels Colony-PCR unter Verwendung von LAC-genspezifischen Primern analysiert (s. 2.2.5). Die Amplifikation des 1,49 kb großen LAC-Gens bestätigte die erfolgreiche Transformation des rekombinanten Plasmidkonstruktes.

Anschließend wurde das amplifizierte LAC-Gen unter Kontrolle des starken, durch Methanol induzierbaren P_{AOXI} Promoter in den Hefe-Shuttle-Vektor pPICZ α B (s. Anhang, Abb. 4.2) kloniert. Der ausgewählte Expressionsvektor pPICZ α B ermöglicht die extrazelluläre Expression des Proteins, da das Gen im Leserahmen des *Saccharomyces cerevisiae* α -Faktorsekretionssignals kloniert wurde. Zur Vervielfältigung wurde das rekombinante Plasmid zunächst in *E. coli* DH5 α Zellen und erst anschließend in *P. pastoris* X33 Zellen transformiert (s. 2.2.6). Die Selektion positiver Klone erfolgte jeweils über die durch den Hefe-Shuttle-Vektor vermittelte Zeocinresistenz.

Vor der Transformation des pPICZ α B/LAC wurde dieser sequenziert. Die Nukleotidsequenz des LAC-Gens entsprach der ermittelten Nukleotidsequenz und das Gen befand sich im Leserahmen des Sekretionssignals. Nach der Transformation wurde mittels Colony-PCR unter Verwendung von LAC-genspezifischen Primern (s. 2.2.6) untersucht, ob die Hefeklone ein rekombinantes pPICZ α B/LAC Plasmid aufgenommen hatten. Dies wurde durch die Amplifikation des 1,49 kb großen LAC-PCR-Produktes bewiesen.

3.1.3 Expression der Laccase in *Pichia pastoris*

Die in der Colony-PCR positiv getesteten Hefeklone wurden auf Minimalmethanol (MM) Agarplatten, die das LAC-Substrat ABTS enthielten, ausgestrichen (s. 2.2.6). Als Negativkontrolle wurden *P. pastoris* Zellen, die mit einem leeren pPICZ α B Vektor transformiert wurden, mitgeführt. Nach 2 Tagen Inkubation hatte sich das Medium um alle Kolonien der Klone herum grünlich verfärbt, wohingegen um die Kolonien der Negativkontrollen keine grüne Verfärbung beobachtet wurde. Die grünliche Färbung war ein Indiz für LAC-Aktivität, da oxidiertes ABTS grün wird.

Einige dieser Hefeklone wurden nachfolgend in geschüttelten Flüssigkulturen in Komplex-Methanol Medium auf LAC-Produktion hin untersucht (s. 2.2.7). Durch tägliche Zugabe von Methanol wurden die induzierenden Bedingungen für den P_{AOXI} Promotor aufrecht erhalten. Um eine möglichst optimale Sauerstoffversorgung zu garantieren, wurde die Hefe in Schikanekolben mit einem Füllvolumen von 10% kultiviert. Der Verlauf der optischen Dichte (OD), der volumetrischen LAC-Aktivität und der Gesamtproteinkonzentration im Expressionsmedium während der Kultivierung des Klons mit der maximalen LAC-Aktivität ist in Abbildung 3.1 gezeigt.

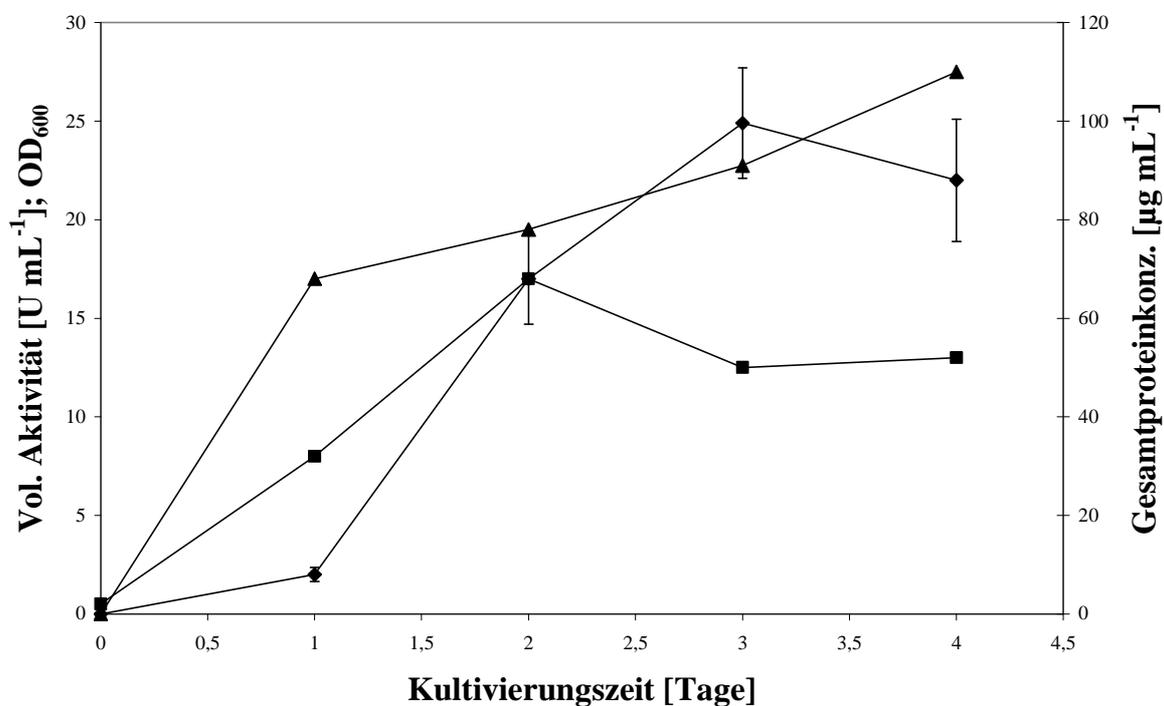


Abbildung 3.1. Verlauf der volumetrischen Laccaseaktivität, der optischen Dichte (OD) und der Gesamtproteinkonzentration im Medium während der heterologen Expression der Laccase aus *Cyathus bulleri* in *P. pastoris*. Der Hefeklon wurde in 100 mL gepuffertem Komplex-Methanol Medium (pH 6,0) in 1L Schikanekolben bei 30 °C und 250 rpm kultiviert. OD₆₀₀ (Quadrate), volumetrische Laccaseaktivität (Rauten), Gesamtproteinkonzentration (Dreiecke).

Am dritten Tag der Kultivierung wurde eine maximale volumetrische LAC-Aktivität von $25 \pm 2,8 \text{ U mL}^{-1}$ gemessen. Die maximale Zelldichte wurde am zweiten Tag mit einem OD₆₀₀-Wert von ~ 17 erreicht und fiel danach langsam ab. Die maximale Gesamtproteinkonzentration betrug 110 mg L^{-1} . Der erzielte Proteingehalt liegt damit sogar leicht überhalb der erzielten Proteingehalte der beiden bisher erfolgreichsten Laccase Expressionssysteme. Bei der Expression einer Laccase aus *Coprinus cinereus* in *Aspergillus oryzae* [Yaver,

Overjero *et al.*, 1999] und einer Laccase aus *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris* [Hong, Meinander *et al.*, 2002] wurden in beiden Fällen Proteinkonzentrationen von bis zu 100 mg L⁻¹ detektiert.

Die Aktivität heterolog exprimierter Laccasen kann oftmals durch die Zugabe von Kupferionen, die im aktiven Zentrum der Laccasen gebunden sind und für deren Aktivität essentiell sind, zum Expressionsmedium gesteigert werden [Guo, Lu *et al.*, 2005]. Auch im vorliegenden Fall konnte die vol. LAC-Aktivität von 25 U mL⁻¹ durch Zugabe von Kupfersulfat (0 mM; 0,1 mM; 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM) weiter gesteigert werden, wobei die optimale Kupfersulfatkonzentration zwischen 0,3 und 0,4 mmol L⁻¹ lag. Bei Kupfersulfatkonzentrationen in diesem Bereich wurde am dritten Tag der Kultivierung mit 125±20 U mL⁻¹ die höchste vol. LAC-Aktivität ermittelt. Eine weitere Erhöhung der Kupfersulfatkonzentration führte dagegen nicht zu einer weiteren Aktivitätssteigerung, sondern gegenteilig zu einem Abfall der LAC-Aktivität.

Zusammenfassend wurde die Bereitstellung der LAC aus dem Pilz *C. bulleri* durch die heterologe Expression im Hefeexpressionssystem *P. pastoris* stark vereinfacht. Bei der homologen Produktion beträgt die Kultivierungszeit des Pilzes 7-8 Tage und es konnte bisher beim Einsatz kostengünstiger C-Quellen wie Glukose eine maximale vol. Aktivität von 85 U mL⁻¹ erzielt werden [Salony, Mishra *et al.*, 2006]. Bei der heterologen Expression in *P. pastoris* beträgt die Kultivierungszeit dagegen nur 3 Tage und unter Zugabe von Kupfersulfat wird eine deutlich höhere maximale vol. Aktivität von 125±20 U mL⁻¹ detektiert. Die maximale vol. LAC-Aktivität liegt damit sogar leicht oberhalb der vol. Aktivitäten (50-100 U mL⁻¹) ebenfalls rekombinant in *P. pastoris* exprimierter Laccasen aus *Trametes* sp. AH28-2 [Hong, Xiao *et al.*, 2006] und *Fome lignosus* [Liu, Chao *et al.*, 2003].

3.1.4 Charakterisierung der rekombinanten Laccase

Bei der Charakterisierung der rekombinanten LAC stand neben dem pH-Optimum und der Temperatur- und pH-Stabilität der Einfluss von Haliden und organischen Lösungsmitteln auf das Enzym im Vordergrund. Die Stabilität gegen diese beiden Parameter ist für mögliche

industrielle Anwendungen der LAC von großer Bedeutung [Couto, Toca-Herrera, 2006; Singh, Sharma *et al.*, 2009].

Für die Charakterisierung der rekombinanten LAC wurde diese partiell aufgereinigt. Hierzu wurde der Kulturüberstand der Hefen nach erfolgreicher Expression auf 1/5 des Ausgangsvolumens konzentriert. Dieses Konzentrat wurde anschließend einer Größenausschlussgelfiltration unterzogen und lyophilisiert (s. 2.2.9). In dem Lyophilisat wurde ein Aufreinigungsfaktor von 2,6 und eine spezifische Aktivität von 5340 mU mg⁻¹ erreicht. Nach der Gelfiltration betrug die Ausbeute noch 25%. Die nachfolgende Lyophilisation führte jedoch zu hohen Verlusten, so dass lediglich eine Endausbeute von 3% gelang. Dennoch wurde die Aufreinigung nicht weiter optimiert, da dies nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war. Die Reinheit des Laccaselyophilisats wurde mittels SDS-Gelelektrophorese überprüft (s. Abb. 3.2). Die Fraktionen mit LAC-Aktivität enthielten kaum weitere Proteine, so dass diese partielle Aufreinigung für die Charakterisierung der rekombinanten LAC als ausreichend befunden wurde.

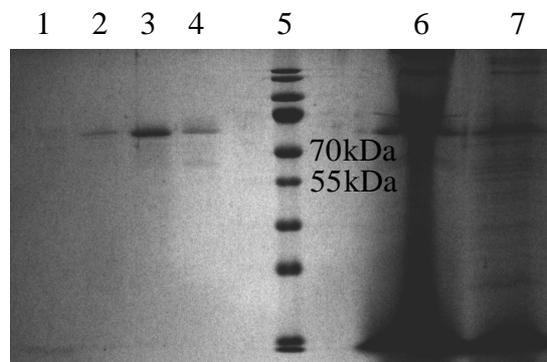


Abbildung 3.2. SDS-Gelelektrophorese der über Gelfiltration partiell aufgereinigten rekombinanten Laccase. Reihe 1: Fraktion, die keine Laccaseaktivität zeigt; Reihe 2-4: Fraktionen, die Laccaseaktivität zeigen; Reihe 5: Proteinmarker; Reihe 6: Ultrafiltrat des Kulturüberstandes; Reihe 7: Kulturüberstand.

Die SDS-Gelelektrophorese zeigte zudem, dass die rekombinante LAC ein MG von ca. 60±5 kDa aufweist. Dies stimmt mit den Angaben von Vasdev und Mitarbeitern [2005] überein, die für die native LAC aus *C. bulleri* ebenfalls ein MG von 60±1 kDa ermittelten. Salony und Mitarbeiter [2006] publizierten dagegen für die native LAC ein etwas geringeres MG von 58±5 kDa [Salony, Mishra *et al.*, 2006]. Vasdev und Mitarbeiter bestimmten die Größe der nativen LAC nach Aufreinigung des Proteins über eine SDS-PAGE

Gelelektrophorese anhand eines Vergleichs mit Proteinmarkern. Salony und Mitarbeiter schätzten das MG der aufgereinigten nativen LAC über eine Gelfiltrationssäule (1×30 cm, Sephacryl S-200, superfine) ab. Durch die Ungenauigkeiten der Abschätzung sind die geringen Unterschiede in den angegebenen Proteingrößen sehr wahrscheinlich zu erklären. Fest steht jedoch, dass das MG der nativen und der rekombinanten LAC nahezu identisch ist. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die rekombinante LAC aus *C. bulleri* im Gegensatz zu vielen anderen bisher in *P. pastoris* exprimierten Laccasen nicht hyperglykosiliert wird [Otterbein, Record *et al.*, 2000; Colao, Lupino *et al.*, 2006; Li, Hong *et al.*, 2007; Lu, Zhao *et al.*, 2009].

Die rekombinante LAC wurde im Folgenden sowohl bezüglich ihres pH-Optimums als auch auf ihre pH- und thermische Stabilität untersucht. Die ermittelten Werte wurden mit den Werten der nativen LAC verglichen.

pH-Optimum und pH- und Temperaturstabilität

Zur Bestimmung des pH-Optimums der rekombinanten LAC wurde die LAC-Aktivität bei pH-Werten von 2,0-9,0 gemessen (s. 2.2.9). Um das pH-Optimum der rekombinanten LAC mit dem der nativen LAC vergleichen zu können, wurde dieses analog zu Salony und Mitarbeitern [2006] bestimmt. Als Substrat wurde dementsprechend ABTS verwendet. Auch die von Salony *et al.* [2006] für den jeweiligen pH-Bereich eingesetzten Puffer wurden analog in dieser Arbeit verwendet. So wurde für den pH-Bereich von 2,0-3,3 ein GlycinHCl Puffer, für den pH-Bereich von 3,4-6,0 ein Natriumcitratpuffer, für den pH-Bereich von 7,0-8,0 ein Phosphatpuffer und für den pH-Wert 9,0 ein TrisHCl Puffer eingesetzt. Lediglich die Temperatur bei der der Aktivitätstest durchgeführt wurde, unterschied sich mit 25 °C von der bei Salony *et al.* [2006] bei 30 °C, eingestellten Temperatur. Es ist jedoch nicht zu erwarten, dass dieser geringfügige Temperaturunterschied das pH-Optimum der LAC beeinflusst.

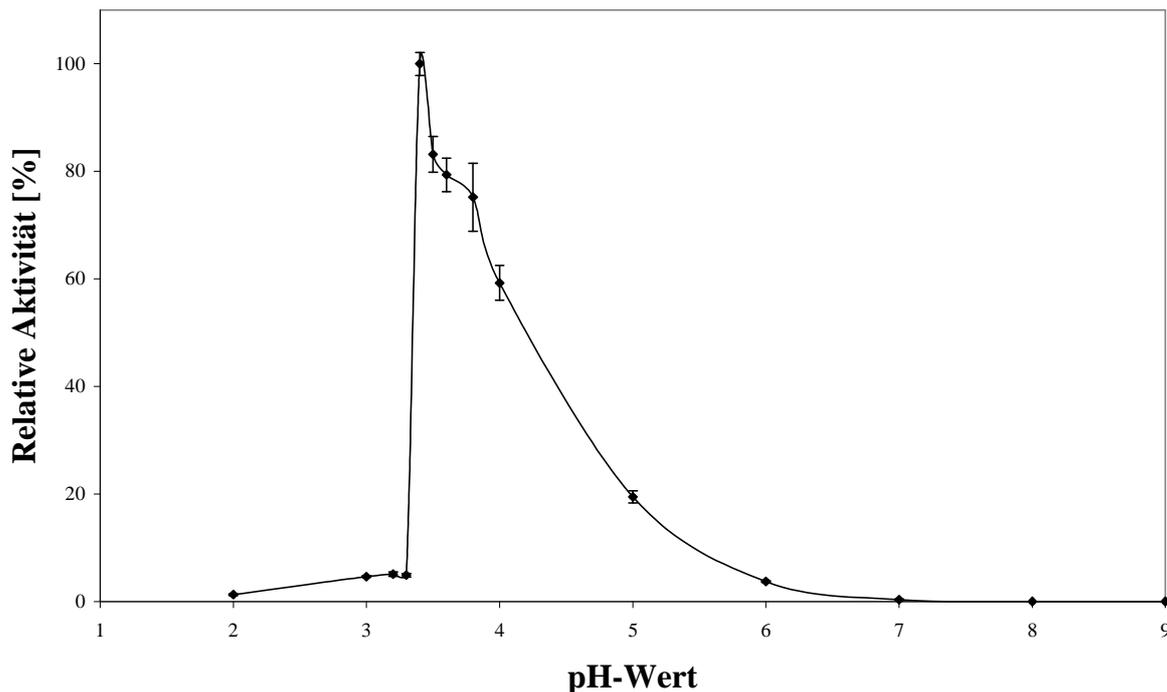


Abbildung 3.3. pH-Optimumskurve der rekombinant in *P. pastoris* exprimierten Laccase aus *C. bulleri*.

Als Substrat für den Aktivitätstest diente ABTS. Die Reaktionstemperatur betrug 25 °C. Folgende pH-Werte wurden untersucht: 2,0; 3,0; 3,2; 3,3; 3,4; 3,5; 3,6; 3,8; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 und 9,0. Für den pH-Bereich zwischen 2,0 und 3,3 wurde ein 300 mM GlycinHCl Puffer, für den pH-Bereich von 3,4-6,0 ein 300 mM Natriumcitratpuffer, für den pH-Bereich von 7,0-8,0 ein 300 mM Phosphatpuffer und für den pH-Wert von 9,0 ein 300 mM TrisHCl Puffer verwendet.

Als pH-Optimum wurde für die rekombinante LAC ein pH-Wert von 3,4 ermittelt (s. Abb. 3.3). Bei Betrachtung der ermittelten pH-Optimumskurve fällt jedoch auf, dass diese keine typische pH-Optimumsglockenkurve zeigt. Das gemessene pH-Profil der rekombinanten LAC weist deutliche Unstetigkeiten auf. So fällt z. B. der plötzliche und sehr rasante Aktivitätsanstieg zwischen pH 3,3 und pH 3,4 ins Auge. Hierbei muss beachtet werden, dass wie bereits erwähnt analog zu Salony *et al.* [2006] für verschiedene pH-Bereiche sehr unterschiedliche Puffersysteme verwendet wurden. Es ist gut denkbar, dass die verschiedenen Ionen der verwendeten Puffer sehr unterschiedlich mit der LAC interagieren. Es ist nicht auszuschließen, dass die verwendeten Ionen teilweise inhibierend auf die LAC wirken. Auch eine unterschiedlich starke Inhibierung der LAC ist anzunehmen. Aufgrund dessen ist das in Abb. 3.3 dargestellte pH-Profil der rekombinanten LAC mit Vorsicht zu interpretieren. Ob das von Salony und Mitarbeitern [2006] ermittelte pH-Profil der nativen LAC ähnliche Unstetigkeiten aufwies ist nicht bekannt, da lediglich das pH-Optimum ohne Abbildung der pH-Optimumskurve publiziert wurde. Da das pH-Optimum der nativen LAC jedoch unter

denselben Bedingungen gemessen wurde [Salony, Mishra *et al.*, 2006], kann als gesichert angesehen werden, dass das pH-Optimum der rekombinanten LAC mit 3,4 geringfügig vom pH-Optimum der nativen LAC, welches zwischen 3,5-4,0 liegt, abweicht. Auch Hong und Mitarbeiter [2006] beobachteten bei der Expression einer LAC aus *Trametes* sp. AH28-2 in *P. pastoris* eine leichte Verschiebung des pH-Optimums. Die rekombinante LAC aus *Trametes* sp. AH28-2 hatte im Vergleich zur nativen LAC ebenfalls ein niedrigeres pH-Optimum. Im Fall der rekombinanten LAC aus *C. bulleri* könnten vier zusätzliche Aminosäurereste (Glutamat, Alanin, Glutamat, Alanin), die aufgrund der Verwendung des α -Faktorsekretionssignals aus *S. cerevisiae* an den N-Terminus des rekombinanten Enzyms gehangen wurden, die Ursache für die Verschiebung des pH-Optimums sein. Auch posttranslationale Modifikationen, wie vor allem das Glykosilierungsmuster und die Proteinfaltung, sind bei filamentösen Pilzen und *P. pastoris* leicht unterschiedlich [Han, Lei, 1999] und können den enzymatischen Charakter verändern. So beobachteten Li und Mitarbeiter [2007] bei der Expression der Laccase B aus *Trametes* sp. in *P. pastoris* sogar ein verändertes pH-Optimum und eine signifikant unterschiedliche pH- und thermische Stabilität von nativem und rekombinantem Enzym.

Die pH-Stabilität der rekombinanten LAC wurde bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C in einem pH-Bereich zwischen 2,0 und 11,0 ermittelt (s. 2.2.9). Tabelle 3.1 listet die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) auf, die aus der Aktivitätsabnahme über die Zeit bei Annahme einer Reaktion erster Ordnung ermittelt wurden.

Tabelle 3.1. Halbwertszeiten der in *P. pastoris* rekombinant produzierten Laccase aus *C. bulleri*. Das Lyophilisat wurde in verschiedenen Puffern bei pH-Werten von 2,0-11,0 gelöst und bei 4 °C gelagert. Für den pH-Bereich von 2,0-7,0 wurde ein Natriumtartratpuffer, im pH-Bereich zwischen 8,0 und 11,0 ein TrisHCl Puffer verwendet. Die Restaktivität wurde mit ABTS als Substrat gemessen.

pH-Wert	Halbwertszeit $t_{1/2}$ [h]
2,0	2,7
3,0	11,5
4,0	34,6
5,0	69,3
6,0	99,0
7,0	99,0
8,0	173,0
9,0	139,0
10,0	34,6
11,0	3,5

Die rekombinante LAC ist bei einem pH-Wert von 8,0 mit einer Halbwertszeit von 173 h am stabilsten. Generell ist die rekombinante LAC in einem pH-Bereich von 6,0-9,0 mit Halbwertszeiten zwischen 99-173 h sehr stabil. Auch im sauren pH-Bereich kann die LAC mit einer Halbwertszeit von immerhin 34,6 h bei pH 4,0 noch als stabil bezeichnet werden. Allerdings muss bei den hier getroffenen Angaben zur pH-Stabilität der rekombinanten LAC beachtet werden, dass bei den Messungen zwei verschiedene Puffersysteme eingesetzt wurden. Im pH-Bereich zwischen 2,0 und 7,0 wurde ein Natriumtartratpuffer, im pH-Bereich zwischen 8,0 und 11,0 ein TrisHCl Puffer verwendet. Wie bereits beim pH-Optimum diskutiert, sind auch bei der Messung der pH-Stabilität unterschiedliche Wirkungen der Tartrat-Ionen und der Tris- bzw. Cl⁻-Ionen auf die LAC nicht auszuschließen. Auch hier sind unterschiedlich starke Inhibierungseinflüsse denkbar. Zudem könnte es gerade beim Einsatz des TrisHCl Puffers zu einer Temperatur-abhängigen Verschiebung des eingestellten pH-Wertes gekommen sein. Zumindest kann jedoch die Aussage getroffen werden, dass sich die ermittelte pH-Stabilität der rekombinant produzierten LAC mit den Angaben der pH-Stabilität der nativen LAC deckt. Diese wurde ebenfalls im pH-Bereich von 3,5 bis 9,0, allerdings ohne nähere Angaben der verwendeten Puffer und der gemessenen Halbwertszeiten, als stabil beschrieben [Salony, Mishra *et al.*, 2006].

Die pH-Stabilität der rekombinanten LAC aus *C. bulleri* ist damit niedriger als die sehr hohe pH-Stabilität der LAC aus dem Weißfäulepilz *Panus tigrinus*, die bei pH-Werten zwischen 3,0 und 5,0 Halbwertszeiten von 131-372 h und bei pH 6,0 eine Halbwertszeit von 632 h

aufweist [Quarantino, Federici *et al.*, 2007]. Im Vergleich zu vielen anderen Laccasen aus Weißfäulepilzen ist die pH-Stabilität der rekombinanten LAC aus *C. bulleri* jedoch zufriedenstellend. So ist die LAC aus *Coriolus versicolor* z. B. lediglich in einem engen Bereich zwischen pH 7,0-8,0 stabil [Sugiura, Sakaino *et al.*, 1987]. Auch die LAC aus *Perenniporia tephropora* ist erst ab einem alkalischen pH-Wert von 8,0 stabil [Ben Younes, Mechichi *et al.*, 2007]. Die LAC aus *Trametes versicolor* ist dagegen lediglich im sauren pH-Bereich zwischen pH 2,5-4,0 stabil [Han, Choi *et al.*, 2005]. Die pH-Stabilität der LAC aus *C. bulleri* ist mit der pH-Stabilität der LAC aus *Coriolus hirsutus*, die ebenfalls die höchste Stabilität im pH-Bereich zwischen 6,0 und 9,0 aufweist, vergleichbar [Kojima, Tsukuda *et al.*, 1990]. Es sei abschließend jedoch nochmals darauf hingewiesen, dass sich die pH-Stabilitäten verschiedener Laccasen aufgrund unterschiedlicher Messbedingungen nur bedingt miteinander vergleichen lassen. Es können lediglich Tendenzen festgehalten werden.

Die Temperaturstabilität der rekombinanten LAC wurde bei Temperaturen zwischen 25-80 °C gemessen. Das Lyophilisat der LAC wurde hierfür in Puffer (pH 7,0) gelöst und anschließend bei den angegebenen Temperaturen inkubiert (s. 2.2.9). Da die LAC bei einem pH-Wert von 7,0 mit 99 h eine sehr hohe Halbwertszeit hat (s. Tabelle 3.1), ist davon auszugehen, dass der inaktivierende Effekt der Temperatur für die Aktivitätsverluste ausschlaggebend ist. Allerdings ist auch hier eine Temperatur-bedingte pH-Wert Verschiebung nicht auszuschließen. Die gemessenen Halbwertszeiten der rekombinanten LAC werden in Tabelle 3.2 mit den jeweiligen Werten der nativen LAC, die von Salony übernommen wurden [Salony, Mishra *et al.*, 2006], verglichen.

Tabelle 3.2. Vergleich der Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der in *P. pastoris* rekombinant exprimierten und der nativen Laccase aus *C. bulleri* bei Temperaturen zwischen 25 und 80 °C. Die Werte der nativen Laccase wurden von Salony, Mishra *et al.* [2006] übernommen, die die Temperaturstabilität anhand des Guaiacol-Aktivitätstests in Citrat Puffer bei pH 5 ermittelten. Das Lyophilisat der rekombinanten Laccase wurde dagegen in Na-Tartrat Puffer (pH 7,0) gelöst und bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Die Restaktivität wurde mit ABTS als Substrat gemessen. Aus der Abnahme der Aktivität über die Zeit wurden die Halbwertszeiten bei Annahme einer Reaktion erster Ordnung ermittelt.

T [°C]	$t_{1/2}$ rekombinante LAC [h]	$t_{1/2}$ native LAC [h]
25	35,00	-
30	23,00	-
35	8,70	1,05
40	7,70	0,80
50	2,30	0,30
55	0,80	0,20
60	0,60	0,07
70	0,30	-
80	0,06	-

Der Vergleich der Halbwertszeiten legt nahe, dass die rekombinante LAC um ein Vielfaches thermostabiler ist als die native LAC. So weist die rekombinante LAC bei 35 °C eine Halbwertszeit von 8,7 h auf, die native LAC zeigt bei derselben Temperatur nur eine Halbwertszeit von 1,05 h. Bei 35 °C ist das rekombinante Protein also 8mal stabiler als das native. Dies trifft auch auf den Temperaturbereich zwischen 50 und 60 °C zu. Bei einer Temperatur von 40 °C ist die Halbwertszeit des rekombinanten Enzyms sogar über 9mal größer als die des nativen Enzyms. Allerdings muss hier beachtet werden, dass Salony und Mitarbeiter [2006] die Temperaturstabilität nicht bei einem pH-Wert von 7,0 in Natriumtartrat Puffer, sondern sehr wahrscheinlich bei einem pH-Wert von 5,0 in einem Citrat Puffer ermittelten. Zudem verwendeten sie sehr wahrscheinlich den Guaiacol- anstatt des hier verwendeten ABTS-Aktivitätstests. Leider geht weder die Verwendung des Puffers noch des Aktivitätstests ganz eindeutig aus der Publikation hervor. Ob ABTS oder Guaiacol als Substrat bei Ermittlung der LAC-Restaktivität nach Inkubation bei entsprechenden Temperaturen verwendet wurde, dürfte die pH-Stabilität des Enzyms kaum beeinflussen. Der bei der Inkubation des Proteins verwendete Puffer und vor allem der eingestellte pH-Wert

spielen dagegen eine entscheidende Rolle. Zumindest für die rekombinante LAC wurde für einen pH-Wert von 5,0 eine Halbwertszeit von 69,3 h und bei einem pH-Wert von 7,0 eine signifikant höhere Halbwertszeit von 99 h berechnet. Daher könnte die geringere pH-Stabilität bei einem pH-Wert von 5,0 die Ergebnisse der thermischen Stabilität beeinflussen. Auch eine unterschiedliche Interaktion der Tartrat- und Citrat-Ionen mit der LAC ist nicht auszuschließen. Einflüsse des veränderten N-Terminus, eines eventuell veränderten Glykosilierungsmusters und einer eventuell veränderten Proteinfaltung des rekombinanten Proteins, wie sie beim pH-Optimum bereits besprochen wurden, sind ebenfalls nicht auszuschließen.

Die thermische Stabilität der rekombinanten LAC aus *C. bulleri* liegt im selben Bereich wie die vieler weiterer Laccasen aus Weißfäulepilzen. So sind die Temperaturstabilitäten der Laccasen aus *Coriolus hirsutus*, *Coriolus versicolor*, *Trametes versicolor*, *Perenniporia tephropora* und dem Basidiomyceten PM1 mit der Temperaturstabilität der LAC aus *C. bulleri* vergleichbar [Kojima, Tsukuda *et al.*, 1990; Sugiura, Sakaino *et al.*, 1987; Han, Choi *et al.*, 2005; Ben Younes, Mechichi *et al.*, 2007; Coll, Fernandez-Abalos *et al.*, 1993].

Die Thermostabilität der rekombinanten LAC aus *Cyathus bulleri* ist jedoch deutlich höher als die Thermostabilität der LAC aus *Cyathus stercoreus*, die lediglich bei Temperaturen unter 25 °C stabil ist [Sethuraman, Akin *et al.*, 1999]. So beträgt die Halbwertszeit dieser LAC bei 40 °C lediglich 1 h, während die Halbwertszeit der LAC aus *C. bulleri* bei dieser Temperatur 7,7 h beträgt.

Die LAC aus *Panus tigrinus* ist zwar bei Temperaturen bis einschließlich 50 °C stabiler als die rekombinante LAC, die dafür wiederum bei Temperaturen ab 60 °C die höhere Thermostabilität zeigt [Quaratino, Federici *et al.*, 2007]. Insgesamt ist die Thermostabilität der rekombinanten LAC aus *C. bulleri* als sehr zufriedenstellend zu betrachten. Wie beim Vergleich der pH-Stabilität muss jedoch auch hier beachtet werden, dass Thermostabilitäten aufgrund unterschiedlicher Messbedingungen nur begrenzt miteinander vergleichbar sind.

Einfluss der Ionenstärke (NaCl) auf Aktivität und Stabilität

Es ist bekannt, dass viele Laccasen von Chloridionen stark inhibiert werden, da Halide mit dem Elektronenakzeptor Sauerstoff um die Bindung an den Kupferzentren der Laccasen konkurrieren [Singh, Sharma *et al.*, 2009]. Diese Inhibierung ist bei industriellen Anwendungen von Laccasen, wie z. B. der Entfärbung von Textilfarbstoffen und beim Biobleichen von Pulp, sehr hinderlich [Farnet, Gil *et al.*, 2008; Singh, Sharma *et al.*, 2009]. Aufgrund dessen wurde der Einfluss von Chloridionen auf die Aktivität und Stabilität der rekombinanten LAC untersucht.

Hierzu wurde Laccaselyophilisat in NaCl-Lösungen verschiedener Ionenstärke gelöst. Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt und die Ansätze wurden bei 4 °C gelagert. Da die LAC bei diesen Bedingungen sehr stabil ist (s. Tabelle 3.2), konnte der inaktivierende Effekt dieser beiden Parameter minimiert werden. Auch ein Effekt der Na⁺-Ionen konnte aufgrund der Ergebnisse von Vasdev und Mitarbeitern [2005] ausgeschlossen werden. In Abbildung 3.4 ist die Restaktivität der LAC in Abhängigkeit von der Ionenstärke der NaCl-Lösung aufgetragen.

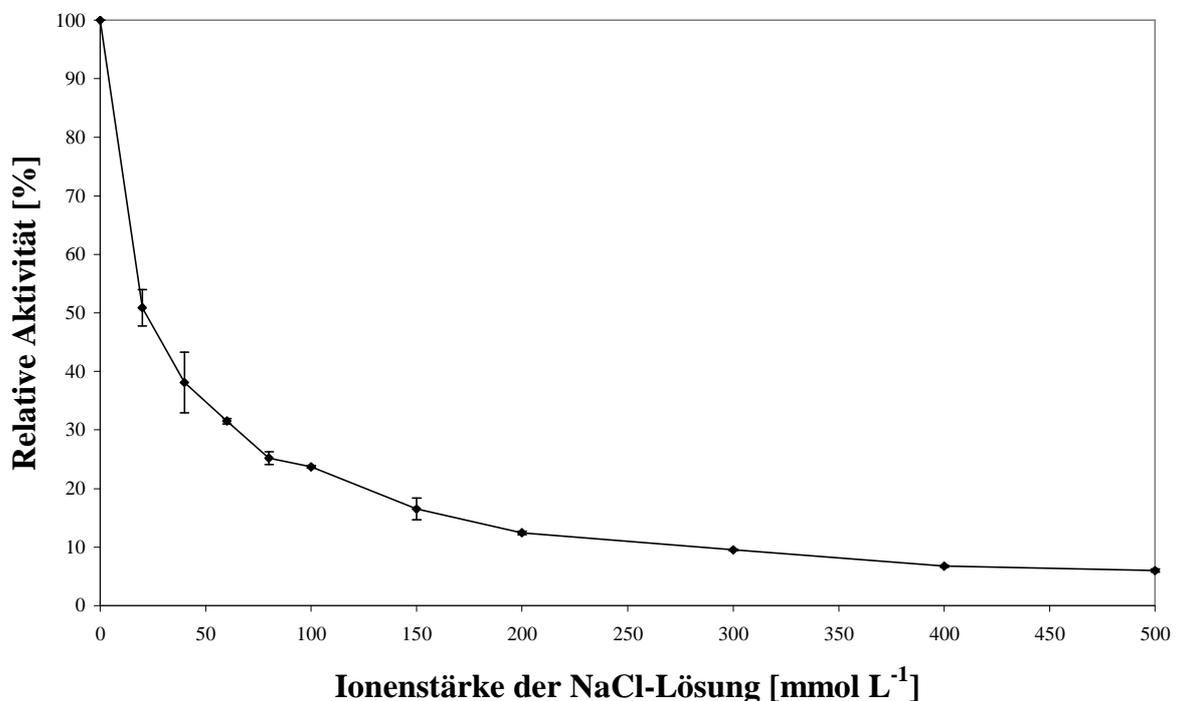


Abbildung 3.4. Relative Aktivität der rekombinanten Laccase in Abhängigkeit von der Ionenstärke der NaCl-Lösung. Die Laccase wurde in NaCl-Lösungen mit Ionenstärken zwischen 0 und 500 mM bei einem pH-Wert von 8,0 und einer Temperatur von 4 °C inkubiert. Die Laccaseaktivität wurde direkt nach Zugabe des Salzes mithilfe des ABTS-Aktivitätstest ermittelt.

Es ist eindeutig zu erkennen, dass die rekombinante LAC von Ionenstärken der NaCl-Lösung zwischen 20 und 500 mmol L⁻¹ stark inhibiert wird. Selbst bei einer geringen Ionenstärke von 20 mmol L⁻¹ ist nur noch eine relative Restaktivität von 50,9% zu messen. Bis zu einer Ionenstärke von 300 mmol L⁻¹ sinkt die relative Restaktivität weiter drastisch auf ~9,5% ab und stabilisiert sich um diesen Wert herum bis zu einer Ionenstärke von 500 mmol L⁻¹. In Tabelle 3.3 sind Halbwertszeiten der LAC bei Inkubation in NaCl-Lösungen verschiedener Ionenstärken dargestellt.

Tabelle 3.3. Halbwertszeiten der rekombinanten Laccase bei Inkubation in NaCl-Lösungen verschiedener Ionenstärke bei 4 °C. Die Inaktivierungskoeffizienten und die daraus resultierenden Halbwertszeiten wurden unter Annahme einer Reaktion erster Ordnung graphisch aus der Abnahme der Laccaseaktivität über die Zeit ermittelt. Als Aktivitätstest wurde der ABTS-Test eingesetzt.

Ionenstärke (NaCl) [mM]	Halbwertszeit [h]
0	126
20	9,9
40	5,8
60	4,3
80	4,1
100	3,8
200	3,5
300	3,5
400	3,3

Die berechneten Halbwertszeiten belegen deutlich, dass schon eine geringe Ionenstärke der NaCl-Lösung von 20 mmol L⁻¹ zu einer starken Herabsetzung der LAC-Stabilität führt, denn $t_{1/2}$ sinkt von 126 h (I = 0 mM) auf gerade einmal 9,9 h (I = 20 mM) ab. Die Halbwertszeiten sinken mit steigenden Ionenstärken immer weiter auf bis zu 3,3 h ab.

Ein direkter Vergleich des Einflusses von Chloridionen auf die native und rekombinante LAC aus *C. bulleri* war aufgrund fehlender Daten des nativen Enzyms nicht möglich. Auch ein Vergleich mit anderen Laccasen aus Pilzen ist schwierig, da hierzu bisher wenig veröffentlicht wurde.

Die LAC aus dem Basidiomyceten *Trametes versicolor* wird von Chloridionen jedoch in einem ähnlichen Maße inhibiert wie die rekombinante LAC aus *C. bulleri* [Kim, Nicell, 2006]. Die LAC aus dem Basidiomyceten *Marasmius quercophilus* wird dagegen wesentlich stärker von Chloridionen inhibiert. Bereits bei einer Ionenstärke der NaCl-Lösung von $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ beträgt die Restaktivität nur noch 50% [Farnet, Gil *et al.*, 2008]. Eine LAC aus dem Basidiomyceten *Chalara paradoxa* wird kaum von Chloridionen inhibiert. Diese LAC zeigt selbst bei einer Ionenstärke der NaCl-Lösung von 300 mmol L^{-1} noch 100% Restaktivität [Robles, Lucas *et al.*, 2002].

Im Vergleich mit Laccasen aus anderen Organismen als Pilzen erweist sich nach dem gegenwärtigen Stand der Literatur lediglich die LAC aus dem γ -Proteobacterium JB als halotoleranter. Diese LAC wird bis zu Ionenstärken der NaCl-Lösung von 80 mmol L^{-1} nicht in ihrer Aktivität beeinflusst und weist selbst bei einer Ionenstärke von 500 mmol L^{-1} noch eine Restaktivität von 60% auf [Singh, Sharma *et al.*, 2009]. Die LAC aus dem Proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* wird dagegen in ähnlicher Weise von Chloridionen beeinflusst wie die rekombinante LAC aus *C. bulleri* [Rosconi, Franco Fraguas *et al.*, 2005]. Eine pflanzliche LAC aus dem Lackbaum *Rhus vernicifera* wird wesentlich stärker inhibiert als die rekombinante LAC, da hier schon bei einer Ionenstärke der NaCl-Lösung von 20 mmol L^{-1} nur noch eine Restaktivität von 10% detektiert wird [Mateescu, Agostinelli *et al.*, 1990]. Die LAC aus *C. bulleri* wies bei derselben Ionenstärke noch eine Restaktivität von 50,9% auf (s. Abb. 3.4).

Halbwertszeiten der Laccasen wurden in keinem der genannten Beispiele angegeben, was Fragen bezüglich der Proteinestabilität aufwirft. Insgesamt ist die Stabilität der rekombinanten LAC aus *C. bulleri* sehr zufriedenstellend.

Einfluss von Lösungsmitteln auf Aktivität und Stabilität

Für die industrielle Anwendung von Laccasen ist deren Lösungsmittelstabilität oft entscheidend, da diese Phenoloxidasen überwiegend Anwendung beim Abbau schwer löslicher Substanzen, wie z. B. Lignin oder aromatischer Schadstoffe, finden [Farnet, Gil *et al.*, 2008]. Daher wurde der Einfluss ausgewählter Lösungsmittel auf die Aktivität und Stabilität der rekombinanten LAC untersucht (s. Abb. 3.5). Aus praktischen Gründen wurden

ausschließlich wassermischbare Cosolventien und keine Zweiphasensysteme betrachtet, um den Einfluss der Phasengrenzfläche auf das Enzym zu umgehen. Um die ermittelte Lösungsmittelstabilität der rekombinanten LAC aus *C.bulleri* mit Lösungsmittelstabilitäten anderer Laccasen vergleichen zu können, wurden die bisher am häufigsten verwendeten wassermischbaren Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO), Aceton und Ethanol ausgewählt [Luterek, Gianfreda *et al.*, 1998; Rodakiewicz-Nowak, Kasture *et al.*, 2000; Cambria, Cambria *et al.*, 2000; Robles, Lucas *et al.*, 2002; Colao, Lupino *et al.*, 2006; Kim, Nicell, 2006; Farnet, Gil *et al.*, 2008; Singh, Sharma *et al.*, 2009]. Als weiteres, bisher nicht getestetes Lösungsmittel wurde Tetrahydrofuran (THF) in die Experimente mit einbezogen. Wegen der bei möglichen industriellen Anwendungen der LAC eingesetzten sehr schwer löslichen Substrate, wurden diese Cosolventien in einer hohen Konzentration von 50% (v/v) eingesetzt. Das Lyophilisat der LAC wurde in dem entsprechenden wässrigen Gemisch bei 4 °C inkubiert.

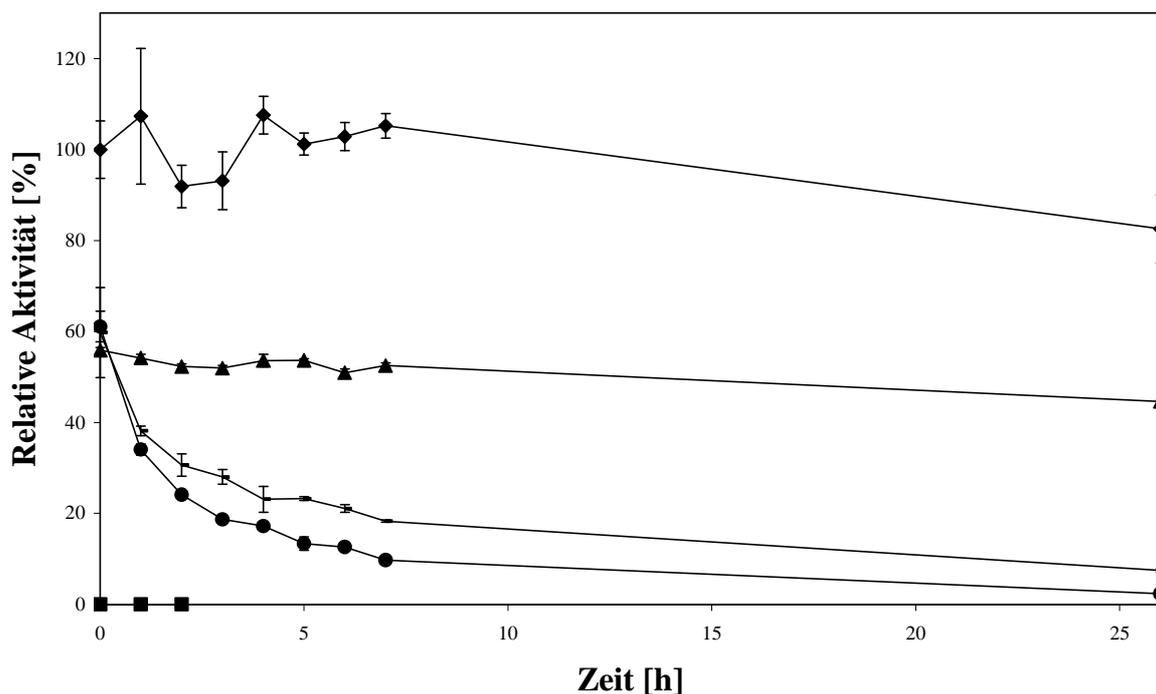


Abbildung 3.5. Relative Restaktivität der rekombinant in *P. pastoris* exprimierten Laccase aus *C. bulleri* in Abhängigkeit von der Zeit bei Inkubation in reinem Wasser (Rauten), 50% (v/v) Wasser/DMSO (Dreiecke), 50% (v/v) Wasser/Ethanol (Kreise), 50% (v/v) Wasser/Aceton (Balken) bzw. 50% (v/v) Wasser/THF (Quadrate) bei 4 °C. Die Laccaseaktivität wurde mittels ABTS-Aktivitätstest bestimmt.

Durch alle getesteten Lösungsmittel sinkt die Anfangsaktivität, im Vergleich zur Anfangsaktivität in reinem Wasser, um ca. 40% ab. Dies ist sehr wahrscheinlich auf eine Inhibierung der LAC durch die verwendeten Cosolventien zurückzuführen. Da die Bindungsstelle der organischen Substrate nah an der Enzymoberfläche der Laccasen liegt [Solomon, Sundaram *et al.*, 1996] und für Cosolventien somit frei zugänglich ist, könnten diese mit den Substraten um die Bindungsstelle konkurrieren. In diesem Fall würden die Cosolventien als kompetitive oder gemischte Inhibitoren fungieren [Rodakiewicz-Nowak, Kasture *et al.*, 2000]. Ursache und Mechanismus der Lösungsmittelinhibierung sind jedoch bisher ungeklärt. Eine Vielzahl an Erklärungen bishin zur durch Cosolventien intiierten Konformationsänderung der LAC sind denkbar.

Die rekombinante LAC zeigt gegenüber dem wässrigen DMSO-Gemisch die höchste Stabilität. Die LAC-Aktivität bleibt über den gemessenen Zeitraum von 26 h nahezu konstant und sinkt lediglich auf eine relative Restaktivität von ~44,6% ab. Gegen das wässrige Acetongemisch zeigt die rekombinante LAC die zweithöchste Stabilität. Innerhalb von 1 h sinkt die Aktivität hier auf einen Restwert von ~38,1% ab und fällt innerhalb von 7 h langsam weiter auf 18,3% ab. Nach 26 h Inkubation ist hier immerhin noch eine relative Restaktivität von 7,5% zu messen. Bei Inkubation in dem wässrigen Ethanolgemisch sinkt die LAC-Aktivität innerhalb der ersten Stunde auf einen Wert von 34% ab und fällt innerhalb der folgenden 6 h langsam weiter auf ~9,8% ab. Nach 26 h Inkubationszeit konnte nur noch eine relative Restaktivität von lediglich 2,4% ermittelt werden. In einem wässrigen THF-Gemisch konnte überhaupt keine LAC-Aktivität detektiert werden. Direkt nach Zugabe der LAC zum Lösungsmittelgemisch sank die Aktivität hier auf Null, weshalb die Stabilitätsmessung bereits nach 2 h aufgegeben wurde.

In Tabelle 3.4 sind Halbwertszeiten der LAC bei Inkubation in den verschiedenen Cosolventien (50%) dargestellt.

Tabelle 3.4. Halbwertszeiten der rekombinanten Laccase bei Inkubation in reinem Wasser, 50% (v/v) Wasser/DMSO, 50% (v/v) Wasser/Aceton, 50% (v/v) Wasser/Ethanol Gemischen bei 4 °C. Als Aktivitätstest wurde der ABTS-Test eingesetzt.

Lösungsmittel	Halbwertszeit [h]
Reines Wasser	91,2
50% DMSO/Wasser	88,8
50% Aceton/Wasser	4,7
50% Ethanol/Wasser	3,0

Die Halbwertszeit bei Inkubation in 50% DMSO liegt mit 88,8 h nur wenig unter der Halbwertszeit von 91,2 h des Proteins bei Inkubation in reinem Wasser. Die Halbwertszeiten bei Inkubation in wässrigem Aceton bzw. Ethanol liegen mit 4,7 und 3,0 h deutlich unterhalb der hohen Halbwertszeit in DMSO.

Wie bereits erwähnt können Laccasen durch Cosolventien kompetitiv oder gemischt inhibiert werden, weshalb der Grad der Inhibierung stark vom verwendeten Substrat abhängig ist [Rodakiewicz-Nowak, Kasture *et al.*, 2000; Farnet, Gil *et al.*, 2008]. Daher werden im Folgenden lediglich Daten zum Vergleich herangezogen, die ebenfalls mit ABTS als Substrat ermittelt wurden.

Die LAC aus dem Basidiomyceten *Marasmius quercophilus*, die von Chloridionen wesentlich stärker inhibiert wird als die rekombinante LAC aus *C. bulleri*, wird von Cosolventien dagegen in einem ähnlichen Maße inhibiert. Diese LAC zeigt bei Ethanolgehalten von 45 bzw. 65% Restaktivitäten von 70 bzw. 46% [Farnet, Gil *et al.*, 2008]. Die hier untersuchte rekombinante LAC zeigt bei einem Ethanolgehalt von 50% eine Restaktivität von 61%.

Die LAC aus dem Basidiomyceten *Chalara paradoxa* wird dagegen wesentlich stärker durch Cosolventien inhibiert als die LAC aus *C. bulleri*. Schon bei Konzentrationen von lediglich 25% Cosolvens ist bei dieser LAC ein deutlicher Verlust der Aktivität zu beobachten [Robles, Lucas *et al.*, 2002]. So wurde bei 25% Ethanol zwar eine hohe Restaktivität von 73% detektiert, die LAC aus *C. bulleri* weist bei einer Konzentration von 50% jedoch noch eine ähnlich hohe relative Aktivität von 60,5% auf (s. Abb. 3.5). Bei einem Gehalt von 25% Aceton bzw. DMSO wurden Restaktivitäten von 29,5 bzw. 37,4% ermittelt, während bei der

LAC aus *C. bulleri* bei Gehalten von 50% Cosolvens noch Restaktivitäten von 59,8 bzw. 55,9% gemessen wurden (s. Abb. 3.5).

Weniger stark inhibiert wird dagegen die LAC aus dem Basidiomyceten *Rigidoporus lignosus* [Cambria, Cambria *et al.*, 2000]. Hier wurde bei einem Gehalt von 50% Aceton bzw. DMSO in beiden Fällen eine Aktivität von 100% gemessen. Bei Inkubation in DMSO konnte des Weiteren kein Stabilitätsverlust detektiert werden. Für Aceton wurde jedoch eine Halbwertszeit von 2,67 h angegeben, die damit unterhalb der Halbwertszeit der LAC aus *C. bulleri* mit 4,7 h (s. Tabelle 3.4) liegt. Bei allen anderen aufgeführten Beispielen wurden keine Halbwertszeiten angegeben.

Trotz des nachgewiesenen Effekts von Cosolventien auf die Aktivität und Stabilität der rekombinanten LAC aus *C. bulleri* ist diese für den technischen Einsatz mit Löslichkeitsvermittlern sehr vielversprechend. Bei sehr hohen Konzentrationen der Cosolventien von 50% wird immer noch eine sehr zufriedenstellende Restaktivität von ca. 60% detektiert. Besonders im wässrigen DMSO-Einphasensystem zeigt die LAC zudem eine sehr hohe Halbwertszeit, die nur geringfügig unterhalb der Halbwertszeit bei Inkubation in reinem Wasser liegt. Neben der Aktivität ist also auch die Stabilität zumindest bei Verwendung von DMSO für einen technischen Einsatz hoch genug. Für die Identifikation eines optimalen Lösungsmittels wäre es in weiteren Forschungsarbeiten interessant, ein umfassendes Lösungsmittelscreening mit der rekombinanten LAC durchzuführen.

3.1.5 Zusammenfassung

Die Nukleotidsequenz der LAC aus dem Weißfäulepilz *Cyathus bulleri* wurde mittels RACE-PCR und Primer Walking erfolgreich aufgeklärt und veröffentlicht. Die heterologe Expression dieser LAC gelang im Hefeexpressionssystem *Pichia pastoris*. Nach Optimierung der Expressionsbedingungen durch Zugabe von Kupfersulfat zum Medium, konnte eine exzellente maximale volumetrische Aktivität von 125 U mL⁻¹ erzielt werden. Die rekombinante LAC ist mit 60±5 kDa nicht größer als die native LAC, womit eine Hyperglykosylierung durch die Hefe ausgeschlossen werden kann.

Bei der Charakterisierung der rekombinanten LAC stellte sich heraus, dass die pH-Optima der rekombinanten (pH 3,4) und der nativen LAC (pH 3,5-4,0) leicht voneinander abweichen. Bezüglich der pH-Stabilität sind die Unterschiede nicht gravierend. Beide Enzyme sind in einem breiten pH-Bereich zwischen 5,0-9,0 sehr stabil, womit die pH-Stabilität größer ist als bei einigen anderen Laccasen. Die Thermostabilität der rekombinanten LAC ist im Bereich zwischen 35-60 °C 8-9mal höher als die der nativen LAC, wobei hier unterschiedliche Umgebungsbedingungen während der Experimente berücksichtigt werden müssen. Insgesamt nimmt die Thermostabilität der LAC aus *C. bulleri* bei Temperaturen oberhalb 50 °C stark ab, womit die Temperaturstabilität vergleichbar mit vielen anderen Laccasen ist. Die Unterschiede bezüglich des pH-Optimums sind sehr wahrscheinlich auf leicht unterschiedliche posttranslationale Modifikationen zwischen filamentösen Pilzen und *P. pastoris* zurückzuführen. Auch durch die Verwendung des α -Faktorsekretionssignals an den N-Terminus des rekombinanten Proteins angehangene Aminosäurereste könnten hierfür eine Erklärung sein. Auch für die unterschiedliche Thermostabilität der nativen und rekombinanten LAC könnten diese Argumente, neben den unterschiedlichen Messbedingungen, zusätzlich als mögliche Ursache herangezogen werden.

Chloridionen beeinflussen Aktivität und Stabilität der rekombinanten LAC aus *C. bulleri* stark. Schon bei einer geringen Ionenstärke der NaCl-Lösung von 20 mmol L⁻¹ ist nur noch eine relative Restaktivität von 50,9% zu messen und die Halbwertszeit wird drastisch von 126 h auf 9,9 h verringert. Bei Erhöhung der Ionenstärke bis auf 500 mmol L⁻¹, sinkt die Halbwertszeit bis auf 3,3 h weiter ab. Im Vergleich zu anderen Laccasen liegt der Einfluss der Ionenstärke der NaCl-Lösung damit im durchschnittlichen Bereich.

Bei Untersuchung der Lösungsmittelstabilität konnte besonders die LAC-Stabilität gegenüber dem DMSO/Wasser-Gemisch (50%, v/v) mit einer Halbwertszeit von 88,8 h überzeugen. Die Halbwertszeiten der rekombinanten LAC in wässrigen Aceton- bzw. Ethanolgemischen waren mit 4,7 h und 3,0 h deutlich niedriger. Alle getesteten Lösungsmittel beeinflussten die Laccaseanfangsaktivität stark. Im Vergleich zur Anfangsaktivität in reinem Wasser fiel sie um ~40% ab. Die Cosolventien könnten also als kompetitive oder gemischte Inhibitoren auf die LAC wirken. In Anbetracht der getesteten sehr hohen Gehalte an Cosolventien von 50% (v/v) sind jedoch sowohl die Restaktivität als auch die Stabilität der LAC bemerkenswert.

3.2 Expression der Ligninperoxidase aus *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia methanolica* und *Pichia pastoris*

Weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die am längsten bekannte, teilweise bereits gut untersuchte und sehr reaktive LiPH8 (*lipA*) aus *P. chrysosporium* [Tien, Kirk, 1984; Kirk, Croan *et al.*, 1986; Hammel, Kalyanaraman *et al.*, 1986; Andrawis, Johnson *et al.*, 1988; Smith, Schalch *et al.*, 1988; Hammel, Moen, 1991; Blodig, Smith *et al.*, 2001] analog zu Wang *et al.* [2004] in der Hefe *Pichia methanolica* heterolog zu exprimieren. Wang und seinen Mitarbeitern gelang in dem Protease defizienten Hefestamm die Expression der LiPH8 aus *P. chrysosporium* unter dem induzierbaren Alkoholoxidase Promotor P_{AUG1} mit einer Proteinkonzentration von 100 mg L⁻¹ und einer vol. Aktivität von 1933 U L⁻¹. Dieses vielversprechende Hefeexpressionssystem sollte reproduziert werden, damit die rekombinante LiP in weiteren Forschungsarbeiten im Hinblick auf ihre Prozessstabilität charakterisiert werden kann und Untersuchungen bezüglich der Einsatzmöglichkeiten bei der Nutzung des Rohstoffes Lignin durchgeführt werden können.

3.2.1 Klonierung und Expression der Ligninperoxidase in *Pichia methanolica*

Der Pilz *P. chrysosporium* wurde unter ligninolytischen Bedingungen kultiviert (s. 2.2.2), um nach Erreichen der maximalen LiP-Aktivität im Medium die Gesamt-RNA aus dem Myzelium zu isolieren (s. 2.2.3). Lediglich die mRNA wurde anschließend in einer RT-PCR unter Einsatz eines Oligo-dT Primers (s. 2.1.3) in cDNA transkribiert, welche als Template für eine PCR mit LiP-genspezifischen Primern diente (s. 2.2.4). Da der Weißfäulepilz *P. chrysosporium* ebenso wie *C. bulleri* zu den Eukaryoten zählt, wurde das LiP-Gen analog zum LAC-Gen ausgehend von der gespleißten mRNA, die keine Introns mehr enthält, amplifiziert. Die Sekretion der LiP durch das α -Faktorsignalpeptid aus *S. cerevisiae* hatte sich bei Wang *et al.* [2004] als erfolgreicher herausgestellt als die Sekretion des Enzyms durch das natürliche Sekretionssignal aus *P. chrysosporium*. Daher wurde das LipH8-Gen in den Hefeexpressionsvektor pMET α A (s. Anhang, Abb. 4.3), welcher das α -Faktorsekretionssignal aus *S. cerevisiae* trägt, kloniert. Folglich wurde der genspezifische upstream Primer in der PCR so gewählt, dass das Sekretionssignal von *P. chrysosporium* nicht amplifiziert wurde. Gemäß den Erwartungen wurde ein 1035 bp großes DNA-Fragment vervielfältigt, welches

anschließend in den Vektor pCR4-TOPO kloniert und in *E. coli* Top10 Zellen repliziert wurde (s. 2.2.5).

Nach Selektion über Ampicillinresistenz und Überprüfung der Aufnahme eines pCR4-TOPO/*LiP* Plasmids über Colony-PCR wurde das rekombinante Plasmid aus positiv getesteten Klonen isoliert, das *LiP*-Gen aus diesem herausgeschnitten und in den Hefe-Shuttle-Vektor pMET α A ligiert. Der pMET α A/*LiP* Vektor wurde nachfolgend zur Replikation in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert (s. 2.2.6). Einige der Kolonien, die auf dem Amp-Selektionsagar gewachsen waren, wurden abermals einer Colony-PCR mit genspezifischen Primern unterzogen. Alle getesteten Klone hatten das pMET α A/*LiP* Plasmid aufgenommen, denn bei allen Klonen wurde ein 1035 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Zur Überprüfung der Nukleotidsequenz des Gens und der Klonierung innerhalb des Leserahmens des Sekretionssignals wurde das Plasmid eines ausgewählten Klons sequenziert. Als Primer wurden dabei der AUG1-Forward Primer, der upstream des α -Faktorsignals ansetzt, und der AUG1-Reverse Primer, der hinter der Multiple Cloning Site ansetzt, eingesetzt. Ein Sequenzvergleich über die Software BLASTN zeigte, dass die Nukleotidsequenz des klonierten Gens zu 100% mit der publizierten Sequenz des *LiPH8*-Gens (EMBL Accession Number X06689) übereinstimmt. Zudem zeigte sich, dass das Gen innerhalb des Leserahmens des Sekretionssignals des Vektors kloniert wurde (s. Anhang, Abb. 4.4).

Aus diesem positiv getesteten Klon wurde das Plasmidkonstrukt pMET α A/*LiP* isoliert und anschließend mithilfe des Restriktionsenzym *AscI* linearisiert. Die so entstandene Expressionskassette bestand aus dem *AUG1* Promotor, dem α -Faktorsekretionssignal, dem *LiP*-Gen, der *AUG1* Transkriptions Terminations Region, dem *ADE2* Gen aus *S. cerevisiae* und den downstream 3'*AUG1* Sequenzen. Das *ADE2* Gen aus dem Wildtypstamm *S. cerevisiae* codiert eine Phosphoribosylaminoimidazolcarboxylase und komplementiert den *P. methanolica* PMAD16 *ade2* Stamm. Somit wird die Selektion von *P. methanolica* Klonen auf Minimalmedien ohne Adeninzusatz ermöglicht. Durch das Herausschneiden der Expressionskassette aus dem Expressionsvektor wird die Transformationseffizienz erheblich gesteigert und die Rekombination in *P. methanolica* vereinfacht. In *P. methanolica* sind nicht-homologe Rekombinationsereignisse wesentlich wahrscheinlicher (>90%) als homologe

Rekombination. Daher kann die Expressionskassette an vielen Loci im Hefegenom integriert werden.

Die transformierten Hefen wurden auf Minimal Dextrose (MD) Platten ohne Adeninzusatz ausgestrichen und nach 4 Tagen Inkubation bei 29 °C bildeten sich kleine Hefekolonien. Diese wurden einer Colony-PCR mit genspezifischen Primern unterzogen, um zu überprüfen ob die Expressionskassette inklusive des LiP-Gens in das Hefegenom integriert wurde. Bei der Colony-PCR wurde gemäß den Erwartungen ein 1035 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. In allen untersuchten Hefeklonen wurde die Expressionskassette demnach durch Rekombination in das Hefegenom integriert.

Zur Überprüfung der Expression wurden die positiv getesteten Hefeklone in BMDY-Medium kultiviert (2.2.7). Jeden Tag wurde der Kulturüberstand auf LiP-Aktivität hin geprüft, jedoch konnte selbst nach 8 Tagen Kultivierung keine Aktivität detektiert werden. Eine zusätzliche Analyse der Expression wurde mithilfe einer SDS-Page-Gelelektrophorese durchgeführt. Neben den Kulturüberständen der Hefeklone wurde auch der Kulturüberstand der Negativkontrolle *P. methanolica* pMET α A aufgetragen. Auch die SDS-Gelanalyse zeigte, dass kein Protein in der Größe der LiP von 38-42 kDa exprimiert wurde. Um auszuschließen, dass lediglich die Sekretion des Enzyms nicht funktioniert hatte, wurden die Zellen der Hefeklone und auch die der Negativkontrolle nach Kultivierung in BMDY-Medium aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde ebenfalls ohne Erfolg auf LiP-Aktivität hin untersucht.

Es bleibt festzuhalten, dass die Expression der LiP in *P. methanolica* nicht gelang, obwohl sie analog zu Wang und Mitarbeitern [2004] durchgeführt wurde. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die mangelnde genetische Stabilität des käuflich erworbenen Hefeexpressionssystems sein. Ein Hinweis darauf ist, dass das Selektionssystem über Komplementierung des PMAD16 *ade2* Hefestammes durch Integration der Expressionskassette im Hefegenom zum Genotypen *ADE2* nicht funktionierte. Die untransformierten Hefestämme PMAD11 und PMAD16, die beide den Genotypen *ade2* tragen, wuchsen auf Minimalmedien ohne Adeninzusatz genauso schnell wie die vermeintlich transformierten rekombinanten Stämme und vor allem wie der im Kit mitgelieferte Kontrollstamm PMAD16/pMET α B/HSA. Die

genetische Stabilität des mutierten Expressionsstamm *P. methanolica* kann daher in Frage gestellt werden und es erscheint gut vorstellbar, dass auch die Rekombination im Hefestamm nach Transformation der Expressionskassette nicht stattfand.

Im vorliegenden Fall konnte die Integration der Expressionskassette in das Genom des Hefestammes *P. methanolica* jedenfalls nicht eindeutig nachgewiesen werden. Da die Hefeklonen nach der Transformation auf den Selektions-MD-Platten schlecht wuchsen und sehr klein blieben wurden einige Kolonien, die zuvor per Colony-PCR positiv auf die Aufnahme der Expressionskassette getestet wurden, auf YPD-Platten umplattiert. Mit diesen umplattierten Hefeklonen wurde zur erneuten Kontrolle abermals eine Colony-PCR mit LiP-spezifischen Primern durchgeführt. Zwar wurde wieder gemäß den Erwartungen ein Teilfragment (1035 bp) in der Größe des LiP-Gens amplifiziert, jedoch fiel die Amplifikation diesmal deutlich schwächer aus. Die Colony-PCR wurde mehrmals wiederholt. Jedes Mal konnte jedoch nur eine sehr schwache Amplifikation des LiP-Gens detektiert werden. Die Klone wurden in flüssigem BMDY-Medium kultiviert und nochmals einer Colony-PCR unterzogen. Diesmal war selbst nach mehrmaligen Wiederholungen keine Amplifikation des LiP-Gens zu detektieren.

Dies legt die Vermutung nah, dass nach der Transformation der Expressionskassette in *P. methanolica* keine Rekombination erfolgt war, so dass diese sehr wahrscheinlich nicht in das Hefegenom integriert wurde. Werden folglich Kolonien untersucht, die direkt nach der Transformation ausgestrichen wurden, wird in der Colony-PCR mit LiP-spezifischen Primern eine sehr hohe Amplifikation erzielt, weil die Expressionskassette sich noch in den Hefezellen befindet oder an diesen haftet. Das Problem des Verschleppens des Inserts aus der Ligationreaktion und der daraus resultierenden Identifikation falsch positiver Klone wurde z. B. von Vineet und Nilanjan [2008] und von Dallas-Yang *et al.* [1998] beschrieben. Nach dem Umplattieren vermeintlich positiv getesteter Klone wird in der Colony-PCR nur noch eine wesentlich schwächere Amplifikation des LiP-Gens erreicht, da nun schon ein Großteil der nicht integrierten Expressionskassette abgebaut wurde. Nach Inokulation der Klone in Flüssigmedium wird keine Amplifikation des Zielgens mehr erreicht, da die Expressionskassette bereits vollständig degradiert wurde. Zur Vermeidung der Selektion falsch positiver Klone durch Colony-PCR wird empfohlen, die PCR nicht mit zwei

genspezifischen Primern, sondern mit einem genspezifischen und einem zielgenom-spezifischen Primer durchzuführen. Aufgrund der nicht-homologen Rekombination war dies im vorliegenden Fall jedoch nicht möglich.

Auch Wang und seine Mitarbeiter überprüften die Integration der Expressionskassette im Hefegenom lediglich mit zwei LiP-Gen-spezifischen Primern und das auch nur einmal direkt nach der Transformation der Hefen. Zudem geht aus der Veröffentlichung von Wang *et al.* [2004] nicht hervor, über welche Zeitspanne sich ihre Experimente mit dem Hefeexpressionssystem *P. methanolica* erstreckten. Es erscheint gut möglich, dass diese Arbeitsgruppe lediglich anfangs keine Probleme mit der genetischen Stabilität des Hefestammes und der transformierten Hefeklonen hatte und diese erst mit der Zeit auftraten.

Da sich das *P. methanolica* Expressionssystem also als fehlerhaft und ungeeignet erwiesen hatte, wurde ein weiteres Hefeexpressionssystem, die *P. pastoris*, getestet. Diese Hefe wurde bereits erfolgreich für die rekombinante Produktion mehrerer eukaryotischer Proteine eingesetzt [Cereghino, Cregg, 2000; Gellissen, 2000] und auch die LAC aus *C. bulleri* konnte in *P. pastoris* mit hervorragender Ausbeute exprimiert werden (s. 3.1). Auch ein Hämflavoenzym, die Cellobiosedehydrogenase (CDH) aus *P. chrysosporium*, wurde bereits heterolog unter der Kontrolle des Alkoholoxidase Promotors P_{AUG1} in dieser Hefe exprimiert [Yoshida, Ohira *et al.*, 2001]. Die Enzymeigenschaften der rekombinanten CDH unterschieden sich dabei kaum von denen des nativen Proteins. *P. pastoris* wurde ebenfalls erfolgreich für die heterologe Expression weiterer Häm enthaltender Proteine wie der Stickstoffmonoxidsynthase und der Nitratreduktase herangezogen [Gachhui, Presta *et al.*, 1996; Leber, Hemmens *et al.*, 1999; Mertens, Shiraishi *et al.*, 2000; Skipper, Campbell *et al.*, 2001]. Es kann also vorausgesetzt werden, dass die Hefe *P. pastoris* aktive Enzyme mit einer prosthetischen Hämgruppe produzieren kann. Aus diesen Gründen wurde das Hefe-expressionssystem *P. pastoris* für die Produktion der LiP ausgewählt.

3.2.2 Klonierung und Expression der Ligninperoxidase in *Pichia pastoris*

Für die Klonierung des LiP-Gens in das Hefeexpressionssystem *P. pastoris* wurde dieses abermals mit genspezifischen Primern ohne das natürliche Sekretionssignal des Pilzes

amplifiziert, jedoch wurden diesmal passend zum Hefe-Shuttle-Vektor pPICZ α A (s. Anhang, Abb. 4.2) die Schnittstellen *EcoRI* und *SacII* über die Primer an die Genenden angefügt. Nach Klonierung des amplifizierten LiP-Gens in den pCR4TOPO Vektor, dessen Transformation in *E. coli* Top10 Zellen, Umklonierung des Gens in den Hefeexpressionsvektor pPICZ α A und dessen Transformation und Replikation in *E. coli* DH5 α Zellen, wurde das pPICZ α A/LiP Plasmid isoliert und sequenziert. Dabei wurde bestätigt, dass die Nukleotidsequenz des LiP-Gens korrekt ist und dass es in den Leserahmen des α -Faktorsekretionssignals aus *S. cerevisiae* kloniert wurde (s. Anhang, Abb. 4.5).

Das pPICZ α A/LiP Plasmidkonstrukt aus dem sequenzierten Klon wurde isoliert und mit dem Restriktionsenzym *PmeI* linearisiert. Durch diese Linearisierung des Plasmids wird die Frequenz der homologen Rekombination am *AOX1* Locus gegenüber der nicht-homologen Rekombination in der Hefe deutlich erhöht. Die lineare pPICZ α A/LiP Expressionskassette wurde in *P. pastoris* X-33 Zellen transformiert und diese anschließend auf YPDS/Zeoicin Platten selektiert. Um die Integration der Expressionskassette in das *Pichia* Genom zu überprüfen, wurde mit ausgewählten Klonen eine Colony-PCR durchgeführt. Hierbei wurden der 5' *AOX1* Primer, der vor dem α -Faktorsekretionssignal am 5'-*AOX1* Locus ansetzt und der 3' *AOX1* Primer (s. 2.1.3), der hinter der Multiple Cloning Site ansetzt, eingesetzt. Bei erfolgreicher Integration des linearisierten Plasmids in das Hefegenom müssten bei der Colony-PCR zwei DNA-Fragmente amplifiziert werden. Ein Fragment müsste der Größe des LiP-Gens entsprechen, das Andere müsste der Größe des *AOX1*-Gens (ca. 2,2 kb) entsprechen. Tatsächlich wurden bei der Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte zwei Banden sichtbar (s. Abb. 3.6). Die größere Bande entsprach mit ca. 2,2 kb dem *AOX1*-Gen, die kleinere Bande war ca. 1600 bp groß und entsprach somit der Summe des LiP-Gens (1035 bp) und dem Fragment, das das pPICZ α A Plasmid produziert (588 bp). Somit war eindeutig bewiesen, dass die Expressionskassette inklusive LiP-Gen in das Genom der *Pichia pastoris* integriert wurde.

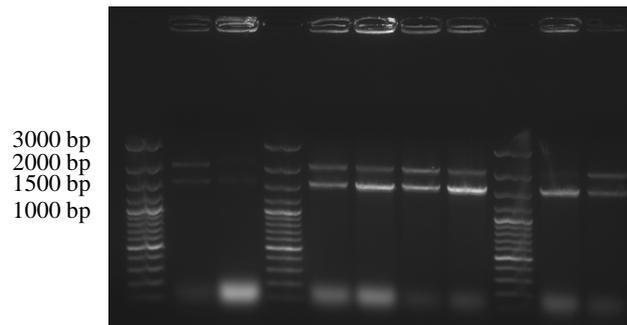


Abbildung 3.6. Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus der Colony-PCR mit ausgewählten *Pichia pastoris* Klonen. Als Primer wurden der 5'AOX1- und der 3'AOX1-Primers eingesetzt.

Die positiv getesteten Hefeklone wurden anschließend auf Expression der LiP im Expressionsmedium BMMY überprüft (s. 2.2.8). Als Negativkontrolle wurde ein X-33 Klon, der mit einem leeren pPICZ α A Plasmid transformiert worden war, kultiviert. Bei keinem der Klone konnte LiP-Aktivität detektiert werden. Um sicher zu gehen, dass lediglich nur die Sekretion der LiP nicht funktioniert und das Enzym intrazellulär vorliegt, wurde auch der Zellaufschluss an mehreren Tagen auf LiP-Aktivität untersucht. Auch hier konnte selbst fünf Tage nach Induktion keine LiP-Aktivität gemessen werden.

Die Kulturüberstände und auch die Zellaufschlüsse wurden aufkonzentriert und per SDS-Gelelektrophorese analysiert. Auch hier wurde bestätigt, dass keine LiP exprimiert wurde, denn im Größenbereich der LiP von 39-42 kDa war bei keinem Klon eine Proteinbande im SDS-Gel zu erkennen. Generell exprimierte die Negativkontrolle dieselben Proteine wie die Klone. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der SDS-Gelanalyse der Zellaufschlüsse. Auch hier war kein Unterschied zwischen den Klonen und der Negativkontrolle zu erkennen. Eine intrazelluläre Expression der LiP konnte somit ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Grund für die fehlende Expression der LiP könnte eine unpassende Codon Usage des Wirtsorganismus *P. pastoris* sein, die zur starken Verlangsamung und zum Abbruch der Translation führen kann. Um dies auszuschließen wurde der Codon Adaptation Index (CAI) des LiP-Gens und der *P. pastoris* mithilfe einer Software der Firma GeneScript analysiert. Für die Expression der LiPH8 aus *P. chrysosporium* in *P. pastoris* ergab sich ein CAI von 0,62. Ein CAI von 1 ist ideal, ein CAI von 0,62 noch sehr zufriedenstellend. Innerhalb der Gensequenz gibt es kein Basentriplett, das nicht vom Wirtsorganismus translatiert werden

kann. Zwar könnte die Nukleotidsequenz für eine Expression in *P. pastoris* im Hinblick auf die Codon Usage optimiert werden, eine Erklärung für die gänzlich fehlende Expression bietet sie aber nicht. Die LAC aus *C. bulleri* wurde z. B. sehr erfolgreich im selben Wirtsorganismus exprimiert (s. 3.1), obwohl hier nur ein geringfügig höherer CAI von 0,66 ermittelt wurde. Auch für die ausbleibende Expression der LiP im Hefeexpressionssystem *P. methanolica* kann eine nicht passende Codon Usage nicht als Ursache herangeführt werden, denn in diesem Fall wurde ein CAI von 0,60 ermittelt.

3.2.3 Zusammenfassung

Es kann festgehalten werden, dass die Expression der LiPH8 aus *P. chrysosporium* im Hefeexpressionssystem *P. methanolica* nicht erfolgreich war. Obwohl die Klonierung im *P. methanolica* Expressionssystem und auch die Expression analog zu Wang *et al.* [2004] durchgeführt wurden, konnte keinerlei LiP Produktion beobachtet werden. Das Selektionssystem der *P. methanolica* erwies sich als fehlerhaft und die Integration des LiP-Gens in das Hefegenom konnte nicht nachgewiesen werden, weshalb die genetische Stabilität des Hefestammes *P. methanolica* angezweifelt wurde.

Als weiteres Hefeexpressionssystem für die LiP wurde *P. pastoris* getestet. Die Integration des LiP-Gens in das Hefegenom konnte zwar eindeutig nachgewiesen werden, doch auch hier konnte weder intrazelluläre noch extrazelluläre LiP-Aktivität bzw. ein Protein der Größe der LiP nachgewiesen werden.

Es zeigte sich, dass die heterologe Expression der LiP sehr schwierig ist. Dies steht im Einklang mit Literaturdaten. Die heterologe Expression der LiP wurde bereits ohne Erfolg in dem filamentösen Pilz *A. niger* unter zwei verschiedenen Promotoren untersucht, wobei lediglich Spuren aktiver LiP bzw. lediglich inaktives Enzym exprimiert wurde [Aifa, Sayadi *et al.*, 1999; Conesa, van den Hondel *et al.*, 2000]. Bei der Klonierung einer LiP aus *Phlebia radiata* im Pilz *Trichoderma reesei* konnte gar keine Produktion des Proteins detektiert werden [Saloheimo, Barajas *et al.*, 1989]. Nach dem gegenwärtigen Stand der Literatur sind die bisher einzig erfolgreichen heterologen Expressionen einer LiP im Pilz *Amylomyces rouxii*

[Montiel-González, Fernández *et al.*, 2009] und in der Hefe *P. methanolica* [Wang, Lu *et al.*, 2004] gelungen.

Im vorliegenden Fall wäre es interessant über eine „Reverse Transcription quantitative PCR“ (RT-qPCR) oder über Northern Blotting das Level an gebildeter mRNA in beiden transformierten Hefeexpressionssystemen zu überprüfen. Hierdurch könnte analysiert werden, ob das Fremdgen überhaupt transkribiert wird. Hohe Konzentrationen an transkribierter mRNA des Hämperoxidasegens führen jedoch nicht zwangsläufig zur Produktion des Enzyms. Im Falle der heterologen Expression der LiP aus *P. radiata* in *T. reesei* konnte z. B. trotz eines hohen mRNAs Levels des Fremdgens, keinerlei Produktion der LiP festgestellt werden [Saloheimo, Barajas *et al.*, 1989]. Auch bei der Expression der LiP aus *P. chrysosporium* in *A. niger* konnten, trotz hoher Konzentrationen des Transkripts, nur Spuren des Enzyms detektiert werden [Aifa, Sayadi *et al.*, 1999].

Neben der Transkription gibt es demnach noch zahlreiche weitere Faktoren, die die Translation und erfolgreiche Produktion von Fremdproteinen behindern. Die Translation der mRNA kann durch eine nicht passende Codon Usage des Expressionsstammes limitiert werden. Eine nicht Übereinstimmung der Codon Usage konnte jedoch im vorliegenden Fall für beide Hefeexpressionssysteme ausgeschlossen werden. Für *P. methanolica* wurde ein CAI von 0,60, für *P. pastoris* ein CAI von 0,62 ermittelt. Beide CAIs sind zufriedenstellend und können keine Erklärung für die gänzlich ausbleibende LiP-Produktion sein.

Speziell bei der heterologen Expression von Hämproteinen kann die mangelnde Verfügbarkeit der prosthetischen Hämgruppe im Wirtsorganismus limitierend für deren Produktion sein [Conesa, van den Hondel *et al.*, 2000]. Gerade bei der heterologen Expression von Hämproteinen in filamentösen Pilzen, aber auch bei der Expression in *P. pastoris*, konnte die Enzymproduktion oftmals durch Zugabe von Hämoglobin oder anderen Hämverbindungen gesteigert werden [Stewart, Whitwam *et al.*, 1996; Conesa, van den Hondel *et al.*, 2000; Larrondo, Lobos *et al.*, 2001; Gu, Lajoie *et al.*, 2003]. Es handelt sich hierbei jedoch lediglich um eine Steigerung einer bereits ohne Hämzugabe detektierbaren Enzymproduktion. Die spezifische Enzymaktivität wird dabei oftmals nicht erhöht, was vermuten lässt, dass Apoformen der rekombinanten Hämperoxidase während oder nach der Sekretion instabil sind,

und dass nur das Holoenzym im extrazellulären Medium akkumuliert wird [Conesa, van den Hondel *et al.*, 2000]. Als Ursache für die im vorliegenden Fall vollständig ausbleibende heterologe Produktion der Hämperoxidase kann eine mangelnde Verfügbarkeit der prosthetischen Gruppe jedoch kaum herangezogen werden.

Als weitere Ursache für die schwierige heterologe Expression der LiP werden Limitierungen während der Proteinfaltung in Betracht gezogen. Während der Passage sekretorischer Proteine durch das endoplasmatische Retikulum spielen vor allem Chaperone und Foldasen bei der Proteinfaltung- und Maturation eine große Rolle. Wenn im Wirtsorganismus nicht genügend Chaperone exprimiert werden, kann es zu Fehlfaltungen der Peroxidase kommen. So gelang Conesa und Mitarbeitern [2002b] z. B. die Steigerung der Produktion einer MnP aus *P. chrysosporium* in *Aspergillus niger* durch gleichzeitige Überexpression eines Chaperons, das wahrscheinlich die richtige Faltung und Orientierung der Hämgruppe im Protein unterstützt.

Für die eindeutige Klärung der Ursache für die erfolglose heterologe Expression der LiP aus *P. chrysosporium* in den Hefen *P. methanolica* und *P. pastoris* wären weitere umfassende Untersuchungen nötig gewesen. Da jedoch aufgrund der erzielten Ergebnisse wenig Potential in der Expression der LiP in Hefen gesehen wurde, wurde stattdessen die heterologe Expression einer weiteren ligninolytischen Hämperoxidase, der MnP aus *P. chrysosporium*, untersucht. Da diese Peroxidase im Gegensatz zur LiP zumindest schon erfolgreich in verschiedenen Fadenpilzen exprimiert wurde [Larrondo, Lobos *et al.*, 2001; Stewart, Whitwam *et al.*, 1996; Conesa, Jeenes *et al.*, 2002b], erschien die Expression der MnP in einem geeigneten Hefeexpressionssystem als vielversprechend.

3.3 Expression der Manganperoxidase aus *Phanerochaete chrysosporium* in *Kluyveromyces lactis*

Auch für die MnPH4 (*mnp1*) aus *P. chrysosporium* war es Ziel, diese durch heterologe Expression für technische Anwendungen kostengünstig zur Verfügung zu stellen. Die Expression dieses Proteins gelang bisher in den Fadenpilzen *A. nidulans*, *A. niger* sowie *A. oryzae* und in *Amylomyces rouxii* [Larrondo, Lobos *et al.*, 2001; Stewart, Whitwam *et al.*, 1996; Conesa, Jeenes *et al.*, 2002b; Montiel-González, Fernández *et al.*, 2009]. Da Hefen im Vergleich zu Pilzen jedoch genetisch leichter zu manipulieren und besser im industriellen Maßstab kultivierbar sind und sie zudem wesentlich kosteneffektivere Wirte darstellen [Piscitelli, Giardina *et al.*, 2005], sollte hier analog zur Expression der LAC auf ein gut charakterisiertes Hefeexpressionssystem zurückgegriffen werden. In *P. pastoris* wurde MnP bereits exprimiert, allerdings mit einem geringen Expressionslevel (1 mg L^{-1}) und einer starken Hyper-glykosilierung des Proteins [Gu, Lajoie *et al.*, 2003]. Ein *Pichia* Expressionssystem kam daher für die heterologe MnP-Produktion nicht in Frage.

Kluyveromyces lactis (früher: *Saccharomyces lactis*) ist eine Milchhefe, die in der Lage ist Laktose als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen. Sie wird unter Anderem zur Produktion von Chymosin, einem Enzym für die Käseherstellung, im großtechnischen Maßstab eingesetzt und ist daher gut charakterisiert [van den Berg, van der Laken *et al.*, 1990]. Im Vergleich zur Hefe *S. cerevisiae* produziert *K. lactis* rekombinante Produkte oft in besserer Qualität, da eine niedrige Tendenz zur Hyperglykosilierung vorliegt. Zudem ist die Ausbeute an rekombinanten Proteinen oft größer [Gellissen, Hollenberg, 1997; Hsieh, Da Silva, 1998; Dominguez, 2003]. Die LAC aus *Pleurotus ostreatus* konnte im *K. lactis* Expressionssystem z. B. bereits in aktiver Form ohne Hyperglykosilierung exprimiert werden [Piscitelli, Giardina *et al.*, 2005]. Auch eine Vielzahl weiterer eukaryotischer Proteine, wie die Inulinase aus *Kluyveromyces cicerisporus*, das *Mytilus californianus* Fußprotein und eine Domäne der Endoxylanase aus *Neocallimastix frontalis*, konnten bereits in aktiver Form in der Hefe *K. lactis* produziert werden [Yu, Jiang *et al.*, 2010; Platko, Deeg *et al.*, 2008; Durand, Rasclé *et al.*, 1999]. Aus diesen Gründen wurde diese Hefe als Expressionssystem ausgewählt.

3.3.1 Klonierung des Manganperoxidasegens in *K. lactis*

P. chrysosporium wurde unter ligninolytischen Bedingungen kultiviert, die Gesamt-RNA isoliert, die mRNA in einer RT-Reaktion in cDNA transkribiert und diese als Template für eine PCR mit genspezifischen Primern eingesetzt (s. 2.2.4). Das MnP-Gen wurde ohne das natürliche Sekretionssignal des Pilzes amplifiziert und so entstand gemäß den Erwartungen ein 1160 bp großes DNA-Fragment, welches anschließend in den pCR4-TOPO Vektor kloniert wurde. Nach Replikation des pCR4-TOPO/*MnP* Plasmids in *E. coli* Top10 Zellen wurde das Gen in den Hefeexpressionsvektor pKLAC1 (s. Anhang, Abb. 4.6) umkloniert. Das MnP-Gen wurde hierbei downstream des *K. lactis* α -Matingsekretionssignals innerhalb dessen Leserahmens kloniert. Die Expression des resultierenden α -Matingfaktor-Fusionsproteins wird durch den starken *K. lactis* *LAC4* Promotor ($P_{LAC4-PBI}$) gesteuert. Die 5'- und 3'-Enden dieses Promotors sind auf dem pKLAC1 Plasmid durch ein β -Lactamasegen, welches die Ampicillinresistenz für die Selektion von *E. coli* Klonen vermittelt, getrennt. Der pKLAC1/*MnP* Vektor wurde zur Replikation in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert.

Vor der anschließenden Transformation des pKLAC1/*MnP*-Plasmids in die Hefe *K. lactis*, wurde dieses sequenziert. Der Vergleich der Sequenzierung des pKLAC1/*MnP* Vektors und der Sequenz des MnP (*mnp1*) Gens (EMBL Accession Number J04980) ergab, dass von 649 Nukleotiden 646 übereinstimmten. Bei Vergleich der Aminosäuresequenz erscheint jedoch lediglich an Position 116 der MnP-Sequenz eine Nichtübereinstimmung. Anstelle von Serin befindet sich in der ermittelten MnP-Sequenz Asparagin. Diese Differenz fiel bereits bei der vorherigen Sequenzierung des Gens im pCR4TOPO/*MnP* Vektor bei zwei verschiedenen Klonen auf. Da die Differenz der Aminosäuresequenz somit in insgesamt drei Sequenzierungen nachgewiesen wurde ist es wahrscheinlich, dass entweder schon im Ausgangsorganismus oder in einem der ersten PCR-Zyklen eine Punktmutation stattgefunden hat. Beide Aminosäuren gehören zur Gruppe der polaren, ungeladenen Aminosäuren. Bei Asparagin befindet sich eine primäre Carbonsäureamidbindung im Aminosäurerest, wohingegen im Serin eine primäre Alkoholgruppe gebunden ist. Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften wurde eine Fehlfaltung durch den Austausch von Serin gegen Asparagin für unwahrscheinlich gehalten. Die Aminosäure Serin spielt zudem keine Rolle im aktiven

Zentrum der MnP [Sundaramoorthy, Kishi *et al.*, 1994], weshalb auch eine Auswirkung auf die katalytischen Eigenschaften des Enzyms als äußerst unwahrscheinlich erachtet wurde.

Daher wurde der sequenzierte pKLAC1/*MnP* Vektor mithilfe des Restriktionsenzym *SacII* linearisiert und nachfolgend in kompetente *K. lactis* GG799 Zellen transformiert. Durch die Linearisierung der Expressionskassette wird deren Integration in das Hefegenom am *LAC4* Locus durch homologe Rekombination ermöglicht. Ein Acetamidasegen (*amdS*) auf dem pKLAC1 Vektor ermöglicht die Selektion von Hefezellen mit integrierter Expressionskassette über deren Fähigkeit auf Minimalmedium mit Acetamid als einziger Stickstoffquelle zu wachsen. Schon nach einem Tag Inkubationszeit auf dem Selektionsmedium bildete sich ein dichter Zellrasen. Einige Klone wurden auf weiteren Selektionsmedien vereinzelt. Ausgewählte Kolonien wurden einer Colony-PCR mit den Integrationprimern 1 und 2 (s. 2.1.3) unterzogen, wobei der Integrationprimer 1 am *LAC4* Promotor im Hefegenom ansetzt und der Integrationprimer 2 auf dem ersten Teil des pKLAC1-Plasmids. Im Falle einer erfolgreichen Single-copy-Integration der linearisierten Expressionskassette in den Promotor am *LAC4* Locus müsste somit in der Colony-PCR ein 1,9 kb großes Fragment amplifiziert werden. Da dies der Fall war (s. Abb. 3.7), konnte die Integration des linearisierten Vektors in das Hefegenom eindeutig nachgewiesen werden.

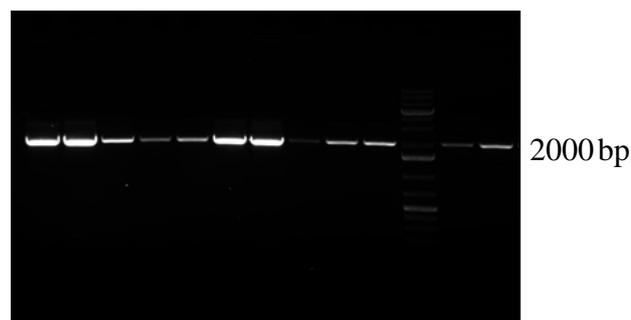


Abbildung 3.7. Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus der Colony-PCR mit ausgewählten *K. lactis* Klonen. Es wurden die Integrationprimer 1 und 2 verwendet. In der dritten Reihe von rechts wurde ein 1 kb DNA Ladder aufgetragen; alle anderen Reihen zeigen Produkte der Colony-PCR.

3.3.2 Expression der Manganperoxidase in *K. lactis*

Ausgewählte positiv getestete Klone wurden in YPGal Flüssigmedium inokuliert, da Galaktose sowie Laktose den P_{LAC4} Promoter induzieren und so eine bis zu 100-fach höhere

Expression erreicht werden kann als in einem glukosehaltigen Nährmedium. Es konnte jedoch selbst nach mehrtägiger Kultivierung keine MnP-Aktivität im Expressionsmedium detektiert werden. Um zu überprüfen, ob das Enzym lediglich in inaktiver Form sekretiert wird oder intrazellulär verbleibt, wurde eine SDS-Gelanalyse durchgeführt (s. Abb. 3.8). Hierbei wurden sowohl der Zellaufschluss als auch das abzentrifugierte Expressionsmedium jeweils nach Kultivierung unter Expressionsbedingungen aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde ein Hefeklon, der mit einem leeren pKLAC1 Vektor transformiert wurde, mitgeführt.

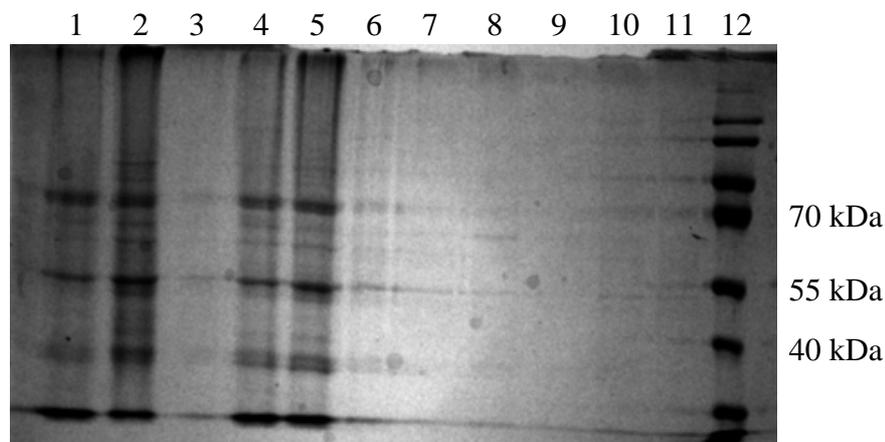


Abbildung 3.8. SDS-Gel Analyse der Zellaufschlüsse von *K. lactis* Klonen und Negativkontrollen und von den jeweiligen Kulturüberständen nach Kultivierung unter Expressionsbedingungen. Reihe 1-3: Zellaufschlüsse verschiedener Hefeklone; Reihe 4-5: Zellaufschlüsse der Negativkontrolle; Reihe 6-9: Kulturüberstand verschiedener Hefeklone; Reihe 10-11: Kulturüberstand der Negativkontrolle; Reihe 12: Proteinmarker.

Sowohl bei der Negativkontrolle als auch bei der transformierten Hefe sind im Überstand des Expressionsmediums kaum sekretierte Proteine zu detektieren. Ein Protein in der Größe der MnP zwischen 40-50 kDa ist nicht sichtbar. Nach Zellaufschluss sind zwar mehrere Proteine auf dem SDS-Gel sichtbar, allerdings ist kein Unterschied zwischen Negativkontrolle und Klonen zu erkennen. Demnach hat keine Überproduktion eines Proteins statt gefunden. Zwischen 40 und 50 kDa ist bei den Hefeklonen, im Vergleich zur Negativkontrolle, keine Überexpression eines Enzyms zu erkennen. Auch zusätzlich durchgeführte Untersuchungen des Zellaufschlusses auf MnP-Aktivität bestätigten, dass die MnP nicht intrazellulär produziert wurde, denn es konnte keinerlei MnP-Aktivität nachgewiesen werden.

Wie bei der Expression der LiP in *P. pastoris* kann auch hier eine nicht-passende Codon Usage des Wirtsorganismus als Ursache für die ausbleibende Expression des Fremdgens ausgeschlossen werden, denn es wurde ein zufriedenstellender CAI von 0,60 ermittelt.

3.3.3 Zusammenfassung

Es bleibt fest zuhalten, dass das Enzym MnP aus *P. chrysosporium* in der Hefe *K. lactis* nicht exprimiert wird. Es konnte eindeutig bewiesen werden, dass die Expressionskassette inklusive MnP-Gen erfolgreich durch homologe Rekombination in das Hefegenom am *LAC4* Locus integriert wurde. Dennoch konnte weder intra- noch extrazellulär MnP-Aktivität oder ein Protein der Größe der MnP nachgewiesen werden.

Die Expression der MnP aus *P. chrysosporium* gelang bisher in den Fadenpilzen *A. nidulans*, *A. niger* sowie *A. oryzae* [Larrondo, Lobos *et al.*, 2001; Stewart, Whitwam *et al.*, 1996; Conesa, Jeenes *et al.*, 2002b]. In *A. niger* wurden dabei gute Produktionslevel zwischen 70-100 mg L⁻¹ erzielt, in *A. nidulans* und *A. oryzae* waren die erreichten Produktionslevel an MnP mit 3-7 mg L⁻¹ bedeutend niedriger. In der Hefe *P. pastoris* konnte die MnP aus *P. chrysosporium* zwar exprimiert werden, allerdings mit einem sehr niedrigen Produktionslevel von ~1 mg L⁻¹. Die Expression in der Hefe *K. lactis* gelang nicht. Für die MnP scheinen Fadenpilze daher die geeigneteren Expressionssysteme zu sein.

Ein möglicher Grund hier für könnte sein, dass filamentöse Pilze posttranslationale Modifikationen wie die korrekte Einbringung der Hämgruppe, Glykosilierung, Proteinfaltung und Sekretion im Falle der MnP besser gewährleisten können als Hefen. Dass Chaperone eine wichtige Rolle bei der Produktion der MnP spielen, belegen Ergebnisse von Conesa und Mitarbeitern [2002b]. Ihnen gelang die Steigerung der Produktion der MnP aus *P. chrysosporium* in *Aspergillus niger* durch gleichzeitige Überexpression eines Chaperons.

Bei allen aufgeführten erfolgreichen heterologen Expressionen der MnP konnte das Produktionslevel durch Zugabe von Häm gesteigert werden. Wie auch bei der LiP handelte es sich dabei jedoch lediglich um eine Steigerung einer auch ohne Zugabe von Häm

vorhandenen Expression. Als Ursache für die vollkommen ausbleibende MnP-Produktion in *K. lactis* kann dies also kaum als Grund angeführt werden.

Eine unpassende Codon Usage der verwendeten Hefe *K. lactis* für das klonierte MnP-Gen aus *P. chrysosporium* konnte als Ursache für die gänzlich ausbleibende Expression ebenfalls ausgeschlossen werden.

In weiteren Experimenten wäre eine Überprüfung der Transkription interessant gewesen. Dabei hätte geprüft werden können, ob das in das Hefegenom integrierte MnP-Gen überhaupt in mRNA transkribiert wird. Wird das MnP-Gen transkribiert, so könnten mangelnde posttranslationale Modifikationen der Hefe eindeutig als Ursache für die gescheiterte Expression der MnP herangeführt werden. Da jedoch aufgrund der erzielten Ergebnisse wenig Potential in Hefen als Expressionssysteme für Hämperoxidasen gesehen wurde, wurde auf die Durchführung weiterer aufwändiger Untersuchungen verzichtet.

3.4 Ausblick

Die heterologe Expression der LAC aus *C. bulleri* gelang im Hefeexpressionssystem *P. pastoris* mit einer exzellenten maximalen vol. Laccaseaktivität. Dies steht im Einklang mit Literaturdaten, da die Gene vieler verschiedener Laccasen aus verschiedenen Pilzen bereits erfolgreich in Hefen exprimiert wurden [Bulter, Alcalde *et al.*, 2003; Jönsson, Saloheimo *et al.*, 1997; Li, Hong *et al.*, 2006; Soden, O'Callaghan *et al.*, 2002]. Die Klonierung und Expression von Laccasen ist also weitaus weniger problematisch als die heterologe Expression der Li- und MnP.

Die Stabilität der rekombinanten LAC gegenüber Chloridionen ist im Vergleich zu anderen Laccasen zufriedenstellend. Für industrielle Anwendungen des Proteins müsste dessen Stabilität gegen Chloridionen jedoch z. B. durch gerichtete Mutagenese noch weiter gesteigert werden. Unter den untersuchten Cosolventien fiel besonders die sehr hohe Halbwertszeit von 88,8 h der LAC bei Inkubation in einem Gemisch aus 50% DMSO und Wasser (v/v) auf. Nachteilig ist, dass alle getesteten Lösungsmittel die LAC inhibieren. Die Inhibierung der LAC durch die verwendeten Cosolventien könnte durch den Einsatz von Zweiphasensystemen wahrscheinlich verringert werden. Durch passende Immobilisierungen der LAC, wie z. B. den Einsatz eines gelstabilisierten Zweiphasensystems, könnte zudem der Einfluss auf die Stabilität der LAC wahrscheinlich minimiert werden. Weitere Forschungen zur Stabilisierung der LAC sind notwendig, bevor diese industriell eingesetzt werden kann.

Für die heterologe Expression der Li- und MnP stellten sich die ausgewählten Hefeexpressionssysteme als ungeeignet heraus. Generell war die heterologe Expression dieser beiden Hämperoxidasen nach dem gegenwärtigen Stand der Literatur bisher kaum erfolgreich. Noch immer ist die umständliche und teure Produktion dieser Biokatalysatoren damit das entscheidende Hindernis für industrielle Anwendungen.

In Zukunft muss es durch weitere Grundlagenforschung gelingen die Ursachen für die großen Probleme der heterologen Expression dieser beiden Hämproteine genau aufzuklären, um leistungsstarke, einfach kultivierbare Expressionssysteme herzustellen. Erst dann können diese wertvollen Oxidoreduktasen im industriellen Maßstab eingesetzt werden und

zukunftsweisende Anwendungen wie die effiziente Nutzung des nachwachsenden Rohstoffes Lignin durch Zerlegung in dessen Phenylpropanoidmonomere erforscht werden.

Aufgrund der komplexen Problematik erscheint es jedoch sinnvoller weitere Grundlagenforschung in Kooperationen zu betreiben. So wird aktuell in Deutschland beispielsweise eine Kooperation der FH Lausitz mit Novozyme A/S, JenaBios und weiteren Industriepartnern von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) gefördert. Dieses Projekt hat zur Aufgabe die industrielle Gewinnung der Hämperoxidasen aus Weißfäulepilzen und deren vielfältige industrielle Anwendungen wie vor allem die Ligninmodifizierung zu erforschen. Die Ergebnisse dieser vielversprechenden Kooperation sind mit Spannung zu erwarten.

4. Anhang

Expression der Laccase aus C. bulleri in P. pastoris

ATGTTCAAGACACTCTACATCTTTACTTTGCTGTCTATCGCCTATGGAGCCATTGGCCCAGTTTTGGATATGCAC
ATAGTGAATAAGGTCATCTCTCCAGATGGCTTTAATCGCTCAGCGGTTCTCGCTGGTGGTACAGCGGATAACGCA
GATTTCCCTGGTCTCTTTGTAAGTGGGAATAAGGGTGATCACTTCCAATAAATGTTATCGACTCCTTAACGGAC
ACTACCATGTTACGGGGCACTAGCATTTCATTGGCATGGCTTGTTCACACATGGCACCACCTGGGCCGATGGTCTT
GTCGGCGTAAACCAATGTCCCATCTCTCCCGGAAACTCGTTCCTGTACGATTTTCAGTGTCCAGACCAGGCCGGA
ACGTTCTGGTATCACTCTCATCACTCTACACAATACTGCGACGGCTTACGAGGACCATTGGTGGTCTACGACCCC
AACGACCCACACAAATCACTGTATGATGTTGACGATGAGTCAACTGTGATCACCTTGCCGATTGGTATCACACA
CCCGCCCCTTCAGCAGGTTTTAGTTCCAATACTGATGCCGTTCTCATCAACGGTAAAGGTCGTTTTCCCAACTGGA
CCCACCTCACCTCTATCTGTAATCAACGTAACCCCGGGCACCAAATACCGCTTCCGCTGGTTTTCAATTTCTGTGC
GATCCCAACTTTGTATTCTCTATCGATGGCCACACATTTACCATCATAGAAGTAGATGGTGTGAATGTTACGCCA
GTCGAAGTTGATTCCATCCAAATCTTCGCTGGGCAGCGGTACTCGTTTTGTTCTGAACGCCAATCAACCAGTGGAT
AACTACTGGATACGTGCTAAACCTAACATCGCCAAAGGTGTAACCTTCGATGGCGGTATCAACTCGGCTATCCTC
CGATATGCCGGTGCACCAGACACCGATCCAACCACCAGCCAAACTCCCAACAGTGCCCCAATGGTTGAGACCGAT
TTGCACCCGCTAGAGAACCCTGGTGCCCCAGGGGGAAGTAACCTGCTGATGTACCTCTCAACTTGGCTATCGCA
TTTTGGTTCCAACCTCAAGTTCACTGTCAATGGAGCAACGTTTCGCACCCCCTAATGTTCCCGTCTTCTTCAGATT
CTCAGTGGCGCGCAGACTGCCCAGGATCTTCTCCCAACCGGAAGCGTATATACGCTGCCAGCAAACAAGGTCATC
GAAATTTCTATCCCCGGCGGCACGACCGGATTCCCCATCCTTTCCATCTTCATGGGCATACATTCGATGTAGTT
CGTAGCGCCGGAAGCAGCGTGTACAACACTACGACAACCCCGTTTCGACGTGATGCTGTCAACACAGGAGGGGCGGGT
GATAATGTTACCATTTCGGTTCTGACGGACAATGCTGGACCGTGGATTCTTCACTGTGCATATTGATTGGCATTTCG
GAACTTGGTCTTGCCATTGTATTTGCAGAAGATGTCCCAACTATTGCAGCATCGAATCCTCCCGATGCCTGGGAT
AATTTGTGTCCAGCCTATGCTACACAGCCAACCGGCACCTGA

Abbildung 4.1. Identifizierte Nukleotidsequenz (GenBank Database Accession Number EU195884) der Laccase aus *Cyathus bulleri*.

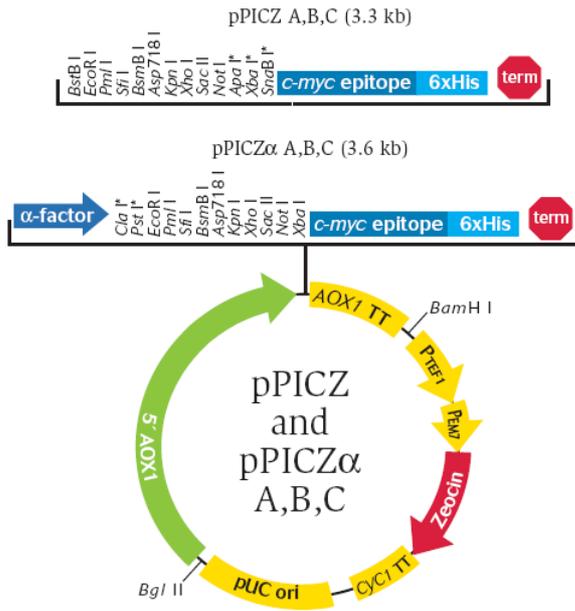


Abbildung 4.2. Vektorkarte der *Pichia pastoris* Hefeexpressionsvektoren pPICZA, B und C und pPICZαA, B und C (Invitrogen).

Expression der LiP aus P. chrysosporium in P. methanolica und P. pastoris

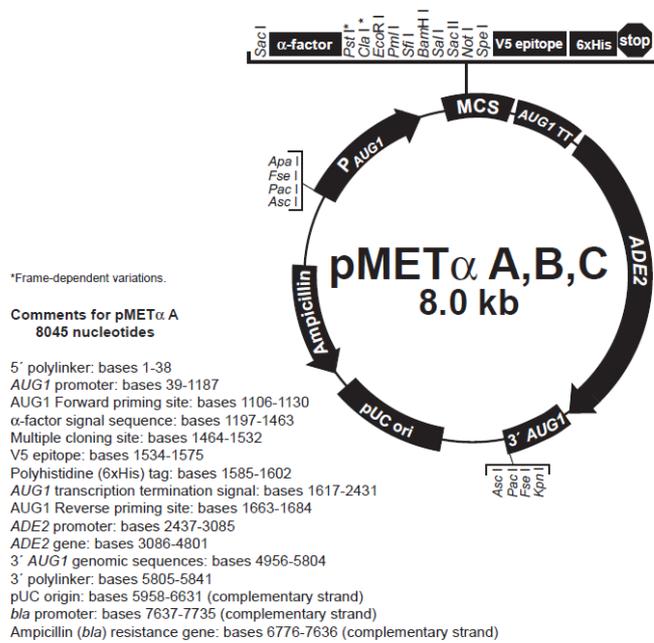


Abbildung 4.3. Vektorkarte des Hefeexpressionsvektors pMETαA, B und C (Invitrogen).

```

1  ATGAGATTTTC CTTCAATTTT TACTGCTGTT TTATTTCGAG CATCCTCCGC
51  ATTAGCTGCT CCAGTCAACA CTACAACAGA AGATGAAACG GCACAAATTC
101  CGGCTGAAGC TGTCATCGGT TACTCAGATT TAGAAGGGGA TTTCGATGTT
151  GCTGTTTTGC CATTTCCTCA CAGCACAAAT AACGGGTAT TGTTTATAAA
201  TACTACTATT GCCAGCATTG CTGCTAAAGA AGAAGGGGTA TCTCTCGAGA
251  AAAGAGAGGC TGAAGCTGAA TTCGCCACCT GTTCCAACGG CAAGACCGTC
301  GCGGATGCGT CGTGCTGCGC TTGGTTCGAC GTCCTGGATG ATATCCAGCA
351  GAACCTGTTC CACGGCGGCC AGTGCGGCGC TGAGGCGCAC GAGTCGATTC
401  GTCTCGTCTT CCACGACTCC ATCGCAATTT CGCCC GCCAT GGAGGCACAG
451  GGCAAGTTCG GCGGCGGTGG TGCTGACGGC TCCATCATGA TCTTCGACGA
501  TATCGAGACT GCGTTCACCC CTAACATCGG TCTCGACGAG ATCGTCAAGC
551  TCCAGAAGCC ATTCGTTTCAG AAGCACGGTG TCACCCCTGG TGACTTCATC
601  GCCTTCGCTG GTGCTGTCGC GCTCAGCAAC TGCCCTGGTG CCCCGCAGAT
651  GAACTTCTTC ACTGGTCGTG CACCTGCTAC CCAGCCCGCT CCTGATGCC
701  TTGTCCCCGA GCCCTTCCAC ACTGTGACCC AAATCATCAA CCGTGTCAAC
751  GACGCAGGCG AGTTCGATGA GCTCGAGCTT GTCTGGATGC TCTCCGCGCA
801  CTCCGTCGCA GCGGTGAACG ACGTCGACCC GACCGTCCAG GGTCTGCCCT
851  TTGACTCGAC CCCCAGGAATC TTCGACTCCC AGTTCTTCGT CGAGACTCAG
901  CTTTCGTGGTA CCGCCTTCCC CGGCTCTGGC GGCAACCAAG GCGAGGTCGA
951  GTCGCCGCTC CCTGGCGAAA TTCGCATCCA GTCCGACCAC ACTATCGCCC
1001  GCGACTCACG CACGGCGTGT GAATGGCAGT CCTTCGTCAA CAACAGTCC
1051  AAGCTCGTCG ATGACTTCCA ATTCATTTTC CTCGCCCTCA CCCAGTCCG
1101  CCAGGACCCG AACGCGATGA CCGACTGCTC GGATGTTATC CCGCAGTCCA
1151  AGCCCATCCC TGGCAACCTC CCATTCTCGT TCTTCCCCGC TGGCAAGACC
1201  ATCAAAGACG TTGAGCAGGC GTGTGCGGAG ACCCCCTTCC CGACTCTCAC
1251  CACTCTCCCG GGCCCCGAGA CGTCCGTCCA GCGCATCCCT CCGCCTCCGG
1301  GTGCTTAA

```

Abbildung 4.4. Nukleotidsequenz des LipH8-Gens kloniert in den pMET α A Hefeexpressionsvektor. Dargestellt ist die Sequenz vom Startcodon des Sekretionssignal bis zum natürlichen Stoppcodon des Gens. Schwarz unterstrichen ist die Sequenz des α -Faktorsignals.

```

ATGAGATTTTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACA
ACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTT
GCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCT
AAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCGCCACCTGTTCCAACGGCAAGACCGTC
GGCGATGCGTCTGCTGCTGCGCTTGGTTCGACGCTCCTGGATGATATCCAGCAGAACCTGTTCCACGGCGGCCAGTGC
GGCGCTGAGGCGCACGAGTCGATTTCGTCTCGTCTTCCACGACTCCATCGCAATTCGCCCGCCATGGAGGCACAG
GGCAAGTTCGGCGGGCGGTGGTGTGCTGACGGCTCCATCATGATCTTCGACGATATCGAGACTGCGTTCACCCCTAAC
ATCGGTCTCGACGAGATCGTCAAGCTCCAGAAGCCATTCGTTTCAGAAGCACGGTGTCAACCCCTGGTGACTTCATC
GCCTTCGCTGGTGTGTCGCGCTCAGCAACTGCCCTGGTGCCCCGAGATGAACTTCTTCACTGGTTCGTCACCT
GCTACCCAGCCCGCTCCTGATGGCCTTGTCCCCGAGCCCTTCCACACTGTGACCAAATCATCAACCGTGTCAAC
GACGCAGGCGAGTTCGATGAGCTCGAGCTTGTCTGGATGCTCTCCGCGCACTCCGTGCGAGCGGTGAACGACGTC
GACCCGACCGTCCAGGGTCTGCCCTTTGACTCGACCCCGGAATCTTCGACTCCAGTTCCTTCGTCGAGACTCAG
CTTCGTGGTACCGCCTTCCCCGGCTCTGGCGGCAACCAAGGCGAGGTCGAGTCGCCCTCCCTGGCGAAATTCGC
ATCCAGTCCGACCACACTATCGCCCGGACTCACGCACGGCGTGTGAATGGCAGTCTTCGTCAACAACAGTCC
AAGCTCGTCGATGACTTCCAATTCATTTTCTCGCCCTCACCCAGCTCGGCCAGGACCCGAACGCGATGACCGAC
TGCTCGGATGTTATCCCGAGTCCAAGCCATCCCTGGCAACCTCCCATTCCTCGTTCCTTCCCCGCTGGCAAGACC
ATCAAAGACGTTGAGCAGGCGTGTGCGGAGACCCCTTCCCGACTCTCACCCTCTCCCGGGCCCCGAGACGTC
GTCCAGCGCATCCCTCCGCTCCGGGTGCTTAA

```

Abbildung 4.5. Nukleotidsequenz des LipH8-Gens kloniert in den pPICZ α A Hefeexpressionsvektor. Dargestellt ist die Sequenz vom Startcodon des Sekretionssignal bis zum natürlichen Stoppcodon des Gens. Schwarz unterstrichen ist die Sequenz des α -Faktorsignals.

Expression der MnP aus P. chrysosporium in K. lactis

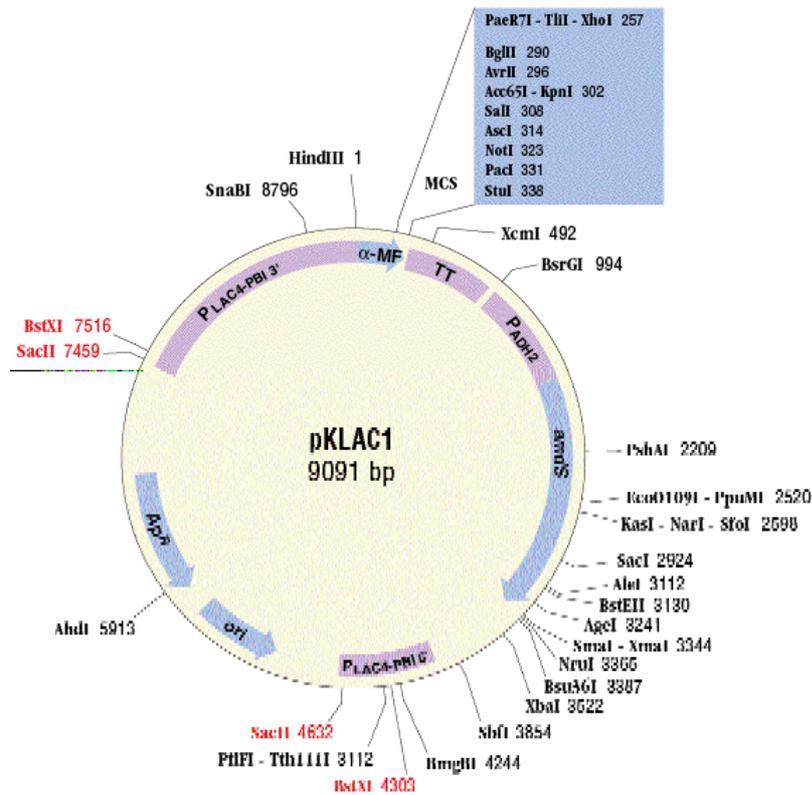


Abbildung 4.6. Vektorkarte des pKLAC1 Hefe-Shuttle-Vektors (New England BioLabs).

```

atgaaattcttactatattagccgcacatctactgctttaatttccggttggtatggctgct
M K F S T I L A A S T A L I S V V M A A
ccagtttctaccgaaactgacatcgacgatcttccaatatcggtccagaagaagccttg
P V S T E T D I D D L P I S V P E E A L
attggattcattgacttaaccggggatgaagtttcccttggtgcctgtaataacggaacc
I G F I D L T G D E V S L L P V N N G T
cacactgggtattctattcttaaacaccaccatcgctgaagctgctttcgcctgacaaggat
H T G I L F L N T T I A E A A F A D K D
gatctcgagaaaagagaggctgaagctagaagagctagatctgcagctgtccagacgggt
D L E K R E A E A R R A R S A V C P D G
actcgcgtcaccaacgcggcgtgctgcgctttcattccgctcgcacaggacttgcaagag
T R V T N A A C C A F I P L A Q D L Q E
actctggtccagggtgactgtggcgaagatgcccacgaagtcacccgtctgaccttccac
T L F Q G D C G E D A H E V I R L T F H
gacgctattgcaatctcccagagcctaggtcctcaggctggcggcgggtgctgacggctcc
D A I A I S Q S L G P Q A G G G A D G S
atgctgcacttcccgacaatcgagcccaacttctccgccaacaacggcatcgatgactcc
M L H F P T I E P N F S A N N G I D D S
gtcaacaacttgcttcccttcatgcagaaacacgacaccatcagtgccgcatcttgta
V N N L L P F M Q K H D T I S A A D L V
cagttcgcgggtgcggtcgcgctgagcaactgccaggtgctcctcgcctcgagttcatg
Q F A G A V A L S N C P G A P R L E F M
gctggacgtccgaacactaccatccccgcagttgagggcctcattcctgagcctcaagac
A G R P N T T I P A V E G L I P E P Q D
agcgtcaccaaaatcctgcagcgttccgaggacgccggcaacttctcgcgcttcgaggtc
S V T K I L Q R F E D A G N F S P F E V
gtctcgtccttggttccacacaccggttgctcgtgcggacaaggctcgacgagaccatcgat
V S L L A S H T V A R A D K V D E T I D
gctgcgccttcgactcgacacccttccacttccgacaccaggtgttccctcgaggctcctg
A A P F D S T P F T F D T Q V F L E V L
ctcaagggcacaggcttcccgggctcgaacaacaacaccggcgaggtgatgtcgcgctc
L K G T G F P G S N N N T G E V M S P L
ccactcggcagcggcagcgcacagggcgagatgcgcctgcagtcaggactttgctcgcg
P L G S G S D T G E M R L Q S D F A L A
cgcgacgagcgcacggcgtgcttctggcagtcggttcgtcaacgagcaggagttcatggcg
R D E R T A C F W Q S F V N E Q E F M A
gcgagcttcaagggcgcgatggcgaagctcgcgatcctcggccacagccgcagcagcctc
A S F K A A M A K L A I L G H S R S S L
atcgactgcagcgcagtcgtccccgtcccgaagcccgcgtcaacaagcccgcgacgttc
I D C S D V V P V P K P A V N K P A T F
cccgcgacgaagggccccaaggatctcgacacactcacgtgcaagggccctcaagttcccg
P A T K G P K D L D T L T C K A L K F P
acgctgacctctgaccccgggtgctaccgagaccctcatccccactgctccaacggcggc
T L T S D P G A T E T L I P H C S N G G
atgtcctgcccgtggtggttcagttcagatggccctgctaa
M S C P G V Q F D G P A -

```

Abbildung 4.7. Sequenzierung des pKLAC1/*MnP* Plasmids vom Startcodon des α -Matingsekretionssignals bis zum natürlichen Stoppcodon des Gens. Die obere Reihe zeigt die Nukleotidsequenz, die untere Reihe zeigt die Aminosäuresequenz.

5. Literaturverzeichnis

- Aifa, M. S., Sayadi, S., Gargouri, A.** [1999]. Heterologous expression of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* **21**: 849–853.
- Andrawis, A., Johnson, K. A., Tien, M.** [1988]. Studies on compound I formation of the lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *The Journal of Biological Chemistry* **263**: 1195-1198.
- Ayala, M., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R.** [2008]. Fungal enzymes for environmental purposes, a molecular biology challenge. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **15**: 172–180.
- Barr, D. P., Aust, S. D.** [1994]. Enzyme degradation of lignin. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **138**: 49–72.
- Ben Younes, S., Mechichi, T., Sayadi, S.** [2007]. Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes. *Journal of Applied Microbiology* **102**: 1033-1042.
- Blanchette, R. A.** [1995]. Degradation of lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany* **73**: 999-1010.
- Blechsmidt, J.** [2009]. Taschenbuch der Papiertechnik. *Carl Hanser Verlag*.
- Blodig, W., Smith, A. T., Doyle, W. A.** [2001]. Crystal structures of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in *Escherichia coli* and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism. *Journal of Molecular Biology* **305**: 851-861.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G.** [1990]. Oxidation of nonphenolic substrates – an expanded role for Laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* **267**: 99-102.
- Brown, A.** [1985]. Review of lignin in biomass. *Journal of Applied Biochemistry* **7**: 371-387.
- Brown, J. A., Glenn, J. K., Gold, M. H.** [1990]. Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* **172**: 3125-3130.
- Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C., Arnold, F. H.** [2003]. Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 987–995.

- Buswell, J. A., Odier, E.** [1987]. Lignin biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology* **6**: 1-60.
- Cambria, M.T., Cambria, A., Ragusa, S., Rizzarelli, E.** [2000]. Production, purification, and properties of an extracellular laccase from *Rigidoporus lignosus*. *Protein Expression and Purification* **18**: 141–147.
- Cassland, P., Jönsson, L. J.** [1999]. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* Laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**: 393-400.
- Cereghino, J. L., Cregg, J. M.** [2000]. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 45-66.
- Chhabra, M., Mishra, S., Sreekrishnan, T. R.** [2008]. Mediator-assisted decolorization and detoxification of textile dyes/dye mixture by *Cyathus bulleri* laccase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **151**: 587-598.
- Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K. H., Piontek, K.** [1999]. The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C^β of tryptophan 171: A novel radical site formed during the redox cycle. *Journal of Molecular Biology* **286**: 809-827.
- Colao, M. C., Lupino, S., Garzillo, A. M., Buonocore, V., Ruzzi, M.** [2006]. Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microbial Cell Factories* **5**: keine Seitenangabe verfügbar.
- Coll, P. M., Fernandez-Abalos, J. M., Villanueva, J. R., Santamaria, R., Perez, P.** [1993]. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 2607-2613.
- Conesa, A., van den Hondel, C. A. M., Punt, P. J.** [2000]. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3016–3023.
- Conesa, A., Punt, P. J., van den Hondel, C. A. M.** [2002a]. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology* **93**: 143–158.
- Conesa, A., Jeenes, D., Archer, D. B., van den Hondel, C. A. M., Punt, P. J.** [2002b]. Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 846–851.

- Couto, R. S., Toca-Herrera, J. L.** [2006]. Laccases in the textile industry. *Biotechnology and Molecular Biology Review* **1**: 115-120.
- Dallas-Yang, Q., Jiang, G., Sladek, F. M.** [1998]. Avoiding false positives in colony PCR. *BioTechniques* **24**: 580-582.
- Dominguez, A.** [2003]. Heterologous protein expression and secretion in nonconventional yeasts. *Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production*: 187-200.
- Dongho, L., Dong-Hyun, K.** [1999]. Heterologous expression of lignin peroxidase H2 in *Escherichia coli*: In vitro refolding and activation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **32**: 486-491.
- Doyle, W. A., Smith, A. T.** [1996]. Expression of lignin peroxidase H8 in *Escherichia coli*: folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and heme. *Biochemical Journal* **315**: 15-19.
- Durand, R., Rascle, C., Fevre, M.** [1999]. Expression of a catalytic domain of a *Neocallimastix frontalis* endoxylanase gene (*xyn3*) in *Kluyveromyces lactis* and *Penicillium roqueforti*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**: 208-214.
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K. E. L.** [1996]. The ligninolytic system of white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1151-1158.
- Enoki, M., Watanabe, T., Nakagame, S., Koller, K., Messner, K., Honda, Y., Kuwahara, M.** [1999]. Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *FEMS Microbiology Letters* **180**: 205-211.
- Eriksson, K.-E. L., Blanchette, R. A., Ander, P.** [1990]. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. *Springer Verlag*.
- Faison, B. D., Kirk, T. K.** [1985]. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 299-304.
- Farnet, A. M., Gil, G., Ferre, E.** [2008]. Effects of pollutants on laccase activities of *Marasmius quercophilus*, a white-rot fungus isolated from a Mediterranean sclerophyllous litter. *Chemosphere* **70**: 895-900.
- Freudenberg, K., Neish, A. C.** [1968]. Constitution and biosynthesis of lignin (molecular biology, biochemistry, and biophysics). *Springer-Verlag New York*: **2**.
- Gachhui, R., Presta, A., Bentley, D. F., Abu-Soud, H. M., McArthur, R., Brudvig, G., Ghosh, D. K., Stuehr, D. J.** [1996]. Characterization of the reductase domain of rat neuronal

nitric oxide synthase generated in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 20594-20602.

Gellissen, G., Hollenberg, C. P. [1997]. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - a review. *Gene* **190**: 87-97.

Gellissen, G. [2000]. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**: 741-750.

Glasser, W. G., Kelley, S. S. [1987]. Lignin. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Wiley-Verlag New York*: **8**.

Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M., Gold, M. H. [1983]. An extracellular H₂O₂ requiring enzyme preparation involved in lignin degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **114**: 1077-1081.

Godden, B., Ball, A. S., Helvenstein, P., McCarthy, A. J., Penninckx, M. J. [1992]. Towards elucidation of the lignin degradation pathway in actinomycetes. *Journal of General Microbiology* **138**: 2441-2448.

Gold, M. H., Wariishi, H., Valli, K. [1989]. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *ACS Symposium Series* **389**: 127-140.

Gold, M. H., Alic, M. [1993]. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews* **57**: 605-622.

Gu, L., Lajoie, C., Kelly, C. [2003]. Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress* **19**: 1403-1409.

Guillen, F., Martinez, A. T., Martinez, M. J. [1992]. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* **209**: 603-611.

Guo, M., Lu, F., Pu, J., Bai, D., Du, L. [2005]. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Trametes versicolor* and heterologous expression in *Pichia methanolica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**: 178-183.

Gutierrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martinez, M. J., Martinez, A. T. [1994]. Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in

ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 1783-1788.

Hammel, K. E., Kalyanaraman, B., Kirk, T. K. [1986]. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[*p*]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *The Journal of Biological Chemistry* **261**: 16948-16952.

Hammel, K. E., Moen, M. A. [1991]. Depolymerization of a syntetic lignin *in vitro* by lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology* **13**: 15-18.

Han, Y., Lei, X. G. [1999]. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (phyA) in *Pichia pastoris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **364**: 83–90.

Han, M.-J., Choi, H.-T., Song, H.-G. [2005]. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *The Journal of Microbiology* **43**: 555-560.

Hatakka, A. [1994]. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* **13**: 125-135.

Higuchi, T. [1990]. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Science and Technology* **24**: 23-63.

Hofrichter, M., Lundell, T., Hatakka, A. [2001]. Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4588-4593.

Holtman, K. M., Chang, H.-M., Jameel, H., Kadla, J. F. [2003]. Elucidation of lignin structure through degradative methods: comparison of modified DFRC and thioacidolysis. *Agricultural and Food Chemistry* **51**: 3535-3540.

Hong, F., Meinander, N. Q., Jönsson, L. J. [2002]. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* **79**: 438–449.

Hong, Y., Xiao, Y., Zhou, H., Fang, W., Zhang, M., Wang, W., Wu, L., Yu, Z. [2006]. Expression of a laccase cDNA from *Trametes* sp. AH28-2 in *Pichia pastoris* and mutagenesis of transformants by nitrogen ion implantation. *FEMS Microbiology Letters* **258**: 96-101.

Hoshida, H., Fujita, T., Murata, K., Kubo, K., Akada, R. [2005]. Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**: 1090–1097.

- Hsieh, H. P., Da Silva, N. A.** [1998]. Partial-pKD1 plasmids provide enhanced structural stability for heterologous protein production in *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **49**: 411–416.
- Johnson, T. M., Li, J. K.** [1991]. Heterologous expression and characterization of an active lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* using recombinant baculovirus. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **291**: 371–378.
- Jönsson, L. J., Saloheimo, M., Penttilä, M.** [1997]. Laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of lcc1 and expression in *Pichia pastoris*. *Current Genetics* **32**: 425–430.
- Kersten, P. J.** [1990]. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 2936-2940.
- Kim, Y.-J., Nicell, J. A.** [2006]. Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. *Bioresource Technology* **97**: 1431–1442.
- Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W. J., Lorenz, L. F., Zeikus, J. G.** [1978]. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology* **117**: 277-285.
- Kirk, T. K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K. E., Farrell, R. L.** [1986]. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial Technology* **8**: 27-32.
- Kirk, T. K., Farrell, R. L.** [1987]. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* **41**: 465-505.
- Kojima, Y., Tsukuda, Y., Kawai, Y., Tsukamoto, A., Sugiura, J., Sakaino, M., Kita, Y.** [1990]. Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *The Journal of Biological Chemistry* **265**: 15224-15230.
- Lanzalunga, O., Bietti, M.** [2000]. Photo- and radiation chemical induced degradation of lignin model compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **56**: 85-108.
- Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C.** [1988]. Thioacidolyses of diazomethane-methylated pine compression wood and wheat straw *in situ* lignins. *Holzforschung* **42**: 409-411.

- Larrondo, L. F., Lobos, S., Stewart, P., Cullen, D., Vicuña, R.** [2001]. Isoenzyme multiplicity and characterization of recombinant manganese peroxidases from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2070–2075.
- Leber, A., Hemmens, B., Klosch, B., Goessler, W., Raber, G., Mayer, B., Schmidt, K.** [1999]. Characterization of recombinant human endothelial nitric-oxide synthase purified from the yeast *Pichia pastoris*. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 37658-37664.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.-S., Hofrichter, M.** [1999]. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* **27**: 175-185.
- Levasseur, A., Piumi, F., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Asther, M., Delattre, M., Henrissat, B., Pontarotti, P., Asther, M., Record, E.** [2008]. FOLy: An integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 638–645.
- Lewis, N. G., Yamamoto, E.** [1990]. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 455-496.
- Li, J. F., Hong, Y. Z., Xiao, Y. Z., Xu, Y. H., Wang, F.** [2007]. High production of laccase B from *Trametes sp.* in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **23**: 741-745.
- Liu, W., Chao, Y., Liu, S., Bao, H., Qian, S.** [2003]. Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fomes lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**: 174-181.
- Lu, L., Zhao, M., Liang, S.-C., Zhao, L.-Y., Li, D.-B., Zhang, B.-B.** [2009]. Production and synthetic dyes decolorization capacity of a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 1149-1156.
- Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas'-Wasilewska, M., Cho, N. S., Rogalski, J., Jaszek, M., Malarczyk, E.** [1998]. Activity of Free and Immobilized Extracellular *Cerrena unicolor* Laccase in Water Miscible Organic Solvents. *Holzforschung* **52**: 589-595.
- Martinez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M. J., Gutierrez, A., del Rio, J. C.** [2005]. Biodegradation of lignocellulosics:

microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* **8**: 195-204.

Mateescu, M. A., Agostinelli, E., Weltrowska, G., Weltrowski, M., Mondovi, B. [1990]. Specific immobilization of laccase on *p*-benzoquinone-activated supports. *Biology of Metals* **3**: 98-102.

Mertens, J. A., Shiraishi, N., Campbell, W. H. [2000]. Recombinant expression of molybdenum reductase fragment of plant nitrate reductase at high levels in *Pichia pastoris*. *Plant Physiology* **123**: 743-756.

Miki, Y., Morales, M., Ruiz-Duenas, F. J., Martinez, M. J., Wariishi, H., Martinez, A. T. [2009]. *Escherichia coli* expression and *in vitro* activation of a unique ligninolytic peroxidase that has a catalytic tyrosine residue. *Protein Expression & Purification* **68**: 208-214.

Montiel-González, A. M., Fernández, F. J., Keer, N., Tomasini, A. [2009]. Increased PCP removal by *Amylomyces rouxii* transformants with heterologous *Phanerochaete chrysosporium* peroxidases supplementing their natural degradative pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**: 335–340.

Nie, G., Reading, N. S., Aust, S. D. [1999]. Relative stability of recombinant versus native peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **365**: 328–334.

Otterbein, L., Record, E., Longhi, S., Asther, M., Moukha, S. [2000]. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *European Journal of Biochemistry* **267**: 1619-1625.

Paszczynski, A., Huynh, V.-B., Crawford, R. L. [1986]. Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **244**: 750-765.

Pease, E. A., Aust, S. D., Tien, M. [1991]. Heterologous expression of active manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* using the baculovirus expression system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **179**: 897–903.

Piscitelli, A., Giardina, P., Mazzoni, C., Sannia, G. [2005]. Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**: 428–439.

Platko, J. D., Deeg, M., Thompson, V., Al-Hinai, Z., Glick, H., Pontius, K., Colussi, P., Taron, C., Kaplan, D. L. [2008]. Heterologous expression of *Mytilus californianus* foot

protein three (*Mcfp-3*) in *Kluyveromyces lactis*. *Protein Expression and Purification* **57**: 57–62.

Pointing, S. B. [2001]. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**: 20–33.

Quaratino, D., Federici, F., Petruccioli, M., Fenice, M., D'Annibale, A. [2007]. Production, purification and partial characterisation of a novel laccase from the white-rot fungus *Panus tigrinus* CBS 577.79. *Antonie van Leeuwenhoek* **91**: 57–69.

Rayner, A. D. M., Boddy, L. [1988]. *Fungal Decomposition of Wood*, Wiley Great Britain.

Reale, S., Di Tullio, A., Spreti, N., De Angelis, F. [2004]. Mass spectrometry in the biosynthetic and structural investigation of lignins. *Mass Spectrometry Reviews* **23**: 87–126.

Record, R., Punt, P. J., Chamkha, M., Labat, M., van den Hondel, C. A. M., Asther, M. [2002]. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *European Journal of Biochemistry* **269**: 602–609.

Reddy, C. A. [1995]. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology* **6**: 320–328.

Robles, A., Lucas, R., Martinez-Cañamero, M., Ben Omar, N., Pérez, R., Gálvez, A. [2002]. Characterisation of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 516–522.

Rodakiewicz-Nowak, J., Kasture, S. M., Dudek, B., Haber, J. [2000]. Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11**: 1–11.

Rosconi, F., Franco Fraguas, L., Martinez-Dretsa, G., Castro-Sowinski, S. [2005]. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme and Microbial Technology* **36**: 800–807.

Ruiz-Duenas, F. J., Martinez, A. T. [2009]. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology* **2**: 164–177.

Saloheimo, M., Barajas, V., Niku-Paavola, M.-L., Knowles, J. K. C. [1989]. A lignin peroxidase-encoding cDNA from the white fungus *Phlebia radiata*: characterization and expression in *Trichoderma reesei*. *Gene* **85**: 343–351.

- Salony, Mishra, S., Bisaria, V. S.** [2006]. Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri* and its use in decolorization of recalcitrant textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**: 646-653.
- Salony, Garg, N., Baranwal, R., Chhabra, M., Mishra, S., Chaudhuri, T. K., Bisaria, V. S.** [2008]. Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics* **1784**: 259-268.
- Schoemaker, H. E.** [1990]. On the chemistry of lignin biodegradation. *Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas* **109**: 255-272.
- Sethuraman, A., Akin, D. E., Eriksson, K.-E. L.** [1999]. Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**: 689-697.
- Singh, G., Sharma, P., Capalash, N.** [2009]. Performance of an alkalophilic and halotolerant laccase from gamma-proteobacterium JB in the presence of industrial pollutants. *The Journal of General and Applied Microbiology* **55**: 283-289.
- Skipper, L., Campbell, W. H., Mertens, J. A., Lowe, D. J.** [2001]. Pre-Steady-State Kinetic analysis of recombinant *Arabidopsis* NADH: Nitrate reductase. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 26995-27002.
- Smith, T. L., Schalch, H., Gaskell, J., Covert, S., Cullen, D.** [1988]. Nucleotide sequence of a ligninase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. *Nucleic Acids Research* **16**: 1219.
- Soden, D. M., O'Callaghan, J., Dobson, A. D. W.** [2002]. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology* **148**: 4003-4014.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., Machonkin, T. E.** [1996]. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* **96**: 2563-2605.
- Stewart, P., Whitwam, R. E., Kersten, P. J., Cullen, D., Tien, M.** [1996]. Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**: 860-864.
- Sugiura, J., Sakaino, M., Kojima, Y., Tsujioka, K., Mutoh, Y., Shinohara, Y., Koide, K.** [1987]. Purification and properties of phenol oxidases produced by white-rot fungi and molecular cloning of phenol oxidase genes. In *International Seminar on Lignin Enzymic and Microbial Degradation. International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Paris. INRA Publications, Versailles, France*, 317-320.

- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M. H., Poulos, T. L.** [1994]. The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 32759-32767.
- Thurston, C. F.** [1994]. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26.
- Tien, M., Kirk, T. K.** [1983]. Lignin degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. *Science* **221**: 661-663.
- Tien, M., Kirk, T. K.** [1984]. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique hydrogen peroxide-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 2280-2284.
- Tsukihara, T., Honda, Y., Sakai, R., Watanabe, T., Watanabe, T.** [2006]. Exclusive overproduction of recombinant versatile peroxidase MnP2 by genetically modified white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biotechnology* **126**: 431-439.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M.** [2000]. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* **72**: 169-183.
- van den Berg, J. A., van der Laken, K. J., van Ooyen, A. J. J., Renniers, T. C. H. M., Rietveld, K., Schaap, A.** [1990]. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Nature biotechnology* **8**: 135-139.
- Vares, T.** [1996]. Dissertation. Ligninolytic enzymes and lignin-degrading activity of taxonomically different white-rot fungi. *University of Helsinki, Finland*.
- Vasdev, K., Kuhad, R. C.** [1994]. Induction of laccase production in *Cyathus bulleri* under shaking and static culture conditions. *Folia Microbiologica (Prague)* **39**: 326-330.
- Vasdev, K., Dhawan, S., Kapoor, R. K., Kuhad, R. C.** [2005]. Biochemical characterization and molecular evidence of a laccase from the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 684-693.
- Vineet, A., Nilanjan, R.** [2008]. Contaminating insert degradation by preincubation colony PCR: A method for avoiding false positives in transformant screening. *Analytical Biochemistry* **375**: 159-161.
- von Heijne, G.** [1986]. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Research* **14**: 4683-4690.

- Wang, H., Lu, F., Sun, Y., Du, L.** [2004]. Heterologous expression of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia methanolica*. *Biotechnology Letters* **26**: 1569–1573.
- Wicklowsky, D. T., Langley, R., Crabtree, S., Detroy, R. W.** [1984]. Degradation of lignocellulose in wheat straw versus hardwood by *Cyathus* and related species (Nidulariaceae). *Canadian Journal of Microbiology* **30**: 632-636.
- Yaver, D. S., Overjero, M. C., Xu, F., Nelson, B. A., Brown, K. M., Halkier, T., Bernauer, S., Brown, S. H., Kauppinen, S.** [1999]. Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase lcc1. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4943–4948.
- Yoshida, M., Ohira, T., Igarashi, K., Nagasawa, H., Aida, K., Hallberg, B. M., Divne, C., Nishino, T., Samejima, M.** [2001]. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **65**: 2050-2057.
- Yu, J., Jiang, J., Fang, Z., Li, Y., Lv, H., Liu, J.** [2010]. Enhanced expression of heterologous inulinase in *Kluyveromyces lactis* by disruption of *hap1* gene. *Biotechnology Letters* **32**: 507-512.

Teil 2 Präparation der BAL für deren chemisch-technische Nutzung

1. Einleitung

1.1 Bedeutung enantiomerenreiner α -Hydroxyketone

Enantiomere unterscheiden sich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften nur in der Wechselwirkung mit linear polarisiertem Licht. Besonders in der pharmazeutischen Industrie sind enantiomerenreine Substanzen jedoch von großer Bedeutung, denn die Enantiomere desselben Wirkstoffes können im Organismus sehr unterschiedliche Wirkungen haben. Vor der Zulassung neuer chiraler Wirkstoffe wird zunächst die Wirkung beider Enantiomere im Organismus untersucht. Generell werden Medikamente vorzugsweise enantiomerenrein auf den Markt gebracht.

Enantiomerenreine α -Hydroxyketone sind wichtige Ausgangssubstrate für viele verschiedene asymmetrische Synthesen und sie sind Struktureinheiten in vielen biologisch aktiven Substanzen [Demir, Hamamci *et al.*, 2002]. Besonders in der chemischen und pharmazeutischen Industrie gelten sie daher als vielseitig einsetzbare Intermediate. So dienen sie z. B. als Vorstufen bei den Synthesen von Vitamin E, L-Ephedrin (bronchienerweiterndes Medikament), Cytosaxon (Inhibitor der Cytokinproduktion), Nitidanin (Behandlung von Leberkrankheiten), Bupropion und dessen Metaboliten (Wirkstoffe in Antidepressiva), Indinavir (HIV Protease Inhibitor) und Amyloid- β -Protein-Inhibitoren (Wirkstoffe gegen Alzheimer) [Janzen, 2002; Stillger, 2004]. Des Weiteren besteht Interesse an der Nutzung von α -Hydroxyketonen als Ausgangsmaterial für die Herstellung biologisch aktiver Substanzen mit Wirkung gegen Pilzbefall [Demir, Sesenoglu *et al.*, 2002] und als Vorstufen bei der Synthese einiger antitumoraler Antibiotika wie Olivomycin A und Chromomycin A₃ eingesetzt [Hoyos, Fernandez *et al.*, 2006].

1.2 Synthese chiraler α -Hydroxyketone

Aufgrund der vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten von α -Hydroxyketonen wurden sowohl chemische als auch biologische Synthesemöglichkeiten intensiv erforscht.

1.2.1 Chemische Synthese

Abbildung 1.1 gibt einen Überblick über chemische Herstellungsmethoden von Acyloinen.

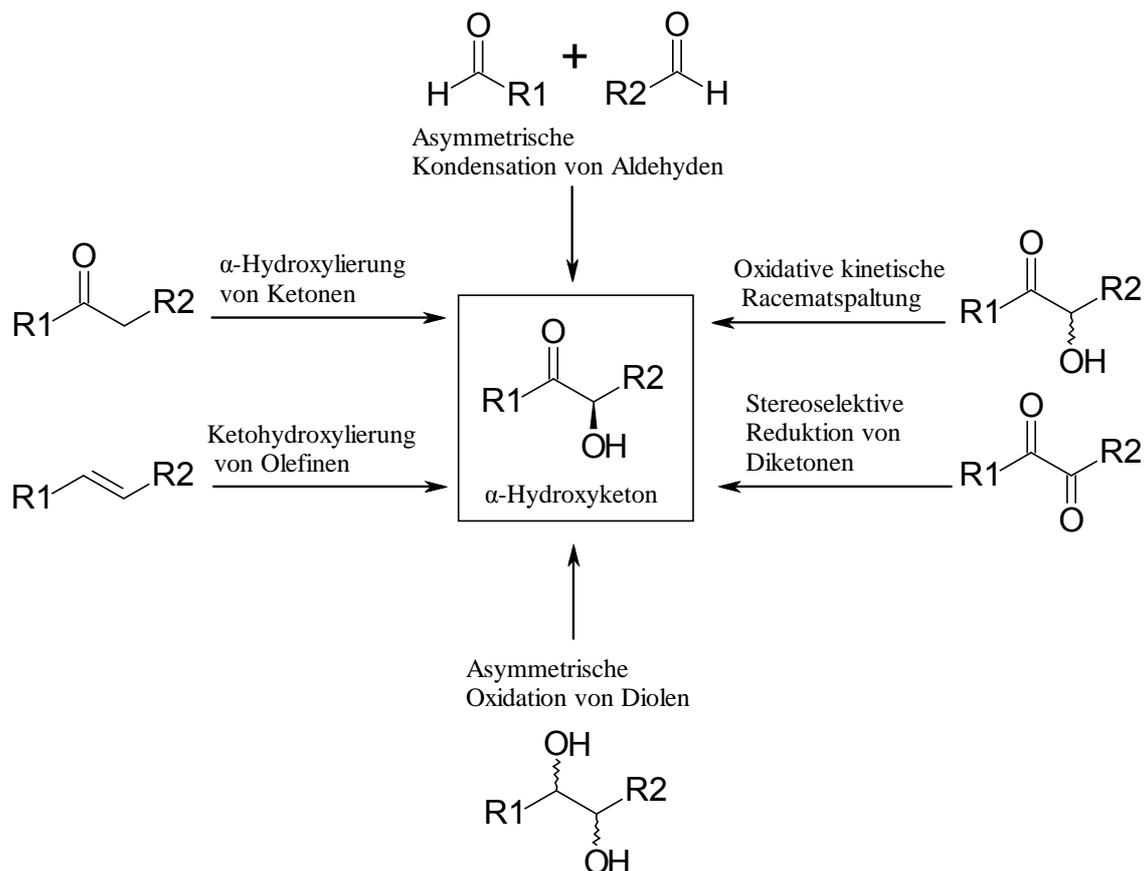


Abbildung 1.1. Schematischer Überblick über chemische Synthesemöglichkeiten von α -Hydroxyketonen. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Hoyos, Sinisterra *et al.* [2010] erstellt.

Eine lang bekannte Syntheseroute ist die Verknüpfung von Aldehyden durch Umpolung mit Cyaniden im Sinne der Benzoinkondensation, deren Mechanismus bereits 1903 von Lapworth vorgeschlagen wurde [Lapworth, 1903]. Anstelle der ursprünglich verwendeten Cyanidionen

können Thiazoliumsalze als Katalysatoren verwendet werden, was eine Reaktionsführung unter milderen Bedingungen ermöglicht [Breslow, 1958]. In beiden Fällen entsteht jedoch lediglich ein racemisches Gemisch. Erst 1966 gelang Sheehan *et al.* durch Verwendung eines chiralen Thiazoliumsalzes als Katalysator eine asymmetrische Variante der Benzoinkondensation [Sheehan, Hunneman, 1966], wobei jedoch lediglich moderate Enantioselektivitäten erreicht werden [Knight, Leeper, 1997]. Beim Einsatz chiraler bicyclischer Triazoliumsalze können signifikant höhere Enantiomerenüberschüsse erzielt werden [Knight, Leeper, 1998; Enders, Kallfass, 2002; Enders, Grossmann *et al.*, 2010].

Eine weitere Möglichkeit der chemischen Synthese optisch aktiver α -Hydroxyketone stellt die oxidative kinetische Racematspaltung dar, wobei bereits chirale Eisen- und Kobalt-Komplexe als Katalysatoren eingesetzt wurden [Muthupandi, Alamsetti *et al.*, 2009; Alamsetti, Muthupandi *et al.*, 2009].

Auch die regio- und enantioselektive Reduktion von Diketonen führt zu chiralen 2-Hydroxyketonen. Hierfür wurden bereits modifizierte Platinkatalysatoren als auch chirale Rutheniumkatalysatoren erfolgreich eingesetzt [Toukoniitty, Maeki-Arvela *et al.*, 2001; Koike, Murata *et al.*, 2000].

Eine weitere Syntheseroute bietet die asymmetrische Oxidation von Diolen durch Dioxyrane [Curci, D'Accolti *et al.*, 1996; Adam, Saha-Möller *et al.*, 1998]. Onomura *et al.* [2007] gelang zudem die asymmetrische Oxidation von 1,2-Diolen bei Verwendung von *N*-Bromsuccinimid in Anwesenheit chiraler Kupferkatalysatoren.

In den letzten Jahren hat sich die Oxidation von Carbonylverbindungen (α -Hydroxylierung) zur Hauptsyntheseroute von α -Hydroxyketonen entwickelt. Hierbei wird eine Carbonylkomponente zunächst in das entsprechende Enolat oder Enamin überführt bevor anschließend die Oxidation der C-C-Doppelbindung erfolgt. Stereoselektive α -Hydroxylierungen begannen mit der Entdeckung chiraler Oxidantien. So wurden für die chirale Oxidation von Enolethern z. B. Osmiumtetroxid in Gegenwart chiraler Auxilliare [Hashiyama, Morikawa *et al.*, 1992], Mangan-(III)-Salen-Komplexe [Adam, Fell *et al.*, 1996; Adam, Fell *et al.*, 1998a], Dioxiranderivate der Fruktose [Adam, Fell *et al.*, 1998b] oder *N*-Sulfonyloxaziridine [Davis,

Chen, 1992] eingesetzt. Ein Durchbruch stellte 1993 die asymmetrische Sharpless-Dihydroxylierung von Silylenolethern dar. Diese Methode ist auf ein breites Substratspektrum anwendbar und so können viele verschiedene enantiomerenangereicherte Acyloine synthetisiert werden [Morikawa, Park *et al.*, 1993]. Marcune und Mitarbeiter [2003] haben diese Methode weiter entwickelt und zeigten, dass lange unverzweigte aliphatische Substituenten am Sauerstoffatom des Enolethers die Enantioselektivität erhöhen.

Ein alternativer katalytischer Ansatz ist die Oxidation von Zinnenolaten an der α -Position mithilfe eines enantiomerenreinen Ag(I)-BINAP-Katalysators, wobei Nitrosobenzen als Sauerstoffdonor genutzt wird. Auf diese Weise können eine Vielzahl neuer α -Hydroxyketone mit moderaten bis exzellenten Enantiomerenüberschüssen gewonnen werden [Momiya, Yamamoto, 2003].

Sowohl die α -Hydroxylierung als auch die Oxidation von Zinnenolaten sind Multi-Schritt-Synthesen, da zunächst isomerenreine Enolether als Vorstufen gebildet werden müssen. Eine neue Strategie ist daher die direkte asymmetrische α -Oxygenierung von Ketonen z. B. in Gegenwart von L-Prolin. Die Kombination der *in situ* Bildung chiraler Enamide und des Nitrosobenzens von Momiya als Sauerstoffdonor erlaubt die Herstellung vieler Acyloine in einem Schritt [Brown, Brochu *et al.*, 2003; Bogevig, Sunden *et al.*, 2004; Hayashi, Yamaguchi *et al.*, 2004]. Unter Verwendung von Alanin als Katalysator kann die α -Oxygenierung von Ketonen sogar mit molekularem Sauerstoff erfolgen, wobei jedoch lediglich moderate Enantiomerenüberschüsse erzielt werden [Sunden, Engqvist *et al.*, 2004].

Neben der α -Hydroxylierung von Carbonylverbindungen stellt die Oxidation von Olefinen, welche als Ketohydroxylierung bezeichnet wird, eine weitere Synthesemöglichkeit von Acyloinen dar. Ketohydroxylierungen gelangen bereits unter Verwendung von KMnO_4 [Baskaran, Das *et al.*, 1989], einem bimetallichen System aus OsO_4 und einem Ni-Katalysator [Takai, Yamada *et al.*, 1991], einer Ru(V)-Oxo-Spezies [Murahashi, Saito *et al.*, 1993], von RuO_4 [Plietker, 2005] und eines 12-Tungstophosphorsäure/Cetylpyridiniumchlorid Systems als Katalysator [Zhang, Shen *et al.*, 2006]. Stereoselektive Ein-Schritt Ketohydroxylierungen gelangen bisher jedoch nicht.

1.2.2 Biokatalytische Synthese

Es gibt also eine Vielzahl verschiedener Möglichkeiten asymmetrische α -Hydroxyketone chemisch zu synthetisieren. Abgesehen von einigen erfolgreichen Beispielen sind chemische Syntheserouten chiraler Acyloine jedoch generell Multi-Schritt-Synthesen, wodurch die Gesamtausbeute verringert wird und die Abfallproduktion steigt. Zudem werden meist lediglich moderate Enantioselektivitäten erzielt.

Aufgrund der genannten Nachteile der chemischen Synthese wurde in der Vergangenheit verstärkt nach biokatalytischen Synthesemöglichkeiten enantiomerenreiner α -Hydroxyketone gesucht. Im Allgemeinen verlaufen enzymkatalysierte Reaktionen hoch regio-, chemo- und stereoselektiv, so dass oft Enantiomerenüberschüsse von über 99% erreicht werden können. Darüber hinaus können die exzellenten Selektivitäten von Biokatalysatoren oft mit ökonomischen und umweltfreundlichen Reaktionsbedingungen kombiniert werden. Optisch aktive α -Hydroxyketone können biokatalytisch mithilfe von Oxidoreduktasen, durch dynamisch kinetische Racematspaltungen (DKR) mithilfe von Hydrolasen und durch die Carboligation mithilfe von Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängigen Lyasen synthetisiert werden.

Die Herstellung enantiomerenangereicherter α -Hydroxyketone durch den Einsatz von Oxidoreduktasen lässt sich prinzipiell in 3 Strategien aufteilen: Dehydrogenase (DH)-katalysierte Reduktion von α -Diketonen, Dehydrogenase- oder Oxidase (Ox)-katalysierte Oxidation von *vic*-Diolen und die Deracemisierung racemischer α -Hydroxyketone.

Stereoselektive Reduktionen von α -Diketonen durch Verwendung verschiedener Mikroorganismen als Katalysatoren wurden bereits vielfach veröffentlicht. So wurden aliphatische α -Diketone z. B. mithilfe von *Saccharomyces cerevisiae* und *Beauveria sulfurens* mit Enantiomerenüberschüssen von bis zu 92% zu α -Hydroxyketonen reduziert [Bel-Rhliid, Fauve *et al.*, 1989]. Besonders zur Synthese beider Benzoinenantiomere durch Reduktion des korrespondierenden α -Diketons wurde viel publiziert. So kann der Pilz *Rhizopus oryzae* beispielsweise abhängig vom pH-Wert sowohl die Reduktion von Benzil zu (*R*)- (*ee* 99%) als auch zu (*S*)-Benzoin (*ee* 80%) katalysieren [Demir, Hamamci *et al.*, 2004].

Zellen des Pilzes *Xanthomonas oryzae* reduzieren Benzil mit einem *ee* von 99% zu (*R*)-Benzoin [Konishi, Ohta *et al.*, 1985]. *Bacillus cereus*, *Pichia glucozyma*, *Aspergillus oryzae* und *Fusarium roseum* katalysieren die Reduktion von Benzil zum (*S*)-Enantiomer mit Enantiomerenüberschüssen von bis zu 99% [Saito, Maruyama *et al.*, 2003; Hoyos, Sansottera *et al.*, 2008; Demir, Ayhan *et al.*, 2008].

Im Vergleich zur DH-katalysierten Reduktion von Diketonen ist die DH- oder Ox-katalysierte Oxidation von *vic*-Diolen zu chiralen α -Hydroxyketonen bisher weniger erfolgreich. So gelingt die Oxidation verschiedener aliphatischer *vic*-Diole zum entsprechenden (*S*)-Enantiomer mithilfe ganzer Zellen des Stammes *Bacillus stearothermophilus* bisher zwar mit hohen Enantiomerenüberschüssen von bis zu 99%, allerdings bei sehr niedrigen Umsätzen von unter 20% [Bortolini, Casanova *et al.*, 1998].

Neben der Reduktion von Diketonen und der Oxidation von *vic*-Diolen ist die enzymkatalysierte Deracemisierung racemischer α -Hydroxyketone eine effektive Methode zur Enantiomerenanreicherung. So katalysiert z. B. das Enzymsystem des Pilzes *Rhizopus oryzae* die chirale Inversion des Benzoins und bildet in Abhängigkeit vom pH-Wert jeweils ein Enantiomer. Für das (*R*)-Enantiomer konnten Enantiomerenüberschüsse bis 99% und für das (*S*)-Enantiomer bis zu 85% erzielt werden [Demir, Hamamci *et al.*, 2002]. Nestl und Mitarbeiter publizierten Racemisierungen mithilfe lyophilisierter ganzer Zellen verschiedener Bakterien, Pilzen und Hefen. Mithilfe dieser Methode können Racemisierungen unerwünschter Enantiomere aus kinetischen Racematspaltungen durchgeführt werden, was sich als hilfreich bei der Synthese vieler strukturell unterschiedlicher α -Hydroxyketone herausstellte [Nestl, Bodlener *et al.*, 2007; Nestl, Voss *et al.*, 2007].

Die Synthese optisch aktiver Acyloine durch Hydrolase-katalysierte kinetische Racematspaltungen wurde schon oft beschrieben. So konnte eine Vielzahl strukturell sehr unterschiedlicher α -Hydroxyketone, was cyclische und aliphatische Produkte [Silva, Kahne *et al.*, 1994; Tanyeli, Demir *et al.*, 1996; Kajiro, Mitamura *et al.*, 1998; Demir, Findik *et al.*, 2004; Tanyeli, Ozdemirhan *et al.*, 2005; Tanyeli, Akhmedov *et al.*, 2006; Adam, Diaz *et al.*, 1998; Scheid, Ruijter *et al.*, 2004; Scheid, Kuit *et al.*, 2004], Alkyl-Aryl- [Ohta, Ikemoto *et al.*, 1986; Gala, DiBenedetto *et al.*, 1996; Demir, Hamamci *et al.*, 1998; Demir, Hamamci

et al., 2001; Jeon, Ko *et al.*, 2007] und Diaryl- α -Hydroxyketone [Aoyagi, Agata *et al.*, 2000; Aoyagi, Iijima *et al.*, 2001] beinhaltet, bereits unter Verwendung verschiedener Lipasen und Esterasen als Biokatalysatoren produziert werden.

Der generelle Nachteil kinetischer Racematspaltungen ist, dass die maximale theoretische Ausbeute auf 50% limitiert ist. In dynamisch kinetischen Racematspaltungen kann diese Limitation umgangen werden, in dem das verbleibende Substrat racemisiert wird und somit theoretische Ausbeuten von 100% erzielt werden können. Ein Beispiel für eine erfolgreiche DKR ist die Kombination des Biokatalysators *Candida antarctica* Lipase B, der die enantioselektive Umesterung der Substrate katalysiert, und des Amberlysts 15, der die Racemisierung des nicht umgesetzten Substrates katalysiert [Ödman, Wessjohann *et al.*, 2005]. Am häufigsten ist die Kombination einer enzymatisch-katalysierten kinetischen Racematspaltung mit einer Übergangsmetall-katalysierten Substratracemisierung. Gängige Übergangsmetallkatalysatoren sind verschiedene Rutheniumkomplexe wie z. B. der Shvokatalysator [Ahn, Ko *et al.*, 2008]. Diese Art der DKR scheitert jedoch, wenn das zu racemisierende Substrat ein nicht-symmetrisches α -Hydroxyketon ist. Aufgrund der Racemisierung über Wasserstofftransfer kommt es zur Bildung eines intermediären Diketons und bei asymmetrischen Substraten letztendlich zur Bildung von Regioisomeren.

Bogar und Mitarbeiter [2007] entwickelten daher eine neue Strategie für eine DKR allylischer Alkohole. Sie kombinierten ebenfalls eine *Candida antarctica* Lipase B-katalysierte enantioselektive Racematspaltung mit einer Rutheniumkomplex-katalysierten Racemisierung des übrig bleibenden Substrates. Anschließend oxidierten sie die enantiomerenreinen acylierten allylischen Alkohole, die in der DKR gebildet wurden, um so optisch aktive nicht-symmetrische Acyloine zu erhalten. Werden dagegen symmetrische Benzoinen als Substrat eingesetzt, so ist die Kombination einer *Pseudomans stutzeri* Lipase-katalysierten enantioselektiven Acylierung des Substrates mit einer Shvo-katalysierten Racemisierung des verbleibenden Alkohols eine besonders effektive DKR. Es konnten hohe Umsätze und exzellente Enantioselektivitäten für ein breites Spektrum symmetrischer Benzoinen erzielt werden [Hoyos, Fernandez *et al.*, 2006].

Ein generelles Problem solcher DKRs ist, dass die Biokatalysatoren bei den oftmals harschen Reaktionsbedingungen, die die Übergangsmetallkatalysatoren für die Racemisierung benötigen, nicht stabil sind. Hoyos und Mitarbeiter [Hoyos, Buthe *et al.*, 2008] milderten dieses Problem beispielsweise durch Immobilisierung des verwendeten Biokatalysators, der Lipase aus *P. stutzeri*, in Silikonkugeln.

Ein sehr vielversprechender Syntheseweg für chirale α -Hydroxyketone ist die Biokatalyse mit ThDP-abhängigen Enzymen wie der Benzaldehydlyase (BAL, EC 4.1.2.38), der Pyruvatdecarboxylase (PDC, EC 4.1.1.1) und der Benzoylformiatdecarboxylase (BFD, EC 4.1.1.7). Diese ThDP-abhängigen Proteine katalysieren sowohl die Bildung von Acyloinbindungen als auch deren Spaltung nicht-hydrolytisch und nicht-oxidativ.

Von den drei genannten Lyasen zeichnet sich die BAL aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I durch ein besonders breites Substratspektrum aus. Neben diversen aliphatischen Aldehyden [Dominguez de Maria, Pohl *et al.*, 2007] akzeptiert die BAL sowohl verschiedene aromatische und heterozyklische Aldehyde mit Substituenten in *ortho*-, *meta*- und *para*-Stellung als auch mehrfach substituierte Aldehyde. Hierdurch ist eine Vielzahl an hoch stereospezifischen Carbolygationen möglich [Demir, Pohl *et al.*, 2001; Demir, Hamaci *et al.*, 2002]. Durch die Kombination zweier aromatischer Aldehyde bzw. die Verknüpfung eines solchen Aldehyds mit einem aliphatischen Aldehyd wird das Produktspektrum um viele weitere asymmetrisch substituierte (*R*)-Benzoinen erweitert. Anstelle der aromatischen Aldehyde können hier auch heterozyklische Aldehyde eingesetzt werden. Der aliphatische Aldehyd dient jeweils als Akzeptor und kann auch längerkettig und ungesättigt vorliegen [Dükelmann, Kolter-Jung *et al.*, 2002; Demir, Findik *et al.*, 2003; Demir, Sesenoglu *et al.*, 2003; Demir, Ayhan *et al.*, 2004].

Als Beispielreaktion der BAL ist in Abbildung 1.2 die Bildung bzw. Spaltung von (*R*)-Benzoin gezeigt. Die BAL ist ein Homotetramer mit jeweils 563 Aminosäureresten pro Untereinheit (MG 58.919 Da), wobei jede Untereinheit mithilfe eines Mg^{2+} -Ions jeweils ein Cofaktormolekül ThDP bindet. Das Proteingerüst des aktiven Zentrums gibt während der Carbolygation die Stereoinformation, sprich die Bildung des (*R*)-Enantiomers, vor. ThDP ermöglicht dagegen die Umpolung am Kohlenstoff der Carbonylfunktion und somit die

Reaktion zum α -Hydroxyketon [Mosbacher, Müller *et al.*, 2005; Maraite, Schmidt *et al.*, 2007].

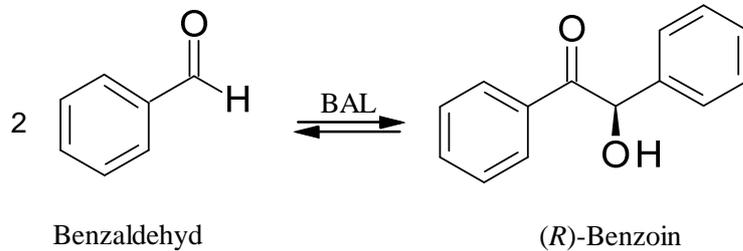


Abbildung 1.2. Benzaldehydase (BAL)-katalysierte Spaltung und Bildung von (R)-Benzoin.

1.3 Reaktionssysteme für den Einsatz organischer Lösungsmittel

In der Entwicklung von biokatalytischen Prozessen wurde lange darauf geachtet, die natürlichen Reaktionsbedingungen der Proteine in der lebenden Zelle nach zu empfinden. Es wurde also hauptsächlich Wasser als Lösungsmittel eingesetzt. Der entscheidende Nachteil der milden wässrigen Reaktionsbedingungen ist jedoch die geringe Löslichkeit hydrophober Reaktanden, was im Vergleich zu klassisch chemischen Verfahren zu erheblich geringeren Substratkonzentrationen bei biokatalytischen Prozessen führt. Dies hat schlechtere Raum-Zeit-Ausbeuten, begrenzte maximale Zyklenzahlen und eine erschwerte Produktaufarbeitung zur Folge.

Eine Alternative zum wässrigen Lösungsmittelsystem stellt der Einsatz nicht-konventioneller Reaktionsmedien wie organischen Lösungsmitteln, überkritischen Fluiden, ionischen Flüssigkeiten oder einer Gasphase dar. Diese unkonventionellen Reaktionsmedien besitzen meist bessere Lösungseigenschaften für hydrophobe Reaktanden und vermeiden zudem hydrolytische Neben- bzw. Folgereaktionen [Adlercreutz, 2000; Kim, Pollard *et al.*, 2007]. Auch die Produktaufarbeitung aus nicht-wässrigen Medien ist häufig mit weniger Aufarbeitungsschritten verbunden [Pollard, Kosjek, 2008]. Zum Teil verändert sich in nicht-wässrigen Medien auch das chemische Gleichgewicht einer Reaktion, so dass sich erhöhte Produktausbeuten ergeben bzw. ganz andere Reaktionen durchgeführt werden können [Halling, 1990; Vermue, Tramper, 1995; Adlercreutz, 2008]. Letztendlich konnten durch die

Verwendung nicht-konventioneller Reaktionsmedien die Einsatzmöglichkeiten vieler Enzyme enorm erweitert werden [Ballesteros, Bornscheuer *et al.*, 1995; Vermue, Tramper, 1995], wobei der Einsatz organischer Lösungsmittel am weitesten verbreitet ist [Carrea, Riva, 2000].

1.3.1 Einphasensystem

Eine Variante organisch/wässriger Reaktionssysteme ist ein Einphasensystem, das aus einer rein organischen Phase besteht. Bei diesem Reaktionssystem wird das Enzym als Lyophilisat oder immobilisiert auf einem Träger in der organischen Phase suspendiert. Die wässrige Phase ist bei solchen Systemen reduziert auf das „Strukturwasser“, das auf der Enzymoberfläche gebunden vorliegt. In diesen Einphasensystemen kann oft eine gesteigerte Proteininstabilität beobachtet werden. Dies ist auf die geringe Solvatisierung der Enzyme in der organischen Phase zurückzuführen, was eine starre Konformation der Proteinmoleküle und eine Einschränkung der konformativen Proteinbeweglichkeit mit sich zieht. Zudem bleiben Reaktionen der Proteinmoleküle mit Wasser wie z. B. die Hydrolyse von Peptidbindungen, die zu einer irreversiblen Desaktivierung der Enzyme führen können, aus [Zaks, Klivanov, 1988]. Entscheidende Nachteile dieses Reaktionssystem sind jedoch, dass die Enzymaktivität aufgrund der starren Proteinkonformation oft herab gesetzt wird oder gar nicht vorhanden ist. Außerdem muss für jede Enzym/Lösungsmittelkombination die optimale Wasseraktivität ermittelt werden und diese durch Zugabe von Additiven eingestellt werden, was zusätzlichen apparativen Aufwand und oftmals eine erschwerte Produktaufreinigung bedeutet.

Aufgrund dessen stellen Einphasensysteme, bestehend aus Wasser und wassermischbaren Löslichkeitsvermittlern, eine bedeutende Alternative dar. Als löslichkeitssteigernde Additive kommen unter anderem Cyclodextrine [Zelinski, Kula, 1997; Zelinski, Liese *et al.*, 1999], wasserlösliche Polymere wie z. B. Polyethylenglycol [Demir, Pohl *et al.*, 2001] sowie wassermischbare organische Lösungsmittel (Cosolventien) wie beispielsweise Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Dimethylformamid (DMF) [Batra, Gupta, 1994; Demir, Sesenoglu *et al.*, 2002; Demir, Sesenoglu *et al.*, 2003; Janzen, Müller *et al.*, 2006] zum Einsatz. Die breiteste Anwendung finden Cosolventien.

Cosolventien vermögen zwar die Löslichkeit hydrophober Substrate und Produkte zu erhöhen, dafür werden jedoch oft eine enzymhemmende Wirkung und eine Herabsetzung der Enzymstabilität beobachtet. Ein weiterer Nachteil ist die oftmals erschwerte Produktaufarbeitung, verursacht durch die schwere Abtrennung des Cosolvens. Bei kontinuierlichen Reaktionsführungen in Einphasensystemen muss zudem generell eine effiziente Enzymrückhaltung, wie sie z. B. in Enzymmembranreaktoren stattfindet, gewährleistet sein. Aufgrund der genannten Nachteile von Einphasensystemen bieten wässrig/organische Zweiphasensysteme eine reizvolle Alternative.

1.3.2 Zweiphasensystem

Zweiphasensysteme aus einer wässrigen und einer Lösungsmittelphase finden häufig Anwendung [Fernandes, Cabral, 2008]. Der Vorteil gegenüber nicht-wässrigen Einphasensystemen besteht darin, dass das Enzym in der oft gepufferten wässrigen Phase vorliegt, während in der nicht-wassermischbaren Lösungsmittelphase die hydrophoben Substrate vorgelegt werden. Im Idealfall erlaubt die organische Lösungsmittelphase zusätzlich eine effektive Extraktion des Produktes aus der wässrigen Phase. Somit liegen Substrate und Produkte in der wässrigen Phase immer nur in geringen Konzentrationen vor, was zur Vermeidung von Substrat- und Produktinhibierungen führt [Vermue, Tramper, 1995; Spiess, Eberhard *et al.*, 2008]. Nicht umgesetztes Substrat diffundiert fortlaufend aus der organischen in die wässrige Phase und bereits umgesetztes Substrat wird in die organische Phase extrahiert. Durch die kontinuierliche Produktextraktion aus der reaktiven Phase können thermodynamische Limitationen der Reaktion überwunden und der Umsatz gesteigert werden [Martinek, Semenov *et al.*, 1981; Eggers, Blanch *et al.*, 1989; Eckstein, Peters *et al.*, 2006; Spiess, Eberhard *et al.*, 2008]. Zudem erleichtert die Aufkonzentrierung des Produkts in der organischen Phase die weitere Produktaufarbeitung [Eckstein, Peters *et al.*, 2006; Ansorge-Schumacher, 2007]. Auch die Integration der enzymatischen Reaktionen in bestehende Prozesse, die häufig in organischen Lösungsmitteln stattfinden, kann unter Umständen durch die kontinuierliche Extraktion sowie die räumliche Trennung von Produkt und Enzym erleichtert werden [Halling, 2002; Spiess, Eberhard *et al.*, 2008; Pollard, Kosjek, 2008].

Zweiphasensysteme können entweder als getrennt voneinander vorliegende Phasen oder als Emulsionen eingesetzt werden. Im erst genannten Fall können aufgrund des ungünstigen Verhältnisses der Phasenvolumina zur Grenzfläche nur geringe Produktivitäten erreicht werden, womit der Einsatz dieses Systems in technischen Prozessen ausgeschlossen ist. In Emulsionssystemen ist die spezifische Grenzfläche sehr viel größer, was einen effektiven Stofftransport zwischen den Phasen gewährleistet und höhere Produktivitäten erlaubt [Ballesteros, Bornscheuer *et al.*, 1995]. Nachteilig ist jedoch, dass für die Aufrechterhaltung der Emulsion ein hoher Energieeintrag nötig ist, weshalb häufig Tenside zur Stabilisierung der Emulsion eingesetzt werden. Die eingesetzten Tenside können sich allerdings nachteilig auf die Enzymstabilität auswirken. Zudem werden die Produktaufarbeitung und Enzymwiedergewinnung durch Tenside behindert [Carvalho, Cabral, 2000]. Auch die Etablierung eines kontinuierlichen Reaktionssystems ist aufgrund der makroskopischen Homogenität der Mikroemulsionen schwierig. Aufgrund der genannten Nachteile werden oftmals gelstabilisierte Zweiphasensysteme eingesetzt.

1.3.3 Gelstabilisiertes Zweiphasensystem

In gelstabilisierten Zweiphasensystemen wird das lösliche Enzym in einer Polymermatrix immobilisiert. Hierbei werden Hydrogele bevorzugt, da sie dem Enzym seine natürliche wässrige Umgebung bieten. In dieser Form können selbst sensible Enzyme für eine Synthese in Lösungsmitteln eingesetzt werden [Ansorge-Schumacher, 2007]. Hydrogel-Immobilisate werden als feste wässrige Phase in organischen Lösungsmitteln suspendiert und ermöglichen eine effektive Abtrennung bzw. Rückhaltung des Katalysators vom Reaktionsmedium. Dadurch wird die Produktaufarbeitung vereinfacht, da das Enzym die produktthaltige organische Phase nicht verunreinigt. Zudem werden der wiederholte Einsatz des Biokatalysators und eine kontinuierliche Reaktionsführung erleichtert. Oftmals kann durch eine Immobilisierung der Biokatalysatoren zudem deren Stabilität gegen technische Anforderungen wie organische Lösungsmittel, Reaktionstemperatur usw. stark gesteigert werden [Ansorge-Schumacher, 2007]. Als nachteilig kann sich bei einem gelstabilisierten Zweiphasensystem jedoch ein verminderter Stofftransport zwischen der wässrigen und der organischen Phase auswirken. Auch der Stofftransport innerhalb der Einhüllungsmatrix kann problematisch sein [Fernandes, Cabral, 2008] und muss im Einzelfall untersucht werden.

1.4 Zielsetzung

Zunächst war es Ziel der vorliegenden Arbeit ein Verfahren zur automatisierten Produktion der sehr aussichtsreichen PVA/PEG-Immobilisate zu entwickeln. PVA/PEG-Hydrogele werden zur Einhüllung vieler verschiedener chemischer und biologischer Katalysatoren genutzt [Lozinsky, Plieva, 1998; Leidig, Prüsse *et al.*, 1999; Szczesna, Galas, 2001; Prüsse, Hörold, 1997; Hischer, Steinsiek *et al.*, 2006; Metrangolo-Ruiz De Temiño, Hartmeier *et al.*, 2005; Plieva, Kochetkov *et al.*, 2000]. Bisher ist die Produktion jedoch ausschließlich manuell im kleinen Maßstab möglich. Aufgrund der hohen Viskosität der PVA/PEG-Lösung ist die manuelle Herstellung problematisch und es entstehen nicht standardisierte Immobilisate. Diese Gründe verhindern bis heute industrielle Anwendungen von PVA/PEG-Immobilisaten. In der vorliegenden Arbeit war es daher Ziel, durch den Entwurf einer geeigneten Apparatur eine automatisierte Produktion von im Hinblick auf Größenverteilung, Form und Gelmorphologie genau definierten PVA/PEG-Polymermatrices im Labormaßstab zu ermöglichen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Möglichkeiten der Optimierung für die technische Anwendung der BAL aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I zur Bereitstellung enantiomerenreiner α -Hydroxyketone zu untersuchen. Die technische Anwendung dieser interessanten Lyase ist bis heute aufgrund der sehr hydrophoben Reaktanden und der daraus resultierenden geringen Löslichkeit in wässrigen Medien limitiert. Demir und Mitarbeiter konnten die Löslichkeit der Reaktanden durch den Einsatz von Löslichkeitsvermittlern wie DMSO (20%, v/v) zumindest teilweise erhöhen [Demir, Sesenoglu *et al.*, 2002]. Die meist niedrigen Produktivitäten und die aufgrund des schwer abtrennbaren Cosolvens komplizierte Produktaufarbeitung verhindern jedoch industrielle Anwendungen eines solchen Einphasensystems.

Hischer und Mitarbeiter [2005] zeigten, dass im Fall der BAL ein gelstabilisiertes Zweiphasensystem mit PVA/PEG-Hydrogelen eine effektive Alternative ist. Im Vergleich zum Einphasensystem mit 20% DMSO (v/v) als Cosolvens konnte für die BAL-katalysierte Synthese des α -Hydroxyketons (*R*)-2,2'-Furoin im PVA/PEG-gelstabilisierten Zweiphasensystem eine 3fach höhere Produktivität erzielt werden [Hischer, Gocke *et al.*, 2005].

Ansorge-Schumacher und Mitarbeiter [2006] erweiterten dieses Reaktionskonzept zu einem kontinuierlich betriebenen Wirbelschichtreaktor, wobei als technisch relevante Modellreaktion ebenfalls die Synthese von (*R*)-Furoin diente.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Möglichkeiten der Optimierung dieses Prozesses anhand eines Lösungsmittelwechsels ermittelt. Der Lösungsmittelwechsel erfolgte vom bisher stets verwendeten sehr apolaren *n*-Hexan [Ansorge-Schumacher, Greiner *et al.*, 2006] hin zu polarerer Lösungsmitteln, die das Produkt besser lösen und eine höhere Extraktionskraft für dieses besitzen. Hierdurch sollte der Umsatz gesteigert und gleichzeitig hohe Enantiomerenüberschüsse erzielt werden. Als zusätzliche Optimierungsoption wurde im Wirbelschichtreaktor eine Variante der BAL eingesetzt, die eine erhöhte Lagerstabilität gegen verschiedene organische Lösungsmittel aufweist [van den Wittenboer, 2009].

Des Weiteren wurde zum ersten Mal das sterisch sehr anspruchsvolle chirale α -Hydroxyketon (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin durch Kombination einer Palladium (Pd)-katalysierten Kreuzkupplung und einer BAL-katalysierten Carboligation synthetisiert. Der Plan war, dass die BAL hierbei die Carboligation zweier 4-Biphenylcarboxaldehyde zu (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin stereoselektiv katalysiert. Das Substrat 4-Biphenylcarboxaldehyd sollte zuvor aus der einfachen Vorstufe 4-Brombenzaldehyd durch Pd-katalysierte Suzuki-Kupplung aufgebaut werden. Zunächst wurde die Suzuki-Kupplung mit dem verwendeten Bis-(triphenylphosphin)-palladiumchlorid Katalysator und anschließend die BAL-katalysierte Carboligation hinsichtlich Ausbeute und *ee* charakterisiert und optimiert. Hierbei war es Ziel, beide Reaktionen nach Möglichkeit ohne Zwischenaufreinigung als Eintopfsynthese durchzuführen. Hierdurch sollten Zeit, Geld- und Energieressourcen eingespart werden, wobei letzteres besonders im Hinblick auf „green chemistry“ von Interesse ist.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Benzoin	99%, Fluka, (Neu-Ulm)
Benzaldehyd	99%, Sigma Aldrich (Steinheim)
4-Biphenylcarboxaldehyd	99%, Sigma Aldrich (Steinheim)
4-Brombenzaldehyd	99%, Sigma Aldrich (Steinheim)
Chloroform-D1	99,8%, Merck (Darmstadt)
Chloroform	Rotisolv, Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylformamid	99,8%, Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid	99,5%, Riedel-de-Häen (Seelze)
Ethylacetat	99,8% Merck (Darmstadt)
2-Furaldehyd	99%, Sigma Aldrich (Steinheim)
2,2'-Furoin	98%, Sigma Aldrich (Steinheim)
Imidazol	99%, Carl Roth (Karlsruhe)
IPTG	99%, Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Rotisolv, Carl Roth (Karlsruhe)
Kieselgel 60	Merck (Darmstadt)
2-Methyltetrahydrofuran	99%, Sigma Aldrich (Steinheim)
Nicotinamidandeninucleotid	95%, Fluka (Neu-Ulm)
Natriumcarbonat	99,5%, Fluka (Neu-Ulm)
<i>n</i> -Hexan	Rotisolv, Carl Roth (Karlsruhe)
Polyethylenglycol 1000	Fluka (Neu-Ulm)
PVA Mowiol 10–98 (Polymerisationsgrad: 1400)	Fluka (Neu-Ulm)
Phenylboronsäure	95%, Sigma Aldrich (Steinheim)
Thiamindiphosphat	95%, Fluka (Neu-Ulm)
<i>tert</i> -Butylmethylether	Rotisolv, Carl Roth (Karlsruhe)
Tetrahydrofuran	Rotisolv, Carl Roth (Karlsruhe)

Triphenylphosphin

99%, Sigma Aldrich (Steinheim)

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen, alle mindestens analysenrein (p.a.).

2.1.2 Katalysatoren

Bereitstellung der nativen BAL und der BAL-Variante(VI75N, I176D, I177T)

Die native BAL wurde in dem rekombinanten Stamm *E. coli* SG13009 (pBAL-His6) exprimiert, aufgereinigt und lyophilisiert. Der rekombinante Stamm wurde freundlicherweise vom Lehrstuhl für Biotechnologie der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt.

Für die Fermentation dieses rekombinanten Stammes wurden zunächst Vorkulturen in 250 mL Schüttelkolben in LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 125 rpm und 37 °C inkubiert. Die Selektion erfolgte über Zusatz von 25 µg mL⁻¹ Kanamycin und 100 µg mL⁻¹ Ampicillin. Anschließend wurde ein 5 L-Reaktor 1:50 mit den Vorkulturen inokuliert. Das Medium setzte sich aus 40 g L⁻¹ Glycerin, 40 g L⁻¹ Hefeextrakt, 3,1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 6,7 g L⁻¹ Na₂HPO₄, 0,5 g L⁻¹ NaCl und 1,5 g L⁻¹ MgSO₄*7H₂O zusammen. Auch hier wurde über die Zugabe von Kanamycin und Ampicillin selektiert. Die Hauptfermentation wurde zunächst bei 37 °C durchgeführt. Der pH-Wert wurde durch 1 M Phosphorsäure bzw. 12,5%-iges Ammoniumhydroxid ausgeglichen und konstant bei 7,0 geregelt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde auf einen Sättigungspartialdruck von 30% eingestellt, indem die Rührerdrehzahl kaskadisch geregelt wurde. Der Verlauf der Fermentation wurde durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm verfolgt. Nachdem die OD einen Wert von 10 erreichte, wurde die Enzymexpression durch Zugabe von 0,8 mM IPTG induziert. Anschließend wurde die Temperatur auf 32 °C erniedrigt, um die Bildung von Einschlusskörpern zu verhindern. Die Fermentation wurde 5 h nach der Induktion abgebrochen. Anschließend wurde die Fermentationsbrühe 20 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Zellpellet wurde gelöst, mit 1 mg mL⁻¹ Lysozym 30 min lang behandelt und per Ultraschall aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurde das lösliche Enzym durch

Zentrifugation (10.000 g, 30 min) vom Rohextrakt abgetrennt. Als Hexahistidin-Fusionsprotein wurde die BAL mit einer IMAC-Matrix (NTA Superflow) von Fremdproteinen aufgereinigt. Für die chromatographische Trennung wurde das Standardprotokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden) verwandt. Um die hohen Imidazolkonzentrationen aus den BAL enthaltenden Fraktionen zu entfernen, wurde die Enzymlösung anschließend gegen 2 L Puffer über einen Zeitraum von 24 h dialysiert. Die Ausschlussgröße des Dialyseschlauchs betrug 20 kDa. Als Puffer wurde 10 mM KPi, pH 7,0 benutzt, der während der Dialyse zweimal erneuert wurde. Für die Stabilisierung der BAL wurden jeweils 0,25 mM ThDP und MgSO₄ hinzugegeben. Alle Schritte, mit Ausnahme der Chromatographie, wurden bei 4 °C durchgeführt.

Zuletzt wurde die erhaltene Lösung eingefroren (-20 °C) und lyophilisiert. Das BAL-Lyophilisat wurde bei -20 °C gelagert. Die erfolgreiche Aufreinigung der BAL mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese nachgewiesen. Da keine anderen Banden als die der BAL auf dem Gel ausgeprägt waren, wurde angenommen, dass das Lyophilisat vollständig aus diesem Enzym bestand.

Die Expression der BAL-Variante(V175N, I176D, I177T) erfolgte mittels der entsprechenden *E. coli* Zellen (erhalten von Dr. A. van den Wittenboer, RWTH Aachen) in Schüttelkolben in einem Maßstab von 0,2-1 L. Als Medium wurde LB-Amp/Kan Medium verwendet. Die Hauptkulturen wurden 1:50 mit einer Übernacht-Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 120 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1 inkubiert. Die Expression wurde durch 1 mM IPTG induziert und erfolgte für 6 h bei 28 °C und 90 rpm. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (30 min, 10.000 g, 4 °C), in 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert und erneut zentrifugiert (25 min, 15.000 g, 4 °C). Zellaufschluss und Proteinaufreinigung fanden analog zur Aufreinigung der nativen BAL statt.

HL-ADH

Evocatal (Düsseldorf)

Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)chlorid

98%, Sigma Aldrich (Steinheim)

2.1.3 Geräte

Technischer Aufbau für die automatisierte Produktion von PVA/PEG-Immobilisaten

Der Mikro-Flüssigkeits-Dispenser SMLD 300G wurde bei der Fritz Gyger AG (Thun-Gwatt, Schweiz) gekauft. Das gesamte elektronische Equipment wurde von den Universitätswerkstätten der RWTH Aachen und der TU Berlin gebaut. Wacker AP 100 Silikonöl (Wacker Chemie AG, Burghausen) wurde als Aushärtungsflüssigkeit für die PVA/PEG-Lösung verwendet. Für die Temperierung der Aushärtungsflüssigkeit wurde ein Thermostat (RE300, Ecoline Staredition) mit einem externen Temperatursensor der Firma Lauda (Lauda-Königshofen) mit Silikonöl M10 (Carl Roth, Karlsruhe) als Kühlflüssigkeit verwendet. Der doppelwandige Probenbehälter wurde durch einen angeschlossenen Wasserbadthermostaten temperiert (MgW Thermo-star C3, Lauda, Lauda-Königshofen).

Sonstige Geräte

Fermenter	Biostat B Plus, Sartorius (Göttingen)
GC	GC2010, Shimadzu (Duisburg)
Glovebox	GS Glovebox Systemtechnik GmbH (Malsch)
HPLC	Smartline Manager 5000, Smartline Pump 1000, Smartline UV Detector 2600, Knauer (Berlin)
NMR-Spektrometer	400 MHz, Bruker
Rotationsverdampfer	Büchi (Zürich, Schweiz)
Überkopfschüttler	REAX 2, Heidolph Instruments (Schwabach)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der PVA/PEG-Immobilisate

Herstellung der PVA/PEG-Lösung

PVA Mowiol 10–98 (Polymerisationsgrad: 1400) und PEG 1000 wurden jeweils zu 10% (w/v) in destilliertem Wasser bei 90 °C gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur wurden 30 mg NaOH pro g PVA hinzugegeben und die Lösung 30 min gerührt,

um eine vollständige Saponifikation zu ermöglichen. Anschließend wurde der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf 8,0 eingestellt.

Für die Herstellung von PVA/PEG-BAL-Immobilisaten wurden neun Teile dieser Lösung und ein Teil destilliertes Wasser, welches die gelösten Cofaktoren Mg^{2+} und ThDP und BAL-Lyophilisat enthielt, vermischt. Hierdurch ergaben sich folgende Endkonzentrationen: 9% (w/v) PVA/PEG, $2,5 \text{ mmol L}^{-1} Mg^{2+}$, $0,1 \text{ mmol L}^{-1} ThDP$ und $5 \text{ U mL}^{-1} BAL$. Für die Herstellung von PVA/PEG-Kugeln ohne Enzym wurde analog verfahren, nur dass in diesem Fall neun Teile der PVA/PEG-Lösung mit einem Teil destilliertem Wasser ohne Enzym und Cofaktoren gemischt wurden.

Wurden die PVA/PEG-Immobilisate manuell produziert, so wurde diese Lösung mithilfe einer Multipette (Eppendorf, Hamburg) in -25 °C kaltes Wacker AP 100 Silikonöl (Wacker Chemie AG, Burghausen), das sich in einem Becherglas befand, getropft. Das Becherglas wurde in einen Styroporbehälter platziert, um ein Erwärmen des Silikonöls hinauszuzögern. In der Regel wurde ein Eintropfvolumen von $20 \text{ }\mu\text{L}$ gewählt. Abschließend wurden die Kugeln bei 4 °C über Nacht langsam aufgetaut und am nächsten Tag nach kurzem Abwaschen des Silikonöls mit *n*-Hexan unmittelbar eingesetzt. So manuell produzierte PVA/PEG-Kugeln hatten einen Durchmesser von 2,8 mm. Der Faktor für die Rundheit lag zwischen 0,83-0,87 und der für die Kompaktheit zwischen 0,97-0,98 (s. 2.2.2).

Wurden die PVA/PEG-Immobilisate automatisch produziert, so wurde die PVA/PEG-Lösung in den Probenbehälter eingefüllt. Mit Stickstoff wurde ein Druck von 5 bar beaufschlagt und die Lösung in das -25 °C Silikonölauffangbad dosiert. Das Tropfenvolumen war dabei frei wählbar. Nach Beendigung der Dosierung wurde das Silikonölbad schrittweise auf 20 °C erwärmt.

2.2.2 Analyse der PVA/PEG-Immobilisate

Für die Analyse der Größenverteilung der PVA/PEG-Kugeln wurden diese aus dem Silikonölbad entnommen, mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend gesiebt

(ISO 3310/1, Retsch, Haan). Die Ausschlussgrößen beim Sieben betragen 5,00, 4,00, 3,55, 3,15, 2,50, 2,00, 1,40, 1,00, 0,80, 0,60, 0,50, 0,40, 0,30 und 0,10 mm.

Für die Formanalyse der PVA/PEG-Kugeln wurden diese in einer wässrigen Ethanollösung (20%, v/v) mit 0,1% (w/v) Bromkresolgrün für 30 Sekunden angefärbt. Anschließend wurde ein digitales Foto aufgenommen (SP-500UZ, Olympus), welches mit der Software GIMP (Version 2,0) in ein Graustufenbild mit maximalem Kontrast konvertiert wurde. Die Form der Kugeln wurde danach mithilfe der Software Image Tool (Version 3,0) analysiert, wobei die Form mithilfe der Rundheit und der Kompaktheit beschrieben wurde. Die Rundheit ist definiert als $(4 \cdot \pi \cdot \text{Fläche} / \text{Umfang}^2)$, wobei der Umfang die Länge der Außengrenze des untersuchten Objekts ist. Die Kompaktheit ist definiert als $(4 \cdot \text{Fläche} / \pi)^{1/2} / \text{Hauptachsenlänge}$. Beide Parameter streben umso stärker auf einen Wert von 1 zu, je näher das Objekt einer idealen runden Form ist.

Für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden die PVA/PEG-Kugeln durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Gefriertrocknen vorbereitet. Die Rasterelektronenmikroskopie wurde in einem S-2700 Instrument (Hitachi) bei einer Akzelerationsspannung von 20 kV durchgeführt. Die Proben wurden auf einer doppelseitigen Adhäsivklebefolie fixiert und mit einem dünnen Goldfilm gesputtert.

Für die Untersuchung des Diffusionsverhaltens des PEG 1000 zwischen der PVA-Matrix und der umgebenden Flüssigkeitsphase wurden jeweils 2 g manuell produzierter PVA/PEG-Immobilisate (s. 2.2.1) in 8 mL destilliertem Wasser, Silikonöl, *n*-Hexan, MTBE bzw. MIBK 3 Tage lang bei Raumtemperatur in verschlossenen Glasgefäßen (CS Chromatographie, Langerwehe) inkubiert. Am ersten Tag wurde nach 2, 4 und 6 h Inkubation sowohl eine PVA/PEG-Kugel als auch das jeweilige Lösungsmittel mittels FT-IR Spektroskopie (Spectrum One, Universal ATR Sampling Accessory, Perkin Elmer) analysiert. Am Tag 2 und 3 wurde jeweils nur eine Probe der Immobilisate und des Lösungsmittels analysiert.

2.2.3 BAL-Aktivitätstests

Aktivitätsvergleich zwischen manuell und automatisch produzierten PVA/PEG-BAL-Kugeln

Lyophilisierte BAL (s. 2.1.2) wurde mit einer Beladung von $0,5 \text{ U mL}^{-1}$ manuell und automatisch in PVA/PEG-Kugeln immobilisiert (s. 2.2.1). Die BAL-Aktivität beider Immobilisatchargen wurde über die Enzym-katalysierte Carboligation zweier Benzaldehyde zu Benzoin via Gaschromatographie (s. 2.2.12) verfolgt. Die Reaktionen wurden bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ in geschlossenen Glasgefäßen mit 17 g der jeweiligen PVA/PEG-BAL-Kugeln und 10 mL einer 200 mM Benzaldehydlösung in MTBE durchgeführt.

Gekoppelter Aktivitätstest der BAL

Zur Bestimmung der volumetrischen BAL-Aktivität wurde der gekoppelte Aktivitätstest verwendet. Hierbei wird die Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber (HL-ADH) als Hilfsenzym eingesetzt. Die BAL setzt zunächst das Substrat Benzoin zu zwei Benzaldehydmolekülen um, die anschließend von der HL-ADH zu Benzylalkohol reduziert werden. Bei der Reduktion wird Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH_2) äquimolar zu NAD^+ oxidiert (s. Abb. 2.1).

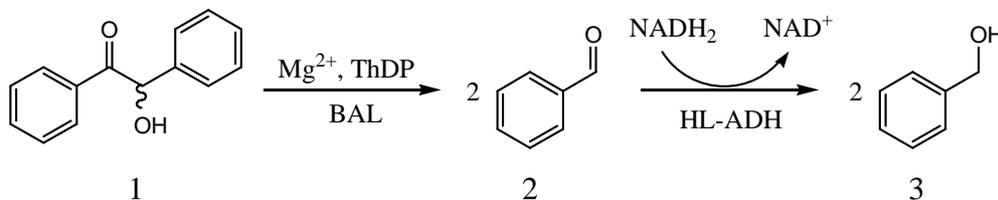


Abbildung 2.1. Reaktionsschema des gekoppelten Aktivitätstest der BAL.
1: racemisches Benzoin; 2: Benzaldehyd; 3: Benzylalkohol.

Die Abnahme des Cofaktors NADH_2 kann photometrisch bei 340 nm verfolgt werden. Die HL-ADH wird bei diesem BAL-Aktivitätstest im Überschuss zugesetzt, um eine quantitative Reduktion zu gewährleisten. Für die Berechnung der volumetrischen BAL-Aktivität ergibt sich folgende Formel:

$$\text{Akt.}_{\text{vol.}} [\text{U mL}^{-1}] = \frac{\Delta E * V_{\text{ges.}}}{V_{\text{Probe}} * \epsilon_{\text{NADH}} * d} * \frac{1}{2} * f,$$

wobei ΔE die gemessene Extinktionsabnahme pro Minute, $V_{ges.}$ das Gesamtvolumen in der Küvette (1 mL), V_{Probe} das Volumen der Enzymlösung in der Küvette (0,05 mL), ϵ_{NADH} der molare Extinktionskoeffizient des NADH₂ bei 340 nm ($\epsilon_{340\text{ nm}} = 6,3 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) und d die Schichtdicke der Küvette (1 cm) ist. Die Multiplikation mit dem Faktor $\frac{1}{2}$ ergibt sich aus der Stöchiometrie der Reaktionsgleichung (s. Abb. 2.1). Gegebenenfalls muss mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor f multipliziert werden.

Der Aktivitätstest wurde bei 30 °C unter ständigem Rühren in einer 1 mL Quarzglasküvette (Hellma, Müllheim) durchgeführt. Benzoin wurde in einer Endkonzentration von 1,5 mM in 8,5 mL 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,0), der 15% (v/v) PEG 400, 2,5 mM MgSO₄ und 0,1 mM ThDP enthielt, gelöst. 850 µL dieser Lösung wurden in der Küvette mit 50 µL einer HL-ADH-Lösung (5 U mL⁻¹) und 50 µL einer 7 mM NADH₂-Lösung gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µL BAL-Enzymlösung gestartet und die Abnahme der Extinktion über mindestens 2 min verfolgt.

2.2.4 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Der Verteilungskoeffizient eines Stoffes in einem Zweiphasensystem, bestehend aus einer organischen Phase und einer wässrigen Phase, ist definiert als

$$P_{\text{org/wässrig}} = \frac{c_{\text{org.}}}{c_{\text{wässrig}}},$$

wobei $c_{\text{org.}}$ die Konzentration des Stoffes in der organischen Phase und $c_{\text{wässrig}}$ die Stoffkonzentration in der wässrigen Phase ist.

Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten des Eduktes 2-Furaldehyd wurde dieses in folgenden Konzentrationen in dem jeweiligen Lösungsmittel (*n*-Hexan, MIBK oder MTBE) vorgelegt: 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM und 60 mM. 2 mL dieser 2-Furaldehydlösungen wurden mit jeweils 2 mL destilliertem Wasser in ein verschließbares Glasgefäß (CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) gefüllt und bei 30 °C auf

einem Überkopfschüttler mindestens 96 h inkubiert bevor Proben beider Phasen entnommen, geeignet verdünnt und über HPLC analysiert wurden (s. 2.2.12).

Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten des Produktes im jeweiligen Zweiphasensystem wurde 2,2'-Furoin in folgenden Konzentrationen in destilliertem Wasser vorgelegt: 2 mM, 5 mM und 12 mM. Ansonsten war die Vorgehensweise analog zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von 2-Furaldehyd.

2.2.5 Reaktionsansätze der (*R*)-2,2'-Furoinsynthese im kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor

Der Reaktionsraum des Wirbelschichtreaktors bestand aus einem 50 mL Falcon Tube, das in eine 250 mL Glasflasche (Schott, Mainz) eingefasst wurde. Die Glasflasche wurde durch einen Edelstahldeckel (Werkstatt der TU Berlin) gasdicht verschlossen. Im Edelstahldeckel befanden sich 5 Bohrungen, die das Umpumpen der Reaktionslösung, die Substratversorgung, den Produktablauf und den Aufbau eines leichten Überdrucks ermöglichten.

Im Regelfall wurden 5 g PVA/PEG-BAL-Immobilisate (5 U mL^{-1}) als Schüttung im Wirbelschichtreaktor eingesetzt, so dass eine Gesamtaktivität von 25 U BAL vorlag. Die Ausbildung einer Wirbelschicht und eine ideale Durchmischung wurden durch eine Umlaufpumpe (Verdergear S096, Verder, Haan), die 60 L h^{-1} förderte, gewährleistet. Die Temperatur im Reaktor wurde über einen Wärmetauscher, der in den Umkreislauf integriert wurde, konstant auf $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ geregelt. Der Wärmetauscher war an einen Kryostaten (MgWC3, Lauda, Lauda-Königshofen) angeschlossen, wobei Wasser als Kühlmittel diente. Die Zudosierung der Substratlösung erfolgte durch eine Feindosierpumpe (PTFE Minidosierer, Telab, Solingen) mit deren Hilfe die Flussrate F geregelt werden konnte. Im Regelfall betrug die 2-Furaldehydkonzentration in der Substratlösung 30 mmol L^{-1} und die Flussrate wurde auf 24 mL h^{-1} eingestellt. 35 mL Substratlösung wurden eingesetzt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug jedoch 48 mL, da sich 13 mL Substratlösung in den Schläuchen des Umlaufs befanden. Alle Schläuche wurden vor dem Ansetzen der Reaktion mit Substratlösung gespült. Durch einen Überlauf bei 35 mL konnte das Reaktionsmedium ebenfalls durch eine Feindosierpumpe (PTFE Minidosierer, Telab, Solingen) abgepumpt und über HPLC (s. 2.2.12)

analysiert werden. Durch Zuleitung von Stickstoff durch eine Gaswaschflasche mit Silikonöl wurde eine konstante Schutzgasatmosphäre im Reaktor erzeugt.

Alle verwendeten Leitungen bestanden aus 1/8" und 1/16" Rohrleitungen (CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe). Je nach Einsatzstelle wurden Rohrleitungen aus Polytetrafluorethylen, Fluorethylenpropylen oder aus gasdichtem Polyetheretherketon verwendet. Kupplungen und T-Stücke wurden ausschließlich in der Polyetheretherketon Ausführung verbaut (UpChurch Scientific, CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe).

2.2.6 Berechnung der Reaktionsparameter im kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor

Der *ee*-Wert wurde wie folgt berechnet:

$$ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} * 100\% ,$$

wobei $[R]$ die Konzentration des (*R*)-Enantiomers und $[S]$ die Konzentration des (*S*)-Enantiomers in der Lösungsmittelphase ist.

Die Verweilzeit wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Verweilzeit}(\tau) = \frac{V_{\text{Reaktor}}}{F} ,$$

wobei V_{Reaktor} das Gesamtvolumen im Reaktor (48 mL) und F die eingestellte Flussrate ist.

Der Umsatz wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Umsatz}(c) = \frac{2 * c_{\text{Produkt}}^t}{c_{\text{Substrat}}^0} * 100\% ,$$

wobei c_{Produkt}^t die 2,2'-Furoinkonzentration zum Zeitpunkt t und c_{Substrat}^0 die Anfangskonzentration an 2-Furaldehyd in der Lösungsmittelphase ist. Der Faktor 2 wird aufgrund der Stöchiometrie der Carboligation einbezogen.

2.2.7 Synthese von 4,4'-Dibrombenzoin für die Suzuki-Kupplung

Für die Synthese des Zwischenprodukts 4,4'-Dibrombenzoin, das für die Charakterisierung der Palladium-katalysierten Kreuzkupplung zweier 4,4'-Dibrombenzoine zu 4,4'-Biphenylbenzoin benötigt wurde (s. 2.2.8), wurden in einem 50 mL Reaktionsgefäß 50 mg des Substrats 4-Brombenzaldehyd in 12 mL Phosphat-Puffer (50 mM, pH 8,0) suspendiert und 3,6 mg MgSO_4 ($2,5 \cdot 10^{-2}$ mmol) sowie 0,48 mg ThDP ($1,0 \cdot 10^{-3}$ mmol) zugegeben. Im Anschluss wurden 25 U (s. 2.2.3) der BAL zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Dichlormethan ($3 \cdot 30$ mL) extrahiert und mit einem Gemisch aus *n*-Hexan/Ethylacetat (5:1) über Kieselgel (15 cm*5 cm) aufgereinigt. Die vereinigte organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet. Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurde das Produkt eindeutig als 4,4'-Dibrombenzoin identifiziert.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{ppm}} = 7,76-7,72$ (2 H); $7,57-7,53$ (2 H); $7,45-7,43$ (2 H); $7,20-7,16$ (2 H); $5,84-5,86$ (1 H); $4,48-4,45$ (1 H)

2.2.8 Reaktionsansätze der Suzuki-Kupplung

Suzuki-Kupplung mit 4-Brombenzaldehyd als Substrat

Für die Suzuki-Kupplung zwischen 4-Brombenzaldehyd und Phenylboronsäure mit dem Standardpalladiumkatalysator $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ wurden in der Regel in einem 25 mL Zweihalskolben 33,5 mg Phenylboronsäure (0,275 mmol; 1,1eq) in 7,5 mL destilliertem Wasser gelöst und anschließend 53,0 mg Na_2CO_3 (0,5 mmol; 2eq) zugegeben. Nachdem sich die beobachtete Gasentwicklung gelegt hatte, wurden 45,6 mg 4-Brombenzaldehyd (0,25 mmol; 1eq) zugegeben und weitere 2,5 mL dest. Wasser hinzugefügt. Im Anschluss wurden 3,5 mg $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ (0,02eq) in der Reaktionslösung suspendiert. Die Reaktion

wurde bei 55 °C über 17 h durchgeführt. Hiernach wurde der Reaktionsansatz mit Dichlormethan (DCM, 3*15 mL) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet, in 10 mL THF aufgenommen und mittels HPLC analysiert (s. 2.2.12). Zusätzlich wurde das Produkt mittels ¹H-NMR eindeutig als 4-Biphenylcarboxaldehyd identifiziert:

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ /ppm = 10,06 (s, 1 H); 7,96 (d, 2 H); 7,76 (d, 2 H); 7,64 (d, 2 H); 7,52-7,44 (m, 3 H)

Suzuki-Kupplung mit 4,4'-Dibrombenzoin als Substrat

Für die Suzuki-Kupplung von 4,4'-Dibrombenzoin mit Phenylboronsäure wurden in einem 25 mL Zweihalskolben 16,0 mg Phenylboronsäure (0,132 mmol; 2,2eq) in 7,5 mL dest. Wasser gelöst und anschließend 26,0 mg Na₂CO₃ zugegeben. Nachdem die Gasentwicklung nachließ, wurden 23,0 mg 4,4'-Dibrombenzoin (0,06 mmol; 1eq) und weitere 2,5 mL dest. Wasser zugegeben. Darauf folgend wurden 1,7 mg des Katalysators (PPh₃)₂PdCl₂ (0,02eq) hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei 55 °C über 17 h durchgeführt. Hiernach wurde der Reaktionsansatz mit Dichlormethan (DCM, 3*15 mL) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet, in 10 mL THF aufgenommen und mittels HPLC analysiert (s. 2.2.12).

2.2.9 Charakterisierung der BAL-katalysierten Carboligation für die Eintopfsynthese

Zur Bestimmung von Ausbeute und Enantiomerenüberschuss wurde die BAL-katalysierte Carboligation zweier 4-Biphenylcarboxaldehyde bzw. zweier 4-Brombenzaldehyde bei 30 °C und 130 rpm durchgeführt. Hierzu wurden in 2 mL Reaktionsgefäßen je 5 mg des jeweiligen Substrats in 1 mL Phosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) gelöst. Von den Cofaktoren wurden 0,05 mg ThDP (1,0*10⁻⁴ mmol) und 0,36 mg MgSO₄ (2,5*10⁻³ mmol) zugegeben. Die resultierenden Endkonzentrationen betragen 2,5 mM MgSO₄ und 0,1 mM ThDP. Da die Edukte im wässrigen Medium nicht vollständig löslich waren, wurde zur Bestimmung der Ausbeute und des *ees* zu einem bestimmten Zeitpunkt jeweils ein kompletter Ansatz analysiert. Es wurden mindestens vier gleiche Ansätze hergestellt und jeweils die gleiche

Menge derselben Enzymlösung zupipettiert. Für die Analyse wurde der Phosphatpuffer durch Zentrifugation abgetrennt, die verbleibenden Feststoffe in 1 mL THF aufgenommen und mittels HPLC analysiert (s. 2.2.12).

Die Ausbeute und der *ee* der BAL-katalysierten Carboligationen bei Verwendung der Cosolventien DMSO und DMF wurden analog hierzu durchgeführt. In 2 mL Reaktionsgefäßen wurden je 5 mg des Substrats 4-Biphenylcarboxaldehyd oder 4-Brombenzaldehyd in einer 4:1 Mischung aus Phosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) und Löslichkeitsvermittler gelöst. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Konzentration des Puffers und der Anteil an Löslichkeitsvermittler nach der Zugabe von Enzymlösung den gewünschten Werten entsprachen. Es wurden 0,05 mg ThDP ($1,0 \cdot 10^{-4}$ mmol) und 0,36 mg MgSO_4 ($2,5 \cdot 10^{-3}$ mmol) zugegeben. Da die Edukte jedoch auch mit dem Zusatz von Löslichkeitsvermittlern nicht vollständig in Wasser gelöst werden konnten, wurde zur Bestimmung der Ausbeute zu einem bestimmten Zeitpunkt ebenfalls jeweils ein kompletter Ansatz analysiert. Der Reaktionsansatz wurde hierfür zentrifugiert, die Feststoffe anschließend in je 1 mL THF aufgenommen und Ausbeute und *ee* mittels HPLC bestimmt (s. 2.2.12).

2.2.10 Einfluss der Phenylboronsäure auf die BAL-Aktivität

Der Einfluss von Phenylboronsäure auf die BAL-Aktivität wurde mittels des gekoppelten Aktivitätstest (s. 2.2.3) untersucht. Für den Aktivitätstest wurde ein 50 mM Phosphatpuffer (pH 8,0) mit 15% PEG 400 gemischt. 2,7 mg Benzoin (1,5 mM) wurden in 8,5 mL dieses Puffers gelöst und 2,5 mg MgSO_4 (2,5 mM) und 0,36 mg ThDP (0,1 mM), sowie 0,5 mL einer HL-ADH Lösung (5 U mL^{-1}) und 0,5 mL einer 7 mM NADH_2 Lösung zugegeben. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen an Phenylboronsäure in jeweils 3 mL dieses Assaypuffers gelöst. Es entstanden Lösungen mit folgenden Phenylboronsäurekonzentrationen: $19,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $37,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $75,0 \text{ mmol L}^{-1}$ sowie 150 mmol L^{-1} . In drei Messungen wurden 950 μL der jeweiligen Lösung mit 50 μL Enzymlösung versetzt und die Abnahme der NADH_2 Konzentration bei 340 nm über 2 min detektiert.

2.2.11 Reaktionsansätze der Eintopfsynthese von (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin

Bei der Eintopfsynthese von 4,4'-Biphenylbenzoin mit der BAL-Reaktion im zweiten Schritt wurde zunächst die Pd-katalysierte Suzuki-Kupplung durchgeführt. Dazu wurden wie in 2.2.8 beschrieben in einem 25 mL Zweihalskolben zunächst 33,5 mg Phenylboronsäure (0,275 mmol; 1,1eq) in 7,5 mL dest. Wasser gelöst und anschließend 53,0 mg Na₂CO₃ (0,5 mmol; 2eq) zugegeben. Nachdem sich die beobachtete Gasentwicklung gelegt hatte, wurden 45,6 mg 4-Brombenzaldehyd (0,25 mmol; 1eq) zugegeben und weitere 2,5 mL dest. Wasser hinzugefügt. Im Anschluss wurden 3,5 mg (PPh₃)₂PdCl₂ (0,02eq) in der Reaktionslösung suspendiert. Der Reaktionsansatz wurde über 17 h auf 55 °C erhitzt.

Nach Abschluss der Reaktion wurde der pH-Wert mit Salzsäure auf einen Wert von 8,0 eingestellt. Als Cofaktoren wurden 3,6 mg MgSO₄ (2,5*10⁻² mmol) und 0,46 mg ThDP (1,0*10⁻³ mmol) zugegeben. Im Anschluss wurde der pH-Wert erneut kontrolliert und gegebenenfalls auf einen Wert von 8,0 korrigiert. Die BAL wurde in großem Überschuss zugegeben, um eine vollständige Umsetzung zu erreichen. Die Reaktion fand bei 30 °C statt und die Mindestlaufzeit betrug 3 Tage. Die Extraktion des kompletten Reaktionsansatzes erfolgte mit DCM (3*20 mL), über MgSO₄ wurde das Extrakt getrocknet, in THF aufgenommen und mittels HPLC analysiert (s. 2.2.12). Über ¹H-NMR Analyse konnte das Endprodukt eindeutig als 4,4'-Biphenylbenzoin identifiziert werden:

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ/ppm = 8,28 (m, 2 H); 7,75-7,42 (m, 16 H); 5,45 (s, 1 H)

2.2.12 Analytik

Gaschromatographie

Der Aktivitätsvergleich zwischen manuell und automatisch produzierten PVA/PEG-BAL-Immobilisaten wurde über die Carbolygation zweier Benzaldehyde zu Benzoin gaschromatographisch verfolgt. Hierbei wurde eine BTX Säule (SGE) mit einer Länge von 25 m, einem Innendurchmesser von 0,22 mm und einer Filmdicke von 0,25 µm verwendet.

Tabelle 2.1. Parameter der GC-Benzoin-Analyse.

Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID)
Trägergas	Stickstoff
Injektionsvolumen	1 μL (Split Modell)
Injektortemperatur	275 °C
Säulentemperatur	60-260 °C
Anfangshaltezeit	0,5 min
Säulenaufheizrate	20 °C min^{-1}
Detektortemperatur	300 °C
Retentionszeit Benzoin	9,56 min

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Proben der BAL-katalysierten 2,2'-Furoinsynthese wurden mit dem entsprechendem Lösungsmittel geeignet verdünnt (Verdünnungsfaktor 2 bis 50) und mittels HPLC analysiert. Für die Bestimmung der Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses wurden 2 verschiedene HPLC-Säulen benutzt.

Tabelle 2.2. Parameter der HPLC-Analyse zur Bestimmung des Umsatzes der 2,2'-Furoinsynthese.

Säule	Eurospher 100-5, C ₁₈ (Knauer, Berlin)
Detektor	UV, Typ 2600 (Knauer, Berlin)
Eingestellte Wellenlänge	254 nm
Injektionsvolumen	20 μL
Säulentemperatur	25 °C
Mobile Phase	85% dest. Wasser : 15% THF
Flussrate	0,3 mL min^{-1}
Retentionszeit 2-Furaldehyd	12,8 min
Retentionszeit 2,2'-Furoin	18,9 min

Tabelle 2.3. Parameter der HPLC-Analyse zur Bestimmung des Enantiomerenüberschuss der 2,2'-Furoinsynthese.

Säule	Chiralpak IA (Daicel Chemical Industries, USA)
Detektor	UV, Typ 2600 (Knauer, Berlin)
Eingestellte Wellenlänge	274 nm
Injektionsvolumen	20 µL
Säulentemperatur	20 °C
Mobile Phase	80% <i>n</i> -Hexan : 20% Isopropanol
Flussrate	0,8 mL min ⁻¹
Retentionszeit (<i>R</i>)-2,2'-Furoin	15,5 min
Retentionszeit (<i>S</i>)-2,2'-Furoin	13 min
Retentionszeit (1,2-Di(furan-2-yl)ethan-1,2-dion)	10 min

Für die Bestimmung der Produktausbeute und des *ees* bei der Eintopfsynthese von (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin mittels HPLC-Analytik wurden ebenfalls 2 verschiedene Säulen verwendet.

Tabelle 2.4. Parameter der HPLC-Analyse zur Bestimmung der Ausbeuten bei der Eintopfsynthese von 4,4'-Biphenylbenzoin.

Säule	Eurospher 100-5, C ₁₈ (Knauer, Berlin)
Detektor	UV, Typ 2600 (Knauer, Berlin)
Eingestellte Wellenlänge	254 nm
Injektionsvolumen	20 µL
Säulentemperatur	25 °C
Mobile Phase	50% dest. Wasser : 50% THF
Flussrate	1 mL min ⁻¹
Retentionszeit 4-Brombenzaldehyd	5,5 min
Retentionszeit 4-Biphenylcarboxaldehyd	7,5 min
Retentionszeit 4,4'-Dibrombenzoin	9,7 min
Retentionszeit 4,4'-Biphenylbenzoin	12,3 min

Tabelle 2.5. Parameter der HPLC-Analytik zur Bestimmung des *ees* der Eintopfsynthese von (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin.

Säule	Chiralpak IA (Daicel Chemical Industries, USA)
Detektor	UV, Typ 2600 (Knauer, Berlin)
Eingestellte Wellenlänge	300 nm
Injektionsvolumen	20 μ L
Säulentemperatur	30 °C
Mobile Phase	50% <i>n</i> -Hexan : 50% Isopropanol
Flussrate	0,8 ml min ⁻¹
Retentionszeit 4-Brombenzaldehyd	7,5 min
Retentionszeit 4-Biphenylcarboxaldehyd	7,5 min
Retentionszeit (<i>R</i>)-4,4'-Dibrombenzoin	7,9 min
Retentionszeit (<i>R</i>)-4,4'-Biphenylbenzoin	11,5 min

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Automatisierte Produktion von PVA/PEG-Immobilisaten im Labormaßstab

Die Vorteile von gelstabilisierten Zweiphasensystemen wurden in Kapitel 1.3.3 bereits ausführlich erörtert. Im Kapitel 3.1 steht die Produktion der besonders vielversprechenden Polyvinylalkohol (PVA)/Polyethylenglycol (PEG)-Kryogele im Fokus. Diese Hydrogele zeichnen sich durch hohe Mikro- und Makroporositäten aus, wodurch hohe Massentransferraten gewährleistet werden. Zudem zeigen sie eine hohe Stabilität gegenüber vielen Verbindungen auf [Lozinsky, Plieva, 1998]. Ihre hohe Resistenz gegenüber Scherkräften erlaubt zusätzlich den Einsatz in vielen verschiedenen Reaktortypen, womit PVA/PEG-Kryogele anderen oft genutzten thermoreversiblen Gelen überlegen sind. Des Weiteren sind die Matrixmaterialien frei zugänglich, kostengünstig und ungiftig.

Die Einhüllung in solche PVA-Kryogele ist eine häufig angewendete Methode für die Immobilisierung ganzer Zellen und auch für die Immobilisierung von Palladium-Katalysatoren wurde diese Methode bereits beschrieben [Lozinsky, Plieva, 1998; Leidig, Prüsse *et al.*, 1999; Szczesna, Galas, 2001; Prüsse, Hörold, 1997]. Als isolierte Enzyme wurden bereits die BAL aus *Pseudomonas fluorescens*, die Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (EC 1.1.1.1), die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (EC 1.1.1.2) und die Schweine Pankreaslipase (EC 3.1.1.3) in PVA/PEG-Matrices eingehüllt und erfolgreich in Synthesen in reinen organischen Lösungsmitteln eingesetzt [Hischer, Steinsiek *et al.*, 2006; Metrangolo-Ruiz De Temiño, Hartmeier *et al.*, 2005; Plieva, Kochetkov *et al.*, 2000]. Aufgrund der sehr milden Bedingungen während der Einhüllung ist die Aktivitätsausbeute sogar bei sehr sensitiven Proteinen hoch. Generell wurde die Stabilität aller Enzyme gegenüber organischen Lösungsmitteln mindestens um eine Zehnerpotenz gesteigert.

PVA/PEG-Kryogele werden aufgrund der günstigen Hydrodynamiken und Abriebsstabilität in Reaktoren gewöhnlich in Kugelform eingesetzt. Sie werden produziert über Kryogelierung [Lozinsky, Damshkaln *et al.*, 2008; Lozinsky, Solodova *et al.*, 1995; Lozinsky, 1998] z. B. durch Eintropfen einer PVA/PEG-Lösung in -20 bis -25 °C kaltes Silikonöl und anschließendes Induzieren der Gelierung durch schrittweises Erhöhen der Temperatur auf Raumtemperatur [Prüsse, 2000]. Alle Produktionsschritte werden manuell durchgeführt, wobei die hohe Viskosität der PVA/PEG-Lösung die Handhabung erschwert und eine Produktion im großen Maßstab unmöglich macht.

Vorlop und Mitarbeiter entwickelten daher einen Aufbau für eine automatisierte Produktion von Immobilisaten, den sogenannten JetCutter. Dieser Aufbau eignet sich jedoch nur für Lösungen mit niedriger Viskosität wie Ca-Pektinate, Ca-Alginate, Chitosan und Gelatin für die Produktion sehr kleiner Kugeln, typischerweise mit einem Durchmesser von unter 1 mm [Prüsse, Dalluhn *et al.*, 2000]. Zudem sind bei dieser Methode Materialverluste zwischen 5-20% unvermeidlich [Prüsse, Bruske *et al.*, 1998]. Lozinsky *et al.* [1995] meldeten einen Druck betriebenen, automatisierten Aufbau als russisches Patent an. In der gegenwärtigen Literatur sind zu diesem Aufbau jedoch keine quantitativen Daten zu finden, was Fragen bezüglich der Reproduzierbarkeit aufwirft.

In dieser Arbeit wird eine Apparatur für die automatisierte Produktion von PVA/PEG-Kryogelen für die Einhüllung von Enzymen vorgestellt. Ausgewertet wurden hierbei die Durchführung der Immobilisierung, die Reproduzierbarkeit, die Kugelgröße, die Kugelform und die Gelmorphologie des Endproduktes. Ziel war es sphärische Immobilisate mit einer möglichst geringen Größenverteilung und unter möglichst geringem thermischem Stress für das Enzym zu produzieren. Darüber hinaus war der Einfluss der Temperatur auf den Kryogelierungsprozess Gegenstand von Untersuchungen. Sowohl die Aufbewahrungstemperatur als auch die Temperatur des Auffangbades wurden variiert. Auch das Diffusionsverhalten des PEGs wurde analysiert.

3.1.1 Aufbau der Apparatur und Produktion der PVA/PEG-Immobilisate

Der Aufbau besteht aus einer Dosierungseinheit und aus einem temperierbaren Auffangbad, welches mit Silikonöl gefüllt ist. Die Dosiereinheit ist ein doppelwandiges Gewinderohr (50 mL Innenvolumen), welches am oberen Ende mit einer Stickstoffgasleitung verbunden ist. Über eine kommerziell erhältliche Mikrodüse erfolgt die Dosierung der PVA/PEG-Lösung. Die Mikrodüse ist in einen beheizbaren Thermoblock eingebaut, um die Dosierung der hochviskosen Flüssigkeit bei niedrigen Drücken zu ermöglichen. Sowohl die Temperatur als auch alle Parameter der Düse werden elektronisch kontrolliert.

Normalerweise wurde die PVA/PEG-Enzymlösung in den Vorratsbehälter vorgelegt und mit Stickstoff ein Druck von 5 bar beaufschlagt. Bei diesen Bedingungen kann die Injektionstemperatur bei Raumtemperatur belassen werden, so dass das zu immobilisierende Enzym nur minimalem Temperaturstress ausgesetzt wird. Der Auslass des Dosierungsventils wurde in ein doppelwandiges isoliertes Silikonölbad gerichtet. Das Silikonöl im Auffangbad wurde fortwährend mithilfe eines Rührers um einen Stromstörer zirkuliert, wodurch die Agglomeration der PVA/PEG-Kugeln durch Koaleszenz der Tropfen verhindert wird. Für den Erhalt möglichst runder Immobilisate wurde eine optimale Distanz der Düse zur Silikonöloberfläche von 20 cm ermittelt. Im Regelfall wurde die PVA/PEG-Enzymlösung in -25 °C kaltes, kontinuierlich zirkulierendes Silikonöl injiziert (s. Abb. 3.1). Nach dem Injektionsprozess wurde die Temperatur im Einklang mit Literaturdaten schrittweise über 500 min auf 20 °C erhöht [Lozinsky, 2002; Mikhalev, Sierpinski *et al.*, 1991].

Eine Verkürzung des Auftauprogramms auf 180 min führte jedoch zu PVA/PEG-Immobilisaten, die keine offensichtlichen Unterschiede in der Stabilität und Flexibilität erkennen ließen. Höhere Starttemperaturen des Auffangbades von -20 °C wurden analog zu Literaturangaben untersucht [Lozinsky, Solodova, 1995; Prüsse, 2000]. Sie führten jedoch zu nicht sphärischen Immobilisaten. Dies ist wahrscheinlich mit der verlängerten Gefrierungszeit der PVA/PEG-Lösung im Silikonöl zu begründen, wodurch Verformungen der Tropfen durch den Rührer begünstigt werden.

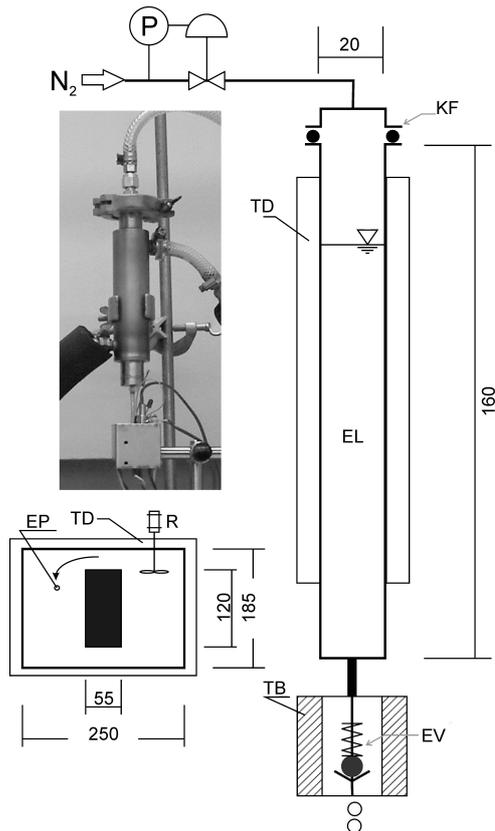


Abbildung 3.1. Aufbau der Apparatur zur automatisierten Produktion von PVA/PEG-Immobilisaten.

Rechts: Dosiereinheit und elektronisches Ventil (EV) und der thermostatische Aufbewahrungsbehälter für die Enzymlösung (EL); oben links: Fotografie des Injektionsmoduls; unten links: Aufsicht von oben auf das Auffangbad inklusive der Flussrichtung und des Eintropfpunktes (EP). Alle Dimensionen sind in mm angegeben. KF: Flansch mit O-Ring, P: Manometer, R: Rührer, TD: thermostatisch temperierte Doppelwand, TB: Thermoblock. Mit freundlicher Genehmigung des Wiley-VCH-Verlags übernommen aus Bieler, Ansorge-Schumacher *et al.*, 2010.

3.1.2 Größe und Form der PVA/PEG-Immobilisate

Die Größe der PVA/PEG-Immobilisate ist direkt abhängig vom Öffnungs- und Schließzeitfenster des Ventils. In der vorliegenden Arbeit wurden 3 Zeitprogramme mit 20, 40 und 60 ms Öffnungszeit und 20, 25 und 30 ms Pause vor der nächsten Öffnung der Düse untersucht (s. Abb. 3.2). Theoretisch erlauben die gewählten Zeitprogramme eine Produktionsrate von 25, 15 und 11 Kugeln pro Sekunde. Durch diese hohen Produktionsraten kann die Menge an PVA/PEG-Immobilisaten, die typischerweise für die Betreibung eines kontinuierlich betriebenen Wirbelschichtreaktors im Labormaßstab benötigt wird [Ansorge-Schumacher, Greiner *et al.*, 2006], innerhalb von Minuten hergestellt werden.

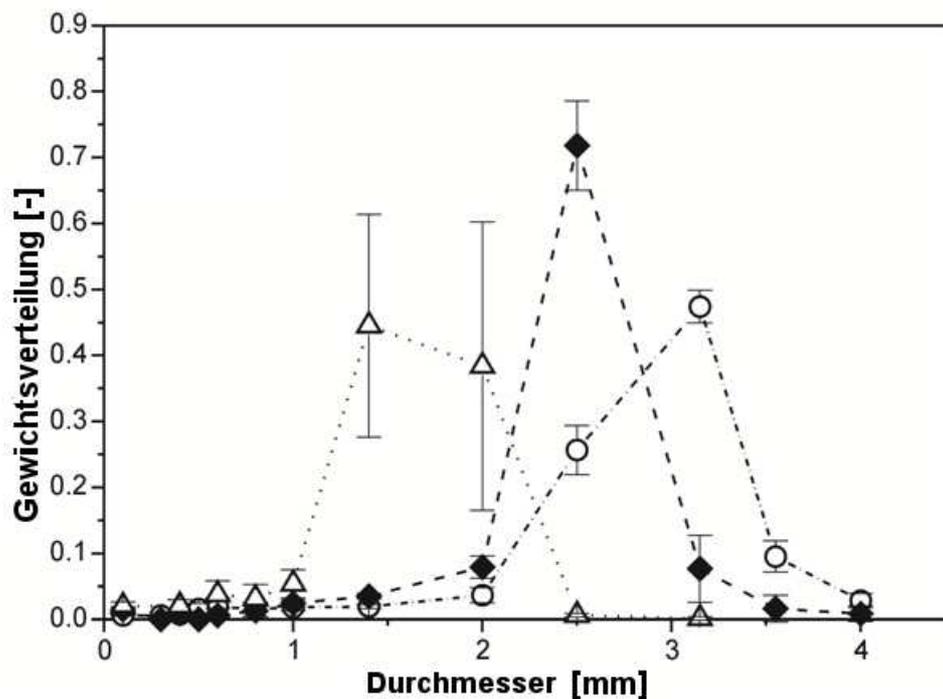


Abbildung 3.2. Größenverteilung der automatisch produzierten PVA/PEG-Immobilisate in Abhängigkeit von der Öffnungszeit der Düse: 60 ms (nicht ausgefüllte Kreise), 40 ms (ausgefüllte Rauten) und 20 ms (nicht ausgefüllte Dreiecke). Mit freundlicher Genehmigung des Wiley-VCH-Verlags übernommen aus Bieler, Ansorge-Schumacher *et al.*, 2010.

Bei einer Ventilöffnungszeit von 60 ms weisen 47% aller erhaltenen Kugeln einen Durchmesser zwischen 2,50 und 3,15 mm auf. Die Gesamtmasse aller Kugeln in diesem Größenfenster macht immerhin 73% der Gesamtmasse aus. Erweitert man den Größenbereich auf 2,50 bis 3,55 mm Kugeldurchmesser, so macht die Masse dieser Kugeln sogar 83% der Gesamtmasse aus. Bei einer Ventilöffnungszeit von lediglich 40 ms werden erwartungsgemäß kleinere Kugeln produziert und so weisen 80% aller hergestellten PVA-Kugeln einen Durchmesser zwischen 2,00 und 2,50 mm auf. 72% aller Immobilisate haben einen Durchmesser von 2,50 mm. Die kürzeste getestete Impulslänge von 20 ms führt zu einer Größenverteilung bei der 83% der PVA-Immobilisate einen Durchmesser zwischen 1,40 und 2,00 mm haben. 88% aller unter diesen Umständen produzierten Kugeln sind zwischen 1,00 und 2,00 mm groß.

Bei allen drei gewählten Ventilöffnungszeiten liegt die durchschnittliche Ausbeute an Kugeln pro Masse PVA/PEG-Lösung bei ~75%. Ungefähr 25% Material gehen im Vorratsbehälter und durch Polymerisation auf der Düse verloren. Diese in unregelmäßigen Zeitabständen

auftretende spontane Gelierung der PVA/PEG-Lösung direkt auf dem Ventil führt zum Verstopfen der Düse, wodurch die PVA/PEG-Kugel Produktion limitiert wird.

Der Mechanismus der Gelbildung ist bis heute nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass es während des Einfrierens der wässrigen PVA/PEG-Lösung durch die Bildung von Eiskristallen zu einer Phasentrennung kommt. In der flüssig gebliebenen wasserarmen Phase ist die PVA-Konzentration stark erhöht, so dass sich während des langsamen Auftauens Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den PVA-Polymerketten über freie Hydroxylgruppen bilden können [Lozinsky, 1998]. Induziert wird die Polymerisation also durch lokal hohe PVA-Konzentrationen während des Auftauprozesses und daher ist der Grund für die spontane Gelierung der PVA/PEG-Lösung auf der Düse unklar. Denkbar ist, dass der plötzliche Kontakt mit Luft beim Austreten der Lösung aus dem Ventil die Polymerisation auslöst. Auch Materialien in der Düse könnten eventuell als Induzierer fungieren. Bevor hier eine endgültige Erklärung gegeben werden kann und nötige Verbesserungen des Produktionssystems vorgenommen werden können, bedarf es eines tieferen Verständnisses des Gelierungsprozess.

Neben der Größenverteilung ist die Rundheit der Immobilisate von großer Bedeutung, da sie sowohl den Massentransfer als auch die Robustheit der Kugeln beeinflusst [Buthe, Hartmeier *et al.*, 2004]. Die Form der Immobilisate wurde daher mit der Software Image Tool exemplarisch in vier der hergestellten Chargen untersucht. Als Indikator für eine perfekt runde Form können sowohl die Rundheit, definiert als $(4\pi \cdot \text{Fläche} / \text{Umfang}^2)$, als auch die Kompaktheit, definiert als $((4 \cdot \text{Fläche} / \pi)^{1/2} / \text{Hauptachsenlänge})$, angewendet werden. Beide Parameter ergeben einen Wert von 1, wenn das untersuchte Objekt eine perfekt zirkuläre Form zeigt. Bei den untersuchten PVA/PEG-Immobilisaten wurden eine durchschnittliche Rundheit von $0,85 \pm 0,03$ und eine durchschnittliche Kompaktheit von $0,95 \pm 0,02$ berechnet. Damit zeigen beide Indikatoren eine nahezu perfekt runde Form der automatisch produzierten Immobilisate an.

3.1.3 Gelmorphologie

Des Weiteren wurde die Struktur und Porengröße der produzierten PVA/PEG-Kryogele mithilfe von Rasterelektronenmikroskopie (REM) analysiert (s. Abb. 3.3).

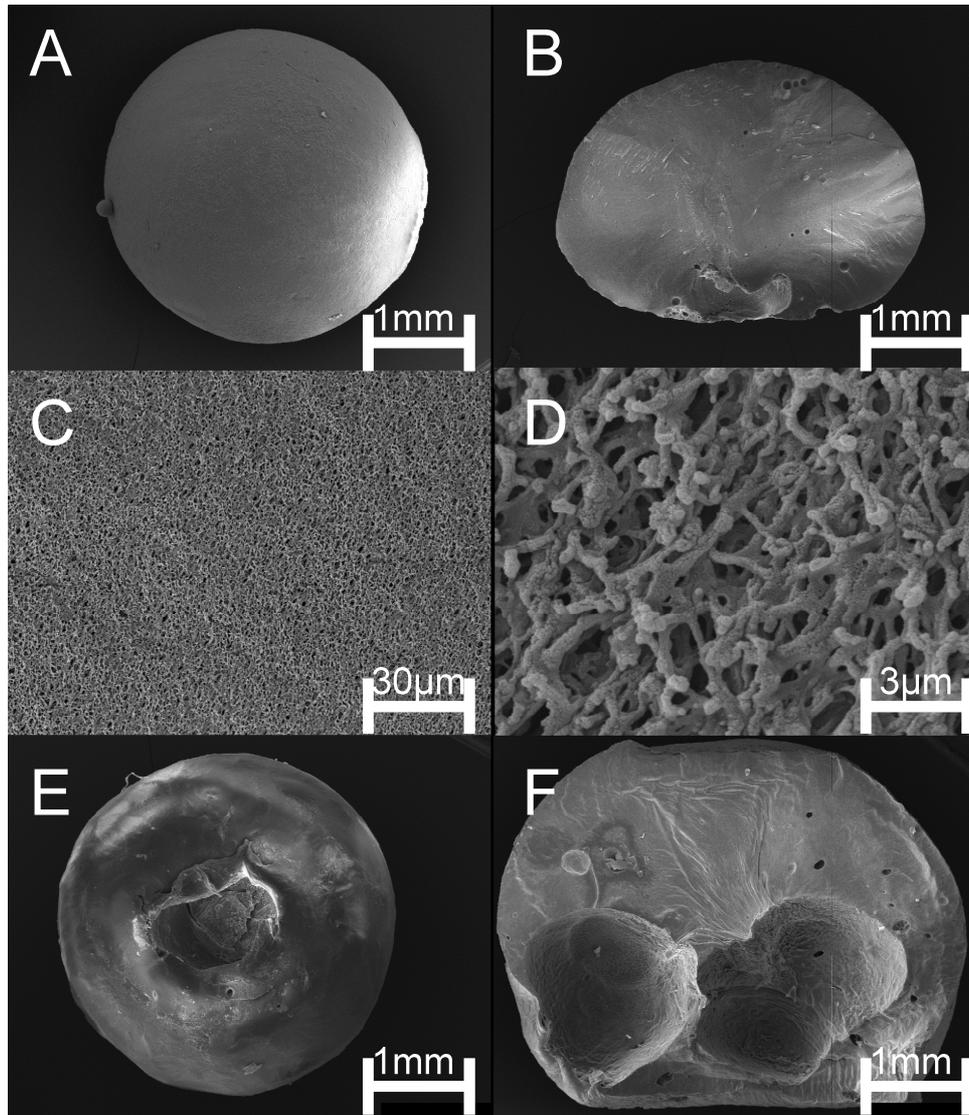


Abbildung 3.3. REM-Aufnahmen der automatisch produzierten PVA/PEG-Kugeln. (A) Oberflächenaufnahme, (B-D) Querschnitte der Kugeln mit steigender Vergrößerung, (E und F) Oberfläche und Querschnitt einer Kugel mit Gaseinschluss. Mit freundlicher Genehmigung des Wiley-VCH-Verlags übernommen aus Bieler, Ansorge-Schumacher *et al.*, 2010.

Die typische Schwammstruktur und Porengrößen um 1 µm stimmen mit bereits publizierten Ergebnissen überein [Lozinsky, Vainerman *et al.*, 1986]. Allerdings wurden im Innern der automatisch produzierten PVA-Kugeln im Gegensatz zu manuell produzierten Kryogelen

Gaseinschlüsse beobachtet. Die Löcher, die aufgrund des Gaseinschlusses in der Polymermatrix entstehen, variieren stark in der Größe und waren in ca. 80% aller untersuchter Kugeln zu finden. Um zu untersuchen, ob die Gaseinschlüsse die Aktivität immobilisierter Enzyme entscheidend beeinflussen, wurde exemplarisch die sehr sensitive BAL sowohl in automatisch als auch in manuell produzierte Kugeln eingeschlossen und die Aktivitäten der Immobilisate miteinander verglichen (s. 2.2.3). Die Unterschiede der ermittelten Aktivitäten lagen innerhalb der Standardabweichung. In beiden Fällen konnten typische Produktivitäten von $40 \mu\text{mol h}^{-1} \text{U}^{-1}$ erreicht werden. Da die Gaseinschlüsse innerhalb der Kryogele die Aktivität der empfindlichen und relativ instabilen BAL nicht beeinflussen, ist davon auszugehen, dass weniger sensitive Enzyme ebenso wenig beeinflusst werden.

3.1.4 Diffusionsverhalten des Additivs PEG 1000

Weiterhin wurde untersucht, ob das Additiv PEG 1000, welches die Stabilität der PVA-Immobilisate erhöht [Prüsse, 2000], in die umgebende Lösung der Kugeln diffundiert. Untersuchungen durch Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie (FT-IR) zeigten, dass PEG bei Inkubation der PVA-Kugeln in einem wässrigen Einphasensystem in die umgebende Wasserphase diffundiert. Selbst nach 3 Tagen Inkubation lässt sich PEG jedoch auch in der PVA-Matrix noch nachweisen. D.h. es stellt sich entweder ein Verteilungsgleichgewicht ein oder das Additiv wird aufgrund unterschiedlicher Porengrößen und unterschiedlich langer Diffusionsstrecken in der Matrix teilweise strukturbedingt zurückgehalten.

In Abbildung 3.4 sind die IR-Spektren von reinem Wasser und der wässrigen Phase nach 2-stündiger Inkubation von PVA/PEG-Kugeln darin miteinander verglichen. Zwischen 3200 und 3760 cm^{-1} ist eine große Transmissionsbande zu erkennen, die auf symmetrische und asymmetrische Valenzschwingungen der Bindungen zwischen Sauerstoff und Wasserstoff im Wasser zurückzuführen ist. Auch die Transmission bei einer Wellenzahl von 1630 cm^{-1} ist eindeutig dem Wassermolekül durch sogenannte Scissoring-Vibration der beiden Wasserstoffatome zu zuordnen [Shriver, Atkins *et al.*, 1994]. Der Nachweis von PEG in der Wasserphase gelingt jedoch deutlich anhand eines PEG-typischen Transmissionspeaks bei ungefähr 1080 cm^{-1} , welcher durch asymmetrisches C-O stretching ausgelöst wird [Belleville, Robert *et al.*, 1995]. Derselbe PEG-typische Peak im sogenannten Fingerprint Bereich ließ

sich auch in der PVA-Matrix eindeutig nachweisen. Eine quantitative Aussage über die Diffusion des PEGs ließ sich mit der verwendeten Analyse­methode nicht treffen.

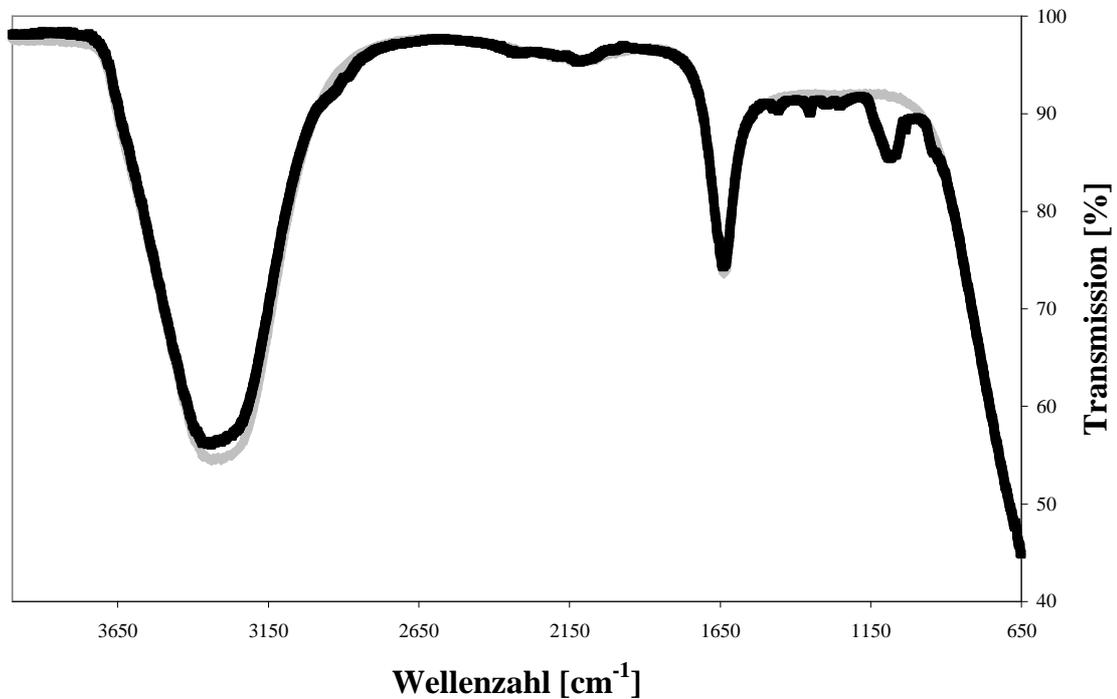


Abbildung 3.4. IR-Spektrum von reinem Wasser (grau) und der wässrigen Phase nach 2-stündiger Inkubation von PVA/PEG-Immobilisaten darin (schwarz).

Werden die PVA-Kugeln dagegen in apolaren Lösungsmitteln wie beispielsweise *n*-Hexan, Methylisobutylketon (MIBK) oder *tert*-Butylmethylether (MTBE) inkubiert, so diffundiert PEG nicht in die umgebende Phase. Selbst nach drei Tagen Inkubation ließ sich in keiner der drei organischen Phasen PEG nachweisen. Dasselbe Bild ergab sich bei der Analyse des Silikonöls, in dem die PVA-Kugeln ebenfalls 3 Tage inkubiert wurden. Auch hier lässt sich kein PEG im Silikonöl nachweisen. D.h., dass sich die Zusammensetzung der PVA/PEG-Polymermatrix während der Herstellung der Immobilisate, die eine Inkubation in Silikonöl umfasst, nicht verändert. Auch beim Einsatz der Immobilisate in einem Zweiphasensystem mit apolaren Lösungsmitteln ist keine Veränderung der Zusammensetzung der Einhüllungsmatrix zu erwarten. Lediglich beim Einsatz der PVA/PEG-Kugeln im wässrigen Einphasensystem verändert sich die Zusammensetzung durch Diffusion des PEGs in die umgebende Wasserphase.

3.1.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einen Aufbau für die automatisierte Produktion standardisierter PVA/PEG-Immobilisate im Labormaßstab zu entwickeln. Hierbei wird eine sehr hohe Produktivität von bis zu 1500 Kugeln pro min erreicht. Die erzielte Größenverteilung der PVA-Kugeln ist eng und der Kugeldurchmesser kann über das Ventil-Impuls-Intervall exakt bestimmt und variiert werden. Die produzierten Kryogele haben eine annähernd perfekt runde Form, sind stabil und können daher in vielen verschiedenen Reaktortypen problemlos eingesetzt werden. Bezüglich der Gelmorphologie unterscheiden sich automatisch produzierte Kugeln nicht von manuell produzierten. Lediglich Gaseinschlüsse, die jedoch nicht die Enzymaktivität beeinflussen, konnten als Differenz beobachtet werden. Das Additiv PEG 1000 diffundiert nur aus der Polymermatrix heraus, wenn es von hydrophilen Lösungen wie Wasser umgeben ist. Beim Einsatz in einem wässrig organischen Zweiphasensystem ist keine Diffusion des PEGs zu erwarten. Der Temperaturstress, der während der Produktion der PVA/PEG-Immobilisate auf das jeweilige Enzym ausgeübt wird, ist gering, da lediglich bei Raumtemperatur oder sogar unterhalb davon gearbeitet wird. Darüber hinaus ist der präsentierte Aufbau sehr einfach, so dass zusätzliche Kosten gering sind. Das vorliegende Design zur Routine Produktion von PVA-Kugeln im Labormaßstab ermöglicht somit die Anwendung dieser vielversprechenden Immobilisate im industriellen Maßstab.

3.2 Optimierung der BAL-katalysierten (*R*)-2,2'-Furoinsynthese

In voran gegangenen Arbeiten wurde als Reaktionskonzept für die BAL-katalysierte Synthese chiraler α -Hydroxyketone erfolgreich ein kontinuierlich betriebener Wirbelschichtreaktor untersucht [Ansorge-Schumacher, Greiner *et al.*, 2006]. Als Modellreaktion wurde dabei die Synthese von (*R*)-Furoin ausgewählt (s. Abb. 3.5), da dieses Produkt in wässrigen Lösungen sowohl einer Racemisierung als auch einer Oxidation zum korrespondierenden Diketon unterliegt und somit bezüglich des Reaktionskonzepts ein großes Optimierungspotential bietet. Beide Nebenreaktionen konnten durch den gewählten Reaktionsaufbau unterbunden werden. Die Racemisierung, die im satzweisen Betrieb des gelstabilisierten Zweiphasensystems mit zunehmender Zeit auftritt [Hischer, Gocke *et al.*, 2005], konnte bei einer Verweilzeit unter 2,8 h durch die kontinuierliche Extraktion des (*R*)-Enantiomers aus der wässrigen in die Lösungsmittelphase verhindert werden. Die Oxidation des Furoins konnte durch inerte Reaktionsbedingungen unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre unterbunden werden.

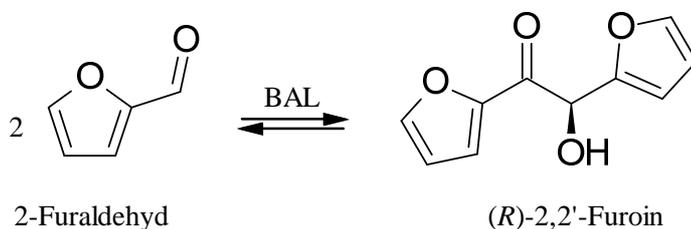


Abbildung 3.5. Reaktionsschema der BAL-katalysierten Carbolygation von 2-Furaldehyd zu (*R*)-2,2'-Furoin.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel der (*R*)-Furoinsynthese untersucht, ob die BAL-katalysierte Synthese chiraler α -Hydroxyketone im kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor durch einen Lösungsmittelwechsel optimiert werden kann. Es wurden Lösungsmittel eingesetzt, welche das Produkt besser lösen als das bisher ausschließlich verwendete *n*-Hexan. Nach Möglichkeit sollten die untersuchten Lösungsmittel also eine höhere Extraktionskraft für das Produkt besitzen und dadurch höhere Umsätze bei gleichzeitig hohen Enantiomerenüberschüssen erlauben.

3.2.1 Lösungsmittelwechsel

Anstelle des bisher verwendeten sehr apolaren *n*-Hexans wurden die polarerer Lösungsmittel *tert*-Butylmethylether (MTBE), Methylisobutylketon (MIBK) und 2-Methyltetrahydrofuran (2-Methyl-THF) für die BAL-katalysierte Furoinsynthese im kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor getestet.

MTBE wurde aufgrund voran gegangener Arbeiten von Stillger [2004] ausgewählt. Stillger zeigte, dass MTBE bei BAL-katalysierten Carboligationen sowohl als Cosolvens im Einphasensystem als auch als Lösungsmittelphase im Zweiphasensystem eingesetzt werden kann. Die Enzymstabilität der nicht-immobilisierten BAL wird bei Inkubation in einem Einphasensystem mit MTBE gesättigtem Puffer, im Vergleich zur Inkubation in reinem Puffer, um den Faktor 75 gesteigert. Eine Inaktivierung der BAL aufgrund gelöster Lösungsmittelmoleküle in der wässrigen Phase (molekulare Toxizität) ist demnach ausgeschlossen. Auch die Lagerstabilität der nicht-immobilisierten BAL in einem fein emulgierten Zweiphasensystem mit MTBE als Lösungsmittelphase ($t_{1/2}=815$ h) konnte, im Vergleich zur Lagerstabilität der BAL in einem gepufferten wässrigen Einphasensystem ($t_{1/2}=15$ h), signifikant gesteigert werden. Zusätzlich konnte Stillger eine Inhibierung der BAL durch MTBE ausschließen.

MIBK wurde aufgrund ähnlich positiver Ergebnisse von Schmidt [2008], der sowohl den Einfluss der molekularen Toxizität als auch der Phasentoxizität von MIBK auf die BAL ausschloss, ausgesucht. Insgesamt konnte Schmidt keinen negativen Einfluss von MIBK auf die Lagerstabilität der BAL detektieren.

Sowohl MTBE als auch MIBK sind jedoch petrochemischen Ursprungs und zudem sehr schwer abbaubar, was zu ökologischen Bedenken hinsichtlich ihres großtechnischen Einsatzes führt. Daher wurde zusätzlich 2-Methyl-THF, das aus biologischen Ressourcen wie z. B. Lävulinsäure gewonnen wird und abiotisch durch Luft abgebaut werden kann [Shanmuganathan, Natalia *et al.*, 2010], als Lösungsmittelphase getestet. Zudem zeigten Shanmuganathan und Mitarbeiter, dass die BAL in einem mit 2-Methyl-THF gesättigtem wässrigen Einphasensystem eine höhere Lagerstabilität aufweist als in einem rein wässrigen

Einphasensystem. Sowohl im Einphasensystem als auch im Zweiphasensystem mit 2-Methyl-THF als Cosolvens bzw. Lösungsmittelphase wurden hohe Produktivitäten und Enantiomerenüberschüsse in der Benzoin synthese erzielt.

Um in einem wässrig/organischen Zweiphasensystem hohe Umsätze zu erzielen, muss das organische Lösungsmittel im Idealfall die Substrate kontinuierlich in die reaktive wässrige Phase abgeben und die Produkte möglichst effektiv aus der wässrigen Phase extrahieren. So kann das thermodynamische Gleichgewicht zur Seite der Produkte hin verschoben werden. Ein wichtiger Parameter für diesen Idealfall ist der Verteilungskoeffizient der Substrate und des Produktes zwischen den beiden Phasen. Daher wurden die Verteilungskoeffizienten des Substrates 2-Furaldehyd als auch des Produktes 2,2'-Furoin in den Zweiphasensystemen mit *n*-Hexan, MIBK und MTBE bestimmt und miteinander verglichen (s. Tabellen 3.1 und 3.2). 2-Methyl-THF wurde in diese Untersuchungen zunächst nicht mit einbezogen, da die Ergebnisse von Shanmuganathan und Mitarbeitern [2010] erst später veröffentlicht wurden.

Tabelle 3.1. Verteilungskoeffizienten P des Substrats 2-Furaldehyd in wässrig/organischen Zweiphasensystemen mit *n*-Hexan, MTBE bzw. MIBK als Lösungsmittelphase. Alle Verteilungskoeffizienten gelten für einen Anfangskonzentrationsbereich von 2-Furaldehyd zwischen 5-60 mM in der jeweiligen organischen Phase.

Zweiphasensystem	$P_{\text{org. Phase/wässrige Phase}}$
Hexan/Wasser	$0,45 \pm 0,15$
MTBE/Wasser	$2,7 \pm 0,13$
MIBK/Wasser	$5,4 \pm 0,4$

Tabelle 3.1 verdeutlicht, dass die Verteilungskoeffizienten des Substrates 2-Furaldehyd in den Zweiphasensystemen mit MIBK und MTBE deutlich höher sind als der Verteilungskoeffizient im Zweiphasensystem mit *n*-Hexan als Lösungsmittelphase. D.h., dass sich im Verteilungsgleichgewicht im Zweiphasensystem mit MTBE bzw. MIBK als organischer Phase eine niedrigere Substratkonzentration in der wässrigen Phase einstellt als im Zweiphasensystem mit *n*-Hexan. MTBE und MIBK „drängen“ 2-Furaldehyd also tendenziell weniger stark in die wässrige Phase als *n*-Hexan, was eine schlechtere Substratversorgung des Enzyms in der wässrigen Phase zur Folge haben könnte. Dieser vermeintliche Nachteil könnte im Falle der BAL jedoch in einen Vorteil umgekehrt werden, denn van den Wittenboer [2009; 2010] zeigte, dass das Protein von seinen eigenen Substraten stark inaktiviert wird. D.h. die

langsamere Substratversorgung des Enzyms könnte sich sogar positiv auf den Umsatz auswirken.

Für die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten des Produktes 2,2'-Furoin wurde dieses analog zu den Gegebenheiten im Zweiphasensystem in der wässrigen Phase vorgelegt, wodurch lediglich maximale Anfangskonzentrationen von 12 mM untersucht werden konnten.

Tabelle 3.2. Verteilungskoeffizienten P des Produktes 2,2'-Furoin in wässrig/organischen Zweiphasensystemen mit *n*-Hexan, MTBE bzw. MIBK als Lösungsmittelphase. Alle Verteilungskoeffizienten gelten für einen Anfangskonzentrationsbereich des 2,2'-Furoins zwischen 2-12 mM in der wässrigen Phase.

Zweiphasensystem	$P_{\text{wässrige Phase/org. Phase}}$
Wasser/Hexan	$4,88 \pm 0,35$
Wasser/MTBE	$0,18 \pm 0,004$
Wasser/MIBK	$0,05 \pm 0,01$

Wie in Tabelle 3.2 gezeigt, sind die Verteilungskoeffizienten des 2,2'-Furoins im Zweiphasensystem mit MTBE bzw. MIBK als organischer Phase mit $0,18 \pm 0,004$ bzw. $0,05 \pm 0,01$ deutlich niedriger als in einem Zweiphasensystem mit *n*-Hexan als Lösungsmittelphase ($4,88 \pm 0,35$). Bei Erreichen des Verteilungsgleichgewichts wird sich in MTBE und MIBK demnach eine deutlich höhere 2,2'-Furoinkonzentration einstellen als in *n*-Hexan. Die Extraktionskraft von MTBE und MIBK für das gebildete Produkt wird demnach deutlich größer sein als die des *n*-Hexans, wodurch der Umsatz gesteigert werden könnte.

Sowohl bei der Substratversorgung des Enzyms in der wässrigen Phase als auch bei der Produktextraktion aus der wässrigen Phase in die organische Phase muss jedoch beachtet werden, dass neben dem Verteilungskoeffizienten der Stofftransportkoeffizient und die Phasengrenzfläche den Stofftransport entscheidend beeinflussen. Die Verteilungskoeffizienten bilden lediglich das treibende Gefälle für den Stofftransport. Im Falle von gelstabilisierten Zweiphasensystemen, wie sie im kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor eingesetzt werden sollen, kommt erschwerend hinzu, dass die Polymermatrices den Stofftransport behindern können. Die Bestimmung des Stofftransports ist ungleich komplizierter als die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten und war nicht Ziel dieser Arbeit. So wurde über die Verteilungskoeffizienten des Substrates und des Produktes lediglich eine grundsätzliche Tendenz des Stofftransports in den jeweiligen

Zweiphasensystemen abgeschätzt. Ob und inwiefern die Verteilungskoeffizienten der Reaktanden zwischen der wässrigen Phase und der jeweiligen Lösungsmittelphase die erreichbaren Umsätze im kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor beeinflussen, wurde im Folgenden genau untersucht.

In Anlehnung an Ansorge-Schumacher *et al.* [2006] bestand der Reaktionsraum des Wirbelschichtreaktors aus einem herkömmlichen Falcon Tube mit einem Fassungsvermögen von 50 mL, das sich in einer verschließbaren Glasflasche befand. Der Reaktionsraum wurde durch einen Edelstahldeckel luftdicht verschlossen. Der Deckel enthielt Bohrungen durch die die organische Phase zur Aufrechterhaltung der Wirbelschicht mithilfe einer Umlaufpumpe fortwährend zirkuliert wurde. Durch eine weitere Bohrung im Deckel wurde der Reaktionsraum mit Stickstoff abgesättigt. Das Gas wurde zuvor durch eine Gaswaschflasche mit Silikonöl geleitet, so dass konstant ein leichter Überdruck im Reaktionsgefäß garantiert war. Zwei weitere Bohrungen ermöglichten die Substratversorgung mithilfe einer Feindosierpumpe und das Abpumpen des Reaktionsmediums. Mithilfe eines Wärmetauschers wurde die Reaktionstemperatur konstant bei 20 °C gehalten (s. Abb. 3.6).

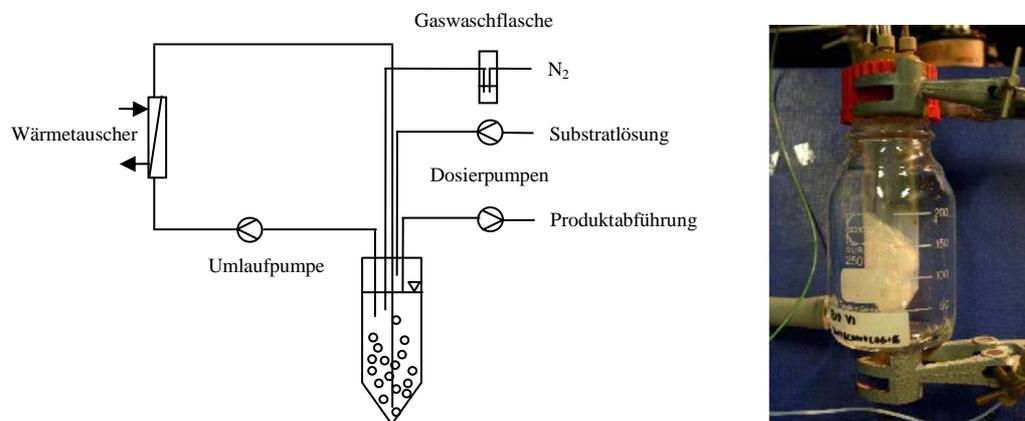


Abbildung 3.6. Kontinuierlich betriebener Wirbelschichtreaktor mit PVA/PEG-BAL-Immobilisaten. Links: Schematischer Aufbau; rechts: Foto des Reaktionsgefäßes.

Ansorge-Schumacher *et al.* [2006] untersuchten im kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor die 3,3'-Furoinsynthese. Da 3,3'-Furoin jedoch nicht kommerziell erhältlich ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die 2,2'-Furoinsynthese als Modellreaktion verwendet. Daher wurden für einen möglichst exakten Vergleich der unterschiedlichen Lösungsmittelphasen, die

Vergleichswerte beim Einsatz von *n*-Hexan neu ermittelt. Somit wurden alle Lösungsmittel unter identischen Bedingungen als organische Phase im gelstabilisierten Zweiphasensystem eingesetzt. Um eine Racemisierung und Oxidation des Produktes (*R*)-2,2'-Furoin zu verhindern, wurde im Einklang mit Ansorge-Schumacher *et al.* [2006] eine kurze Verweilzeit von 2 h ausgewählt. Die 2-Furaldehydkonzentration betrug jeweils 30 mmol L⁻¹ und insgesamt wurden immer 25 U BAL eingesetzt.

Die ermittelten prozentualen Umsätze der BAL-katalysierten (*R*)-2,2'-Furoinsynthese im gelstabilisierten Zweiphasensystem bei Verwendung der vier unterschiedlichen Lösungsmittel sind in Abbildung 3.7 in Abhängigkeit der Reaktionszeit dargestellt. Die zum Teil sehr großen Standardabweichungen sind auf eine nicht ganz gleichmäßige Flussrate und dadurch bedingte leicht schwankende Verweilzeiten zurückzuführen. Zudem schwankte die Außentemperatur zeitweise stark, so dass im Reaktionsgefäß nicht immer exakt 20 °C garantiert werden konnten.

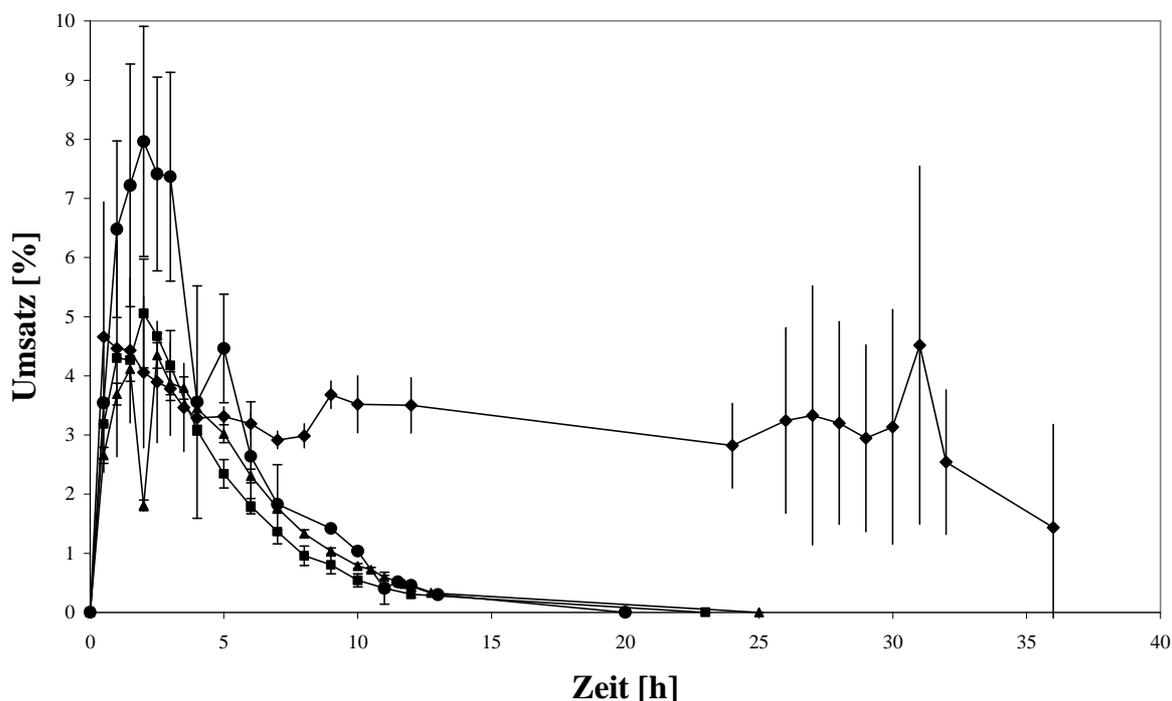


Abbildung 3.7. Prozentuale Umsätze der BAL-katalysierten (*R*)-2,2'-Furoinsynthese im gelstabilisierten Zweiphasensystem mit *n*-Hexan (Rauten), MTBE (Quadrate), MIBK (Dreiecke) und 2-Methyl-THF (Kreise) als Lösungsmittelphase in Abhängigkeit von der Zeit. Die Reaktion wurde mit 25 U BAL bei 20 °C, einer 2-Furaldehydkonzentration von 30 mmol L⁻¹ und einer Verweilzeit von 2 h durchgeführt.

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt zunächst auf, dass im Gegensatz zu den Zweiphasensystemen mit MTBE, MIBK und 2-Methyl-THF für *n*-Hexan eine sehr lange Laufzeit erzielt wurde. Die Laufzeit des Hexan/PVA-Systems lag mit über 36 h deutlich über den Laufzeiten der anderen Zweiphasensysteme, die unter 20 h lagen. Zudem konnte lediglich im Zweiphasensystem mit *n*-Hexan überhaupt ein stabiler Betriebspunkt erzielt werden. In allen anderen getesteten Zweiphasensystemen wurde der maximale Umsatz spätestens nach 2,5 h erreicht und fiel danach stetig ab. Ein stabiler Betriebspunkt konnte nicht erzielt werden. Generell waren die erzielten maximalen prozentualen Umsätze zwischen 4,3% (MIBK) und knappen 8% (2-Methyl-THF) in allen 4 Zweiphasensystemen sehr niedrig.

Lediglich im Bezug auf die Nebenproduktbildung konnten durch den Lösungsmittelwechsel Vorteile erzielt werden. Die Oxidation des Furoins konnte analog zu Ansorge-Schumacher *et al.* [2006] aufgrund der konstant gehaltenen Schutzgasatmosphäre in allen untersuchten Zweiphasensystemen vollständig verhindert werden. Im Bezug auf die Racemisierung des Furoins konnte bei Verwendung von *n*-Hexan als Lösungsmittelphase allerdings zeitweise das (*S*)-Enantiomer detektiert werden. Insgesamt wurden in diesem Zweiphasensystem unkonstante *ees* zwischen 61 und 99,99% gemessen. Bei Verwendung der Lösungsmittel MTBE, MIBK und 2-Methyl-THF als Lösungsmittelphase konnte dagegen zu keinem Zeitpunkt (*S*)-Furoin im Produktablauf detektiert werden. Die *ees* lagen hier konstant bei über 99,99%. Die Racemisierung des Furoins findet ausschließlich in der wässrigen Phase statt [Jüntges, 2009] und kann daher durch die verbesserte Produktextraktion aus der wässrigen in die Lösungsmittelphase vollständig verhindert werden. Im Bezug auf die Racemisierung hat sich der Lösungsmittelwechsel also als erfolgreich herausgestellt.

Bei Verwendung der Lösungsmittel MTBE, 2-Methyl-THF und MIBK konnte in allen drei Fällen eine konstante Wirbelschicht der PVA/PEG-Immobilisate aufgebaut werden. Bei Ausbildung einer Wirbelschicht ist die Substratdiffusion außerhalb der Kugeln wahrscheinlich nicht limitiert. Es ist also davon auszugehen, dass die Substratkonzentrationen in den Kugeln annähernd den Verteilungsgleichgewichtskonzentrationen entsprechen. Es kann demnach angenommen werden, dass dort in der wässrigen Phase immer Aldehydkonzentrationen im mM-Bereich vorliegen. D.h., dass bei den Lösungsmitteln MTBE, MIBK und 2-Methyl-THF die bekannte Inaktivierung der BAL durch ihre eigenen

Substrate [van den Wittenboer, 2009; van den Wittenboer, Niemeijer *et al.*, 2010] sehr wahrscheinlich stark zum Tragen kommt. Durch die Substratinaktivierung der BAL wird die Laufzeit der Zweiphasensysteme mit MTBE, MIBK bzw. 2-Methyl-THF als Lösungsmittelphase deutlich verringert.

Die Substratinaktivierung der Lyase scheint zudem sehr schnell einzutreten, denn in keinem der drei genannten Zweiphasensysteme konnte ein stabiler Betriebspunkt erreicht werden. Unterschiedlich starke inaktivierende Effekte der Lösungsmittel (molekulare und Phasentoxizität) auf die BAL scheinen durch den inaktivierenden Effekt des Substrates 2-Furaldehyd nahezu vollständig überlagert zu werden. Somit können durch einen Lösungsmittelwechsel kaum erhöhte Umsätze erzielt werden.

Tabelle 3.3 zeigt zudem, dass die BAL unter genannten Prozessbedingungen in den Zweiphasensystemen mit den drei neu getesteten Lösungsmitteln sehr ähnliche Halbwertszeiten aufweist. So liegen die Halbwertszeiten der BAL in Zweiphasensystemen mit MTBE, MIBK bzw. 2-Methyl-THF als Lösungsmittelphase alle zwischen 2-3 h. Bei Verwendung von MTBE als Lösungsmittelphase kann die ermittelte Halbwertszeit der BAL von $2,4 \pm 0,26$ h mit Ergebnissen von van den Wittenboer [2009] verglichen werden, die für die nicht-immobilisierte BAL bei einer 2-Furaldehydkonzentration von 100 mmol L^{-1} eine ähnliche Halbwertszeit von $1,5 \pm 0,1$ h ermittelte. Die kaum variierenden Halbwertszeiten der BAL beim Einsatz der drei unterschiedlichen Lösungsmittelphasen zeigen, dass die Inaktivierung des Enzyms durch das gewählte Lösungsmittel die BAL-Prozessstabilität letztlich kaum beeinflusst. Die sehr niedrigen Halbwertszeiten der BAL unter Prozessbedingungen im jeweiligen Zweiphasensystem mit MTBE, MIBK und 2-Methyl-THF als organischer Phase stehen nicht im Einklang mit Ergebnissen von Stillger [2004], Schmidt [2008] und Shanmuganathan [2010]. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Lagerstabilität der BAL in den aufgeführten Zweiphasensystemen im Vergleich zu einem rein wässrigen System, nicht verringert sondern gegenteilig teilweise sogar gesteigert wird. Die sehr niedrige Prozessstabilität der BAL in den genannten Zweiphasensystemen kann also sehr wahrscheinlich auf die Substratinaktivierung zurückgeführt werden. Dies bestätigt die Annahme, dass inaktivierende Effekte des Substrates Lösungsmittelleffekte stark überwiegen.

Tabelle 3.3. Halbwertszeiten der BAL beim Einsatz im gelstabilisierten Zweiphasensystem mit *n*-Hexan, MTBE, MIBK bzw. 2-Methyl-THF als Lösungsmittel im kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor. Die Halbwertszeiten wurden graphisch aus der Abnahme der Umsätze der 2,2'-Furoinsynthese, unter Annahme einer Reaktion erster Ordnung, ermittelt. Die Reaktion wurde mit 25 U BAL bei 20 °C, einer 2-Furaldehydkonzentration von 30 mmol L⁻¹ und einer Verweilzeit von 2 h durchgeführt.

Lösungsmittel	Halbwertszeit [h]
<i>n</i> -Hexan	23,3±6,6
MTBE	2,4±0,26
MIBK	3±0,27
2-Methyl-THF	2±0,37

Bei Interpretation der erzielten Ergebnisse im wässrigen/Hexan Zweiphasensystem muss beachtet werden, dass hier im Gegensatz zu den weiteren Zweiphasensystemen keine Wirbelschicht der PVA/PEG-BAL-Immobilisate aufgebaut werden konnte. Die PVA/PEG-Kugeln bildeten ein Agglomerat, welches sich am Boden des Reaktionsgefäßes befand. Eine Durchmischung und Aufwirbelung der PVA-Kugeln war zu keinem Zeitpunkt der Synthese zu beobachten. Dies ist mit der, im Vergleich zu den Wasserlöslichkeiten von MTBE (26 g L⁻¹), 2-Methyl-THF (16 g L⁻¹) und MIBK (12 g L⁻¹), geringen Wasserlöslichkeit des *n*-Hexans von lediglich 0,016 g L⁻¹, zu begründen. In *n*-Hexan sind nur Spuren von Wasser gelöst und es findet kaum Diffusion des Wassers aus der Polymermatrix in die umgebende Lösungsmittelphase statt. Aufgrund dessen agglomerieren die hydrophilen PVA/PEG/Wasser-Immobilisate, um die Oberfläche zur umgebenden hydrophoben Phase zu minimieren. Eine Aufwirbelung der Kugeln ist somit nur sehr schwer zu erreichen. Bei allen anderen eingesetzten Lösungsmitteln konnte dagegen eine stabile Wirbelschicht über die gesamte Reaktionsdauer hinweg aufrecht gehalten werden. Die Verklumpung der PVA/PEG-BAL-Immobilisate im wässrigen/Hexan Zweiphasensystem führt zur Limitierung der Substratdiffusion außerhalb der Kugeln. Es kann also davon ausgegangen werden, dass im wässrigen/Hexan Zweiphasensystem in der wässrigen Phase eine deutlich niedrigere Substratkonzentration vorliegt als in den übrigen Zweiphasensystemen. Dies hat zur Konsequenz, dass im wässrigen/Hexan Zweiphasensystem die Substratinkativierung der BAL deutlich schwächer ausfällt als in den übrigen Zweiphasensystemen. Hierdurch kommt es bei Verwendung von *n*-Hexan als Lösungsmittelphase zu einer, im Vergleich bei Verwendung von MTBE, 2-Methyl-THF und MIBK als Lösungsmittelphase, signifikant höheren Reaktionslaufzeit von über 36 h. Auch der stabile Betriebspunkt im Wirbelschichtreaktor, der

ausschließlich beim Einsatz von *n*-Hexan als Lösungsmittelphase beobachtet wurde, lässt sich durch die geringere Substratkonzentration in der wässrigen Phase und dadurch bedingte schwächere Inaktivierung des Enzyms durch seine eigenen Substrate, erklären. Auch hier wird demnach deutlich, dass die Substratinaktivierung der BAL mögliche Inaktivierungen durch die gewählten Lösungsmittel zu überlagern scheint.

Die, im Vergleich zu den BAL-Halbwertszeiten im wässrigen/MTBE, MIBK bzw. 2-Methyl-THF Zweiphasensystem, signifikant höhere BAL-Halbwertszeit im wässrigen/Hexan Zweiphasensystem von $23,3 \pm 6,6$ h (s. Tab. 3.3) unterstützt diese Annahme zusätzlich. Da im letzt genannten Zweiphasensystem eine deutlich niedrigere Aldehydkonzentration in der wässrigen Phase angenommen wird, ist die Substratinaktivierung der BAL sehr wahrscheinlich geringer und es kann eine längere Halbwertszeit erzielt werden.

Zur Verifizierung der Vermutung, dass die Substratinaktivierung der BAL mögliche Inaktivierungseffekte des Lösungsmittels vollständig überlagert, wurde im Folgenden eine BAL-Variante im kontinuierlich betriebenen Wirbelschichtreaktor eingesetzt. Diese BAL-Variante wurde im Hinblick auf erhöhte Lösungsmittelstabilität entwickelt [van den Wittenboer, 2009].

3.2.2 BAL-Variante

Zur Untersuchung der inaktivierenden Effekte, die im kontinuierlich betriebenen Zweiphasensystem auf die BAL einwirken, wurde eine BAL-Variante im Wirbelschichtreaktor eingesetzt. Die verwendete Variante (BAL-V175N, I176D, I177T) war von van den Wittenboer [2009] durch gerichtete Mutagenese oberflächenständiger Aminosäuren im Hinblick auf erhöhte Lösungsmittelstabilität entwickelt worden. Die Hydrophilie der BAL-Oberfläche wurde hierfür gesteigert, um durch mögliche neue nicht-kovalente Interaktionen (z. B. ionische Wechselwirkungen) die Wahrscheinlichkeit von partiellen Entfaltungsvorgängen, die der Ansatzpunkt für die irreversible Inaktivierung von Enzymen durch Lösungsmittel sind, zu verringern. Die Stabilisierung gegenüber dem Substrat war und konnte dagegen nicht Ziel der gerichteten Mutagenese sein, da der

Inaktivierungsmechanismus bis heute nicht aufgeklärt ist. Eine Stabilisierung gegenüber dem Substrat war daher nicht zu erwarten.

Van den Wittenboer [2009] konnte für die BAL-Variante (V175N, I176D, I177T), im Vergleich zum nativen Enzym, in MTBE eine signifikant höhere Lagerstabilität nachweisen. Der Effekt der molekularen Toxizität wurde in einem Einphasensystem mit MTBE gesättigtem Puffer ermittelt. Die Phasentoxizität wurde dagegen in einem Wasser/MTBE Zweiphasensystem gemessen. Im Einphasensystem konnte für die BAL-Variante eine fast doppelt so hohe Lagerstabilität gemessen werden, im Zweiphasensystem war die Lagerstabilität 1,8mal größer als die des nativen Proteins.

Die BAL-Variante wurde exemplarisch im MTBE/Wasser Zweiphasensystem unter Reaktionsbedingungen eingesetzt. Wenn im Wirbelschichtreaktor der inaktivierende Effekt der Lösungsmittel andere inaktivierende Effekte, wie vor allem die Substratinaktivierung überwiegt, dann sollten sich beim Einsatz der BAL-Variante eine deutlich höhere Reaktionslauf- und Halbwertszeit und höhere Umsätze ergeben als beim Einsatz der nativen BAL. Ändern sich die genannten Parameter beim Einsatz der BAL-Variante nicht, so ist davon auszugehen, dass die Substratinaktivierung Lösungsmittelleffekte überlagert.

In Abbildung 3.8 sind die erzielten Umsätze der Furoinsynthese bei Verwendung der nativen BAL und der BAL-Variante als Biokatalysator dargestellt.

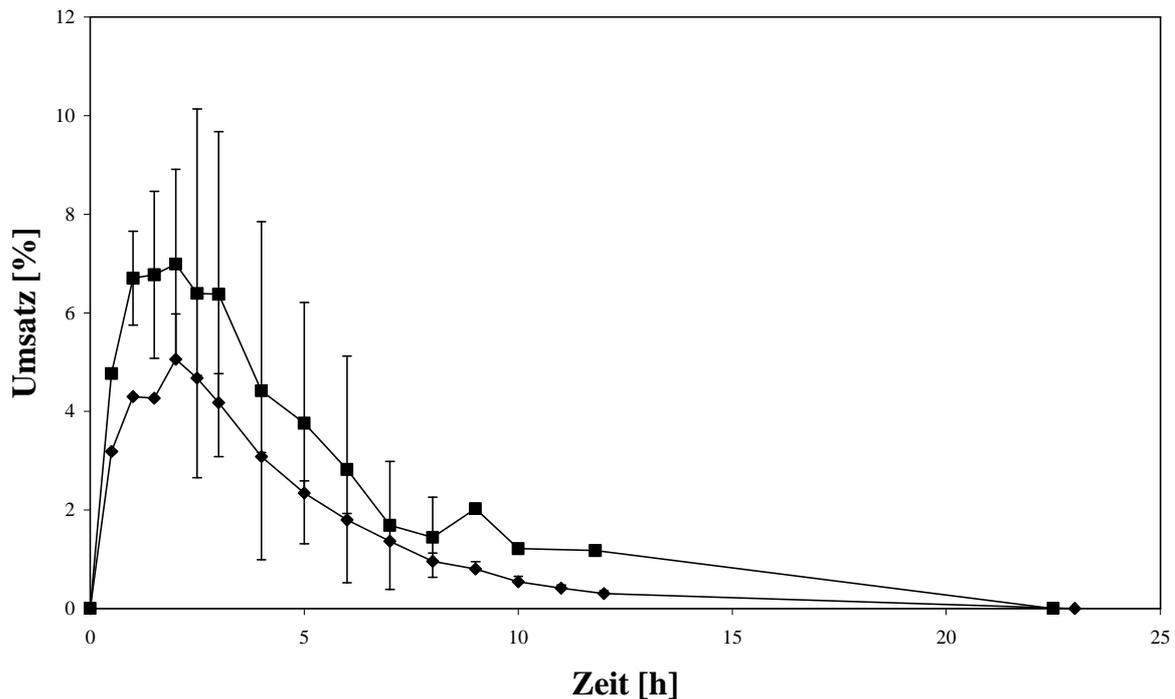


Abbildung 3.8. Prozentuale Umsätze der (*R*)-2,2'-Furoinsynthese im gelstabilisierten Zweiphasensystem mit MTBE als Lösungsmittelfase und der nativen BAL (Rauten) bzw. der BAL-Variante(V175N, I176D, I177T) (Quadrate) als Katalysator in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer. Die Reaktion wurde mit 25 U BAL bei 20 °C, einer 2-Furaldehydkonzentration von 30 mmol L⁻¹ und einer Verweilzeit von 2 h durchgeführt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich beim Einsatz der BAL-Variante(V175N, I176D, I177T) keine längere Laufzeit der Synthese im Wirbelschichtreaktor ergibt. Unter Verwendung beider Biokatalysatoren liegt die Laufzeit zwischen 13 und 23 h. Auch bei den ermittelten Halbwertszeiten ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Für die BAL-Variante wurde eine Halbwertszeit von $2,3 \pm 0,46$ h ermittelt. Die Halbwertszeit der nativen BAL im MTBE/Wasser Zweiphasensystem liegt bei $2,4 \pm 0,26$ h. Die gemessenen prozentualen Umsätze liegen beim Einsatz der BAL-Variante zwar etwas höher (maximaler Umsatz = $6,98\% \pm 1,92$) als beim Einsatz der nativen BAL (maximaler Umsatz = $5,05\% \pm 0,92$), unter Berücksichtigung der großen Standardabweichungen ergeben sich jedoch auch hier keine signifikanten Unterschiede. Die im Vergleich zum Wildtyp ca. doppelt so hohe Lagerstabilität der BAL-Variante in MTBE korreliert also nicht mit einer erhöhten Prozessstabilität. Die Inaktivierung der BAL durch das Substrat 2-Furaldehyd scheint demnach so stark zu sein, dass Lösungsmittelleffekte in den Hintergrund treten. Allein eine verbesserte Stabilität gegenüber den verwendeten Lösungsmitteln kann daher nicht zu einer signifikanten Steigerung der Reaktionslaufzeit oder gar zu erhöhten Umsätzen führen.

Dieses Ergebnis steht mit Messungen von van den Wittenboer [2009] im Einklang, die unter ähnlichen reaktiven Bedingungen im Zweiphasensystem für die nicht-immobilisierte BAL-Variante (V175N, I176D, I177T) ebenfalls eine lediglich minimal erhöhte Prozessstabilität beobachtete. Für die BAL-Variante ermittelte van den Wittenboer eine Halbwertszeit von $1,9 \pm 0,2$ h, für das native Enzym eine Halbwertszeit von $1,5 \pm 0,1$ h.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen also, dass durch eine Immobilisierung der BAL in einer Polymermatrix aus PVA die Prozessstabilität des Enzyms nicht gesteigert werden kann. Da die Substratinaktivierung der BAL Lösungsmittelleffekte ganz offensichtlich stark überlagert, stellt das gewählte kontinuierliche Reaktionssystem aufgrund der kontrollierbaren Substratkonzentration eine gute Wahl dar und es erscheint sinnvoll, eine sehr niedrige Substratkonzentration einzustellen. Die Inaktivierung der BAL durch ihre eigenen Substrate scheint jedoch so stark zu sein, dass selbst geringe Aldehydkonzentrationen noch zu einer raschen Inaktivierung führen. Van den Wittenboer [2009] hatte die Prozessstabilität der BAL-Variante im reaktiven MTBE/Wasser Zweiphasensystem bei einer 2-Furaldehydkonzentration von 100 mmol L^{-1} gemessen. In der vorliegenden Arbeit wurde die BAL-Variante bei einer 2-Furaldehydkonzentration von lediglich 30 mmol L^{-1} im Wirbelschichtreaktor eingesetzt und dennoch ist die Substratinaktivierung so stark, dass weder hohe Umsätze noch hohe Halbwerts- und Laufzeiten erzielt werden können. Selbst eine weitere drastische Reduzierung der Substratkonzentration auf lediglich 5 mmol L^{-1} brachte keine signifikante Verbesserung der Parameter mit sich.

Bevor die BAL daher in großtechnischen Synthesen erfolgreich eingesetzt werden kann, ist es unerlässlich den Inaktivierungsmechanismus der Substrate genau aufzuklären. So wäre es z. B. hilfreich die kritische Substratkonzentration für die BAL zu ermitteln, um die Reaktionsführung genau anzupassen. Aufgrund der Kontrollierbarkeit der Substratkonzentration sind kontinuierliche und semikontinuierliche (FedBatch) gegenüber satzweisen Reaktionsführungen zu bevorzugen. Da die Substratinaktivierung der BAL jedoch sehr stark zu sein scheint und schon bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen auftritt, erscheint es als unerlässlich, eine BAL-Variante mit erhöhter Stabilität gegen die eigenen Substrate herzustellen. Für den gezielten Austausch von Aminosäuren im Protein durch gerichteten

Mutagenese müsste jedoch zunächst der Inaktivierungsmechanismus aufgeklärt werden. Die Herstellung von BAL-Varianten mit gesteigerter Substratstabilität über gerichtete Evolution stellt eine Alternative dar. Allerdings müsste hierfür zunächst ein geeignetes Screeningverfahren der Enzymvarianten etabliert werden und so bedarf es auf diesem Feld weitere intensive Forschung.

3.2.3 Zusammenfassung

Die Untersuchungen zeigen, dass ein Lösungsmittelwechsel keine Möglichkeit der Optimierung der BAL-katalysierten (*R*)-2,2'-Furoinsynthese im kontinuierlich betriebenen Wirbelschichtreaktor bietet. Obwohl die Verteilungskoeffizienten des Produktes zwischen der wässrigen und der jeweiligen Lösungsmittelphase auf eine höhere Produktextraktionskraft der ausgewählten Lösungsmittel schließen lassen, konnte hierdurch das thermodynamische Gleichgewicht scheinbar nicht zur Produktseite hin verschoben werden. Es wurden keine signifikant höheren Umsätze als in *n*-Hexan gemessen. Lediglich die Racemisierung des gebildeten (*R*)-2,2'-Furoins in der wässrigen Phase konnte durch den Lösungsmittelwechsel vollständig unterbunden werden.

Im wässrigen/Hexan Zweiphasensystem konnte aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit des *n*-Hexans, im Gegensatz zu den weiteren untersuchten Zweiphasensystemen, keine Wirbelschicht der PVA-Immobilisate aufgebaut werden. Das Agglomerat der Hydrogele korrelierte mit einer signifikant längeren Reaktionslaufzeit. Da aufgrund der Agglomeratbildung der Stofftransport wahrscheinlich stark gemindert wurde, ist die Substratkonzentration in der Wasserphase dieses Zweiphasensystems wahrscheinlich bedeutend geringer als in den übrigen Zweiphasensystemen. Es war also anzunehmen, dass die Substratinaktivierung der BAL inaktivierende Effekte der Lösungsmittel überlagert. Diese Annahme wurde durch die sehr ähnlichen Halbwertszeiten der BAL in reaktiven Zweiphasensystemen mit MTBE, MIBK bzw. 2-Methyl-THF als organischer Phase bestätigt. Die Wahl des Lösungsmittels schien die Prozessstabilität der BAL kaum zu beeinflussen.

Zur Verifizierung dieser Annahme wurde eine BAL-Variante, die eine ca. doppelt so hohe Lagerstabilität in MTBE aufweist wie die native BAL, im reaktiven wässrigen/MTBE

Zweiphasensystem im Wirbelschichtreaktor eingesetzt. Da sich dabei für die BAL-Variante keine höhere Lauf- und Halbwertszeit ergab und auch keine höheren Umsätze erzielt wurden, muss die Inaktivierung der BAL durch ihre eigenen Substrate die Inaktivierung durch Lösungsmittel deutlich überwiegen.

Auch eine Immobilisierung der BAL in PVA steigert demnach die Stabilität des Enzyms gegen seine eigenen Substrate nicht. Die Substratinaktivierung scheint so stark zu sein, dass selbst niedrig gehaltene Substratkonzentrationen von 5 mmol L^{-1} im kontinuierlichen Reaktionssystem noch zu einer raschen Inaktivierung des Proteins führen. Die erfolgreiche Synthese chiraler α -Hydroxyketone mithilfe der BAL wird demnach voraussichtlich erst gelingen, wenn BAL-Varianten mit erhöhter Stabilität gegenüber ihrer Substrate hergestellt werden. Hierfür ist die vollständige Aufklärung des Inaktivierungsmechanismus von großer Bedeutung.

3.3 Chemoenzymatische Eintopfsynthese von (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin durch Kombination Pd-katalysierter Kreuzkupplung und BAL-katalysierter Carboligation

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Synthese des sterisch sehr anspruchsvollen α -Hydroxyketons 4,4'-Biphenylbenzoin durch Kombination einer Palladium-katalysierten Suzuki-Kupplung mit einer BAL-katalysierten Carboligation (s. Abb. 3.9). In der Suzuki-Kupplung sollte das sterisch anspruchsvolle Substrat der anschließenden Carboligation, 4-Biphenylcarboxaldehyd, aus der einfachen Vorstufe 4-Brombenzaldehyd aufgebaut werden. In der nachfolgenden Enzymreaktion sollten zwei 4-Biphenylcarboxaldehyde stereoselektiv zu (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin verknüpft werden.

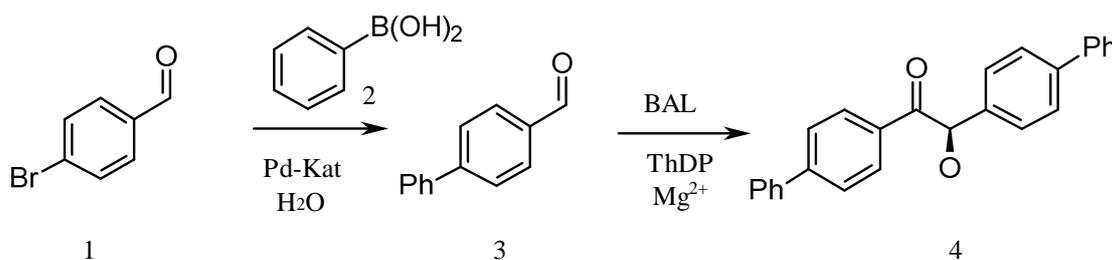


Abbildung 3.9. Reaktionsschema der chemoenzymatischen Eintopfsynthese von (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin durch Kombination der Palladium-katalysierten Suzuki-Kupplung und der anschließenden BAL-katalysierten Carboligation. 1: 4-Brombenzaldehyd; 2: Phenylboronsäure; 3: 4-Biphenylcarboxaldehyd, 4: (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin.

Sowohl die Suzuki-Kupplung als auch die enzymkatalysierte Carboligation wurden, bevor sie miteinander kombiniert wurden, einzeln charakterisiert und optimiert.

3.3.1 Suzuki-Kupplung

Für die Suzuki-Kupplung von 4-Brombenzaldehyd und Phenylboronsäure wurde analog zu Burda *et al.* [2008], der Standardkatalysator Bis-(triphenylphosphin)-palladiumdichlorid (PPh₃)₂PdCl₂ (s. Abb. 3.10) in Kombination mit der Base Natriumcarbonat (Na₂CO₃) eingesetzt.

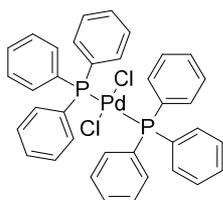


Abbildung 3.10. Strukturformel des Bis-(triphenylphosphin)-palladiumdichloridkatalysators.

Burda *et al.* [2008] kombinierten ebenfalls eine Pd-katalysierte Kreuzkupplung mit einer enzymatisch katalysierten Reaktion, allerdings mit anderen Substraten und einem anderen Biokatalysator. In der Suzuki-Reaktion wurde Phenylboronsäure mit 1-(4-Bromphenyl)-ethanon zu 4-Phenylacetophenon gekuppelt, welches nachfolgend mithilfe einer Alkoholdehydrogenase zum entsprechenden chiralen Alkohol reduziert wurde. Für die Kreuzkupplung wurde beim Einsatz von 1,1 Äquivalenten Phenylboronsäure und 40 Äquivalenten der Base Na_2CO_3 eine optimale Reaktionstemperatur von 70 °C ermittelt und eine Ausbeute von 95% erzielt.

Diese optimierten Reaktionsbedingungen wurden auf die $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ -katalysierte Kreuzkupplung von Phenylboronsäure mit 4-Brombenzaldehyd übertragen. Entgegen den Erwartungen konnte so jedoch lediglich eine Ausbeute von 15% erreicht werden. Eine ^1H -NMR-Analyse der Produkte aus der Suzuki-Reaktion zeigte, dass neben dem eigentlichen Hauptprodukt 4-Biphenylcarboxaldehyd zusätzlich eine Carbonsäure entstanden war. Im ^1H -NMR-Spektrum war deutlich ein für Carboxylgruppen charakteristischer Peak bei 11,64 ppm zu erkennen. Auch die Bildung eines Alkohols wurde durch einen sehr schwachen Peak bei 4,4 ppm angedeutet. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Substrat 4-Brombenzaldehyd bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C und 40 Äquivalenten der Base Natriumcarbonat zu 4-Brombenzoesäure und 4-Brombenzylalkohol disproportioniert ist. Diese Annahme steht im Einklang mit der bereits 1853 von Cannizzaro beschriebenen Cannizzaro-Reaktion, bei der arylische Aldehyde unter Temperaturerhöhung und in Gegenwart starker Basen zu Derivaten der Benzoesäure und des Benzylalkohols disproportionieren (s. Abb. 3.11).

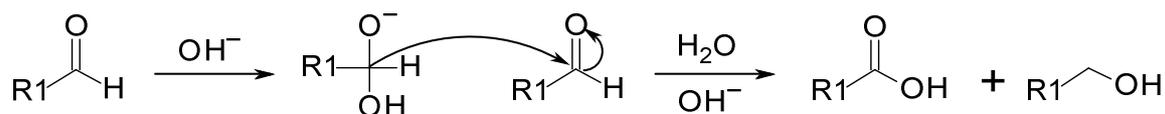


Abbildung 3.11. Mechanismus der Disproportionierung arylischer Aldehyde bei hoher Temperatur und in Gegenwart starker Basen nach Cannizzaro [1853]. R₁ steht für arylischer Rest.

Aufgrund der festgestellten Disproportionierung des Substrates 4-Brombenzaldehyd mussten die Reaktionsbedingungen der Suzuki-Kreuzkupplung im Bezug auf die Reaktionstemperatur und den zugegebenen Basenäquivalenten optimiert werden. Bei niedrigen Reaktionstemperaturen verläuft die Bildung von Hydroxidionen aus der Reaktion von Carbonationen mit Wasser langsamer ab und durch die Reduktion der zugegebenen Basenäquivalente liegen generell weniger Hydroxidionen im Reaktionsansatz vor. Da Hydroxidionen die Disproportionierung arylischer Aldehyde nach Cannizzaro initiieren, wurden eine geringere Disproportionierung des Substrates und dadurch eine höhere Produktausbeute bei Herabsetzung der Temperatur und der Basenkonzentration erwartet.

Zunächst wurden nur die zugegebenen Basenäquivalente von 40 auf 20 halbiert und die Reaktionstemperatur bei 70 °C belassen. Unter diesen Bedingungen konnte die Substratdisproportionierung jedoch lediglich gemildert und die Ausbeute nur leicht von 15 auf 25% gesteigert werden. Erst beim Herabsetzen der Reaktionstemperatur auf 55 °C und einer weiteren drastischen Reduzierung der eingesetzten Basenäquivalente auf einen Wert von 2, konnte eine zufriedenstellende Ausbeute von 56±13% erzielt werden. Schon kleine Erhöhungen der Basenäquivalente führten zu deutlichen Verlusten der Ausbeute.

Die maximal erzielbare Ausbeute von 56±13% entspricht damit nicht dem Wert von 95% nach Burda *et al.* [2008]. In Anbetracht der höheren Empfindlichkeit der Aldehyde im Vergleich zu Ketonen, die bei Burda *et al.* als Substrate eingesetzt wurden, ist dies jedoch ein sehr zufriedenstellendes Ergebnis.

3.3.2 Charakterisierung der BAL-katalysierten Carboligations

Die BAL-katalysierte Carboligation sollte im Hinblick auf Ausbeute und Enantiomerenüberschuss charakterisiert werden. Da das Substrat 4-Biphenylcarboxaldehyd und auch das

Produkt schlecht wasserlöslich ist, wurde zusätzlich die Verwendung der Cosolventien DMSO und DMF untersucht. Die Durchmischung der wässrigen Phase mit 20% (v/v) dieser Cosolventien hatte sich bereits in der Benzoin synthese bewährt [Demir, Sesenoglu *et al.*, 2002; Schmidt, 2008].

Die Verwendung von DMF als Löslichkeitsvermittler erwies sich als nachteilig, da mittels HPLC-Analytik neben dem eigentlichen Produkt 4,4'-Biphenylbenzoin nicht weiter spezifizierte Nebenprodukte detektiert wurden. Eine Möglichkeit der unerwünschten Nebenproduktbildung ist die Reaktion zwischen der Carbonylgruppe des Substrates und der Amidfunktion des DMFs. Auch eine BAL-katalysierte Carboligation zwischen DMF und dem Substrat 4-Biphenylcarboxaldehyd ist nicht auszuschließen. In diesem Fall würde ein weiteres nicht erwünschtes α -Hydroxyketon entstehen. Nach 7 Tagen Reaktionszeit konnte das gewünschte Produkt 4,4'-Biphenylbenzoin zwar detektiert werden, jedoch lediglich mit einer geringen Ausbeute von 32%. DMF kommt demnach nicht als Löslichkeitsvermittler in Frage.

Der Einsatz von 20% DMSO als Löslichkeitsvermittler erwies sich dagegen als vorteilhaft, denn im Vergleich zur Synthese im gepufferten wässrigen System ohne Cosolvens konnte die Reaktionsgeschwindigkeit stark erhöht werden. Nach 4 Tagen Reaktionszeit lag die Ausbeute bei Verwendung von DMSO bei 96%, während sie im rein wässrigen System erst bei 69% lag. Die *ees* lagen in beiden Einphasensystemen bei über 99,99%. Da zudem bekannt ist, dass DMSO in einer Konzentration von 20% (v/v) die Stabilität der BAL nicht negativ beeinflusst, sondern sogar stabilisierend auf das Protein wirkt [Stillger, 2004], eignet sich DMSO bei der stereoselektiven BAL-katalysierten Carboligation von 4-Biphenylcarboxaldehyd hervorragend als Löslichkeitsvermittler.

Da die erzielbare Gesamtausbeute der enzymatischen Reaktion mit 99% wesentlich höher ist als die erzielte maximale Ausbeute der chemisch katalysierten Suzuki-Kupplung von 56%, wurde in Betracht gezogen, die Reihenfolge der beiden Reaktionen zu vertauschen. Wird die BAL-katalysierte Carboligation mit hohem Umsatz der Pd-katalysierten Kreuzkupplung mit niedrigerem Umsatz vorgeschaltet, so kann letztendlich die Gesamtausbeute an 4,4'-Biphenylbenzoin in der Eintopfsynthese erhöht werden. Die Umkehrung der Reaktionsreihenfolge hätte zur Konsequenz, dass die BAL anstelle der Carboligation von

4-Biphenylcarboxaldehyd die Carboligation von 4-Brombenzaldehyd katalysieren müsste. Das dabei entstehende (*R*)-4,4'-Dibrombenzoin würde in der anschließenden Pd-katalysierten Kreuzkupplung mit Phenylboronsäure zu (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin umgesetzt werden (s. Abb. 3.12).

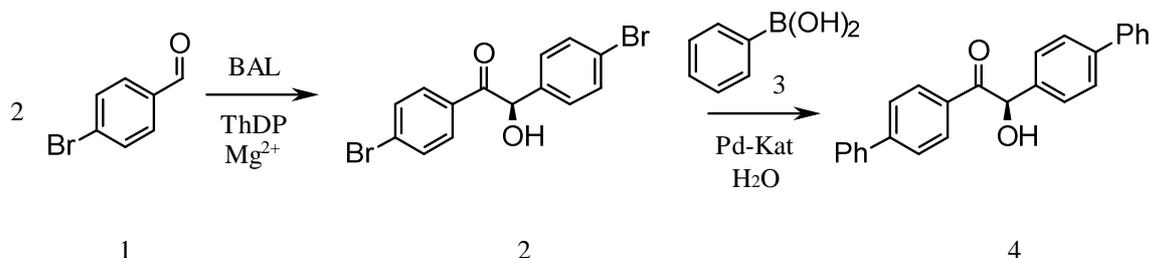


Abbildung 3.12. Reaktionsschema der chemoenzymatischen Eintopfsynthese von (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin mit der BAL-katalysierten Carboligation im ersten Schritt und nachfolgender Pd-katalysierter Suzuki-Kupplung. 1: 4-Brombenzaldehyd; 2: (*R*)-4,4'-Dibrombenzoin; 3: Phenylboronsäure; 4: (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin.

Aufgrund dessen wurde auch die BAL-katalysierte Carboligation zweier 4-Brombenzaldehyde hinsichtlich Ausbeute und *ee* charakterisiert. Da sich DMSO zuvor bereits als geeignetes Cosolvens herausgestellt hatte, wurde es bei dieser Charakterisierung ebenfalls in einer Konzentration von 20% eingesetzt. Für die Carboligation von 4-Brombenzaldehyd konnte analog zur Carboligation von 4-Biphenylcarboxaldehyd unter Verwendung von DMSO eine Ausbeute von über 99% und ein *ee* von über 99,99% erreicht werden. Allerdings war die Reaktionsgeschwindigkeit ca. um den Faktor 100 größer. Eine Umkehrung der Reaktionsreihenfolge in der chemoenzymatischen Eintopfsynthese von (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin erscheint demnach sehr erfolgversprechend.

3.3.3 Einfluss der Phenylboronsäure auf die BAL-Aktivität

Da die Reaktionsbedingungen der Suzuki-Kupplung mit einer Reaktionstemperatur von 55 °C und einem stark alkalischen pH-Wert von über 12 zu harsch für die BAL sind, sollte die Eintopfsynthese ohne Zwischenaufreinigung in einem Reaktionsgefäß, jedoch mit nacheinander ablaufenden Reaktionen durchgeführt werden. Zwischen der enzymatisch und der chemisch katalysierten Reaktion sollten Reaktionstemperatur und pH-Wert an den jeweiligen Katalysator angepasst werden. Wird erst die Suzuki-Kupplung durchgeführt, so

muss die BAL trotz Gegenwart nicht abreagierter Phenylboronsäure im Reaktionsgemisch eine genügend hohe Restaktivität zeigen, um die nachfolgende Carboligation mit hohen Ausbeuten zu katalysieren. Wird dagegen die BAL-katalysierte Reaktion der Pd-katalysierten Reaktion vorangestellt, so könnten die möglicherweise inaktivierenden Effekte der Suzuki-Kupplungs Komponenten auf das Protein umgangen werden.

Um beide Optionen offen zu halten, wurde der Effekt der Organoboronsäure auf die BAL untersucht. Hierfür wurde der gekoppelte BAL-Aktivitätstest herangezogen, bei dem die NADH_2 -Abnahme spektrometrisch verfolgt werden kann (s. 2.2.10). Die gemessenen Enzymaktivitäten wurden dabei mit der Aktivität der Enzymlösung ohne Zusatz von Phenylboronsäure ins Verhältnis gesetzt (s. Abb. 3.13).

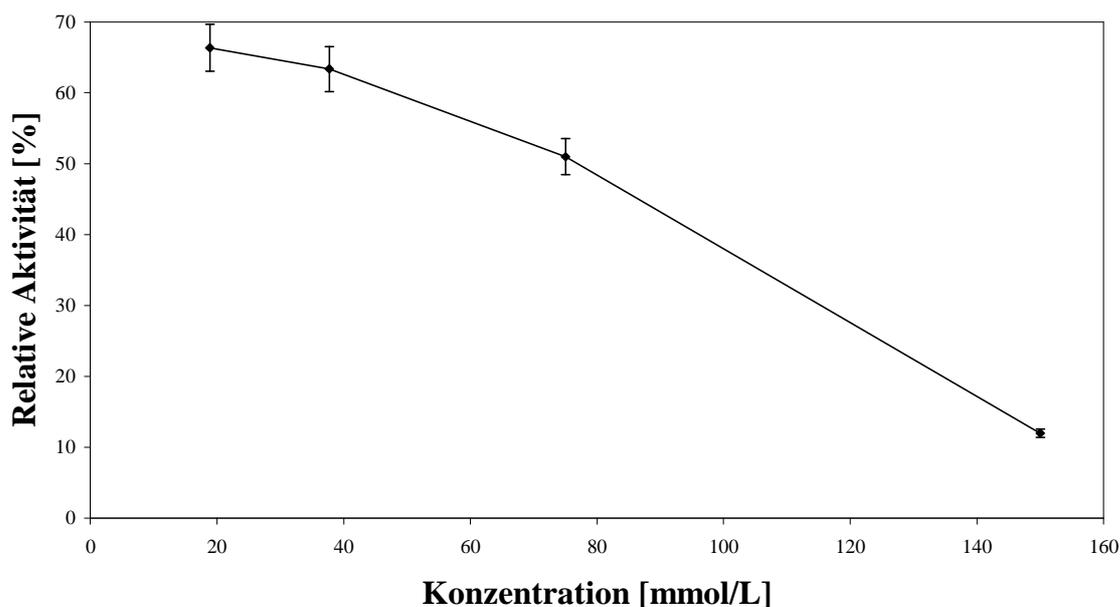


Abbildung 3.13. Relative Aktivität der BAL in Abhängigkeit verschiedener Phenylboronsäurekonzentrationen ($19,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $37,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $75,0 \text{ mmol L}^{-1}$ und 150 mmol L^{-1}). Für die Ermittlung der BAL-Aktivität wurde die Benzoinspaltung in Kombination mit der Alkoholdehydrogenase-katalysierten Aldehydreduktion verwendet.

Aus Abbildung 3.13 geht hervor, dass die BAL-Restaktivität schon bei einer geringen Phenylboronsäurekonzentration von 19 mmol L^{-1} auf knapp 70% absinkt. Die Abnahme der BAL-Aktivität in Abhängigkeit von der Phenylboronsäurekonzentration verläuft nicht linear, nimmt jedoch mit zunehmender Organoboronsäurekonzentration stetig zu. So führt eine Erhöhung der Phenylboronsäurekonzentration von 19 mmol L^{-1} auf 37 mmol L^{-1} lediglich zu

einer geringen weiteren Abnahme der BAL-Restaktivität von 70 auf ca. 63%. Bei weiter steigenden Phenylboronsäurekonzentrationen von 75 und schließlich 150 mmol L⁻¹ sinkt die BAL-Restaktivität jedoch rapide auf einen Wert von 51% bzw. 12% ab. Entscheidend ist jedoch, dass bei einer Phenylboronsäurekonzentration von 27,5 mmol L⁻¹, die zu Beginn der Suzuki-Kupplung eingesetzt wird, eine ausreichende BAL-Restaktivität von ca. 65% vorhanden ist.

Auch wenn der inaktivierende Effekt der Phenylboronsäure im verwendeten Konzentrationsbereich relativ gering ist, ist es wichtig die Organoboronsäure nicht im großen Überschuss einzusetzen, damit möglichst geringe Säurerestkonzentrationen im Reaktionsgemisch der Suzuki-Kupplung zurückbleiben. Zudem wird durch den gemessenen inaktivierenden Effekt der Säure bestätigt, dass es sinnvoll scheint die enzymkatalysierte Carboligation der Pd-katalysierten Kreuzkupplung voranzustellen.

3.3.4 Kombination der Pd-katalysierten Suzuki-Kupplung und der BAL-katalysierten Carboligation

BAL-katalysierte Carboligation im ersten Schritt der Eintopfsynthese

Aufgrund der höheren Ausbeute der Carboligation im Vergleich zur Suzuki-Kupplung (s. 3.3.1) und aufgrund der leichten Inaktivierung der BAL durch die in der Kreuzkupplung eingesetzte Phenylboronsäure (s. 3.3.3), wurde die Eintopfsynthese von (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin zunächst mit der Carboligation als ersten Schritt getestet. Hierfür musste jedoch zuvor untersucht werden, ob die Suzuki-Kupplung mit dem dann entstehenden Zwischenprodukt (*R*)-4,4'-Dibrombenzoin (s. Abb. 3.12) durchführbar ist. Da 4,4'-Dibrombenzoin käuflich nicht zu erwerben ist, wurde es mithilfe der BAL synthetisiert und anschließend aufgereinigt (s. 2.2.7). Hierbei zeigte sich, dass 4,4'-Dibrombenzoin wie auch 2,2'-Furoin (s. 3.2.) sehr oxidationsempfindlich ist. Während des Aufreinigungsprozesses durch Extraktion und Säulen über Kieselgel trat eine immer stärker werdende Gelbfärbung auf, die auf die Bildung des Diketons 4,4'-Dibrombenzil hindeutet. Dennoch wurde die (PPh₃)₂PdCl₂-katalysierte Suzuki-Kupplung mit 4,4'-Dibrombenzoin als Substrat unter den in Kapitel 3.3.1 ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Es konnte eine mit zunehmender Reaktionsdauer immer stärkere Gelbfärbung des Reaktionsansatzes beobachtet

werden und die ermittelte maximale Ausbeute betrug aufgrund der Oxidation des Substrates letztendlich nur 24%.

Die so erzielte maximale Ausbeute von 24% ist, verglichen mit der maximalen Ausbeute der Suzuki-Kupplung von $56\pm 13\%$ beim Einsatz von 4-Brombenzaldehyd als Substrat, sehr gering. Daher wurde auf die Durchführung der Eintopfsynthese mit der Carboligation als ersten Reaktionsschritt verzichtet. Stattdessen wurde die Eintopfsynthese in der ursprünglich geplanten Reaktionsreihenfolge untersucht.

BAL-katalysierte Carboligation im zweiten Reaktionsschritt der Eintopfsynthese

Bei der Durchführung der chemoenzymatischen Eintopfsynthese von (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin mit der Pd-katalysierten Kreuzkupplung im ersten Reaktionsschritt und der nachfolgenden enzymkatalysierten Carboligation wurde zunächst die Suzuki-Kupplung abgeschlossen. Phenylboronsäure, Natriumcarbonat, 4-Brombenzaldehyd und der Palladiumkatalysator wurden hierfür in Wasser vorgelegt und das Reaktionsgemisch wurde für 17 h auf 55 °C erhitzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abgekühlt, der pH-Wert auf 8,0 eingestellt und die Cofaktoren der BAL ThDP und Mg^{2+} sowie das Enzym selbst hinzugegeben. Die Reaktionszeit betrug 48 h und bereits nach wenigen Minuten kristallisierte 4,4'-Biphenylbenzoin aus. Die maximal erzielte Gesamtausbeute der Eintopfsynthese lag bei 60%. Der *ee* lag bei über 99,99; es konnte kein (*S*)-Enantiomer detektiert werden. Damit gelang erstmals die enantioselektive Synthese des sterisch sehr anspruchsvollen α -Hydroxyketons (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin mit einer zufriedenstellenden Gesamtausbeute und einem exzellenten *ee*.

3.3.5 Zusammenfassung

Bei der Charakterisierung der Suzuki-Kupplung von 4-Brombenzaldehyd und Phenylboronsäure wurde bei den ursprünglich gewählten Reaktionsbedingungen von 70 °C als Reaktionstemperatur und 40 eingesetzten Äquivalenten der Base Natriumcarbonat eine Disproportionierung des Substrates beobachtet. Daher musste die Suzuki-Kupplung hinsichtlich Reaktionstemperatur und eingesetzter Basenäquivalente optimiert werden. Bei

einer Temperatur von 55 °C und lediglich 2 Äquivalenten Natriumcarbonat konnte eine hohe Ausbeute von $56\pm 13\%$ erzielt werden.

In der anschließenden Charakterisierung der BAL-katalysierten Carboligation zweier 4-Biphenylcarboxaldehyde zu (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin konnten sowohl im rein wässrigen als auch im Einphasensystem mit 20% (v/v) DMSO als Cosolvens Ausbeuten von über 99% und ebenso hohe *ees* gemessen werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit war beim Einsatz des Löslichkeitsvermittlers jedoch höher. DMF erwies sich im Gegensatz zu DMSO aufgrund unerwünschter Nebenreaktionen als ungeeigneter Löslichkeitsvermittler.

Anschließend wurde untersucht, ob die Suzuki-Kupplungs Komponenten einen inaktivierenden Effekt auf die BAL haben. Hierbei stand Phenylboronsäure im Mittelpunkt und es konnte ein inaktivierender Effekt nachgewiesen werden. Dieser war im Säurekonzentrationsbereich, der in der Suzuki-Kupplung eingesetzt wird, jedoch gering.

Um diese, wenn auch schwache Inaktivierung zu umgehen und aufgrund des höheren Umsatzes der enzymkatalysierten Reaktion, wurde eine Umkehrung der Reaktionsreihenfolge der chemoenzymatischen Eintopfsynthese in Erwägung gezogen. Untersuchungen zeigten, dass BAL die Carboligation zweier 4-Brombenzaldehyde mit Umsätzen und *ees* von über 99% und einer um den Faktor 100 höheren Reaktionsgeschwindigkeit als die Carboligation von 4-Biphenylcarboxaldehyd katalysiert. Die anschließende Pd-katalysierte Kreuzkupplung des dann entstehenden Zwischenprodukts 4,4'-Dibrombenzoin gelang aufgrund dessen raschen Oxidation zum Diketon jedoch nur mit einer sehr geringen Ausbeute von 24%. Daher wurde die ursprünglich geplante Reaktionsreihenfolge der Eintopfsynthese beibehalten. Wurde die Suzuki-Kupplung zwischen 4-Brombenzaldehyd und Phenylboronsäure im ersten Schritt und die BAL-katalysierte Carboligation zweier 4-Biphenylcarboxaldehydmoleküle zum Endprodukt (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin im zweiten Reaktionsschritt durchgeführt, so lag die erzielte Gesamtausbeute bei ~60% und der *ee* bei über 99,99%.

Dies ist insgesamt ein sehr zufriedenstellendes Ergebnis, denn es gelang somit erstmals das sterisch anspruchsvolle α -Hydroxyketon (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin enantiomerenrein in einer chemoenzymatischen Eintopfsynthese ohne Zwischenaufreinigung herzustellen. Die

erfolgreiche Optimierung und Kombination der chemo- und enzymkatalysierten Reaktion führt zu hohen Ausbeuten und Enantiomerenüberschüssen, bei gleichzeitiger Einsparung von Zeit, Ressourcen und schädlicher Abfallprodukte. Die Eintopfsynthese chiraler α -Hydroxyketone ist also eine umweltfreundliche und kostengünstige Alternative zur rein chemischen Synthese.

Um in Zukunft noch höhere Gesamtausbeuten erzielen zu können, muss die Suzuki-Kupplung weiter optimiert werden. Zudem bleibt zu überlegen, ob für die chemoenzymatische Synthese im industriellen Maßstab ein verbessertes Reaktionskonzept eingesetzt werden kann. Um die chemo- und enzymkatalysierte Reaktion nicht nur nacheinander in einem Reaktionsgefäß ohne Zwischenaufreinigung, sondern sogar zeitgleich ablaufen zu lassen, würde sich die Immobilisierung und die damit eventuell einhergehende Stabilisierung des Biokatalysators gegenüber den harschen Reaktionsbedingungen der Suzuki-Kupplung anbieten. So wäre es z. B. denkbar die BAL in PVA/PEG-Kugeln zu immobilisieren und die Eintopfsynthese kontinuierlich zu betreiben. Das Problem der Zurückhaltung des Palladiumkatalysators könnte beispielsweise durch den Einsatz eines dendrimeren Palladiumkatalysators [Meise, Haag, 2008], der aufgrund seiner molekularen Größe z. B. durch eine Membran zurückgehalten werden kann, gelöst werden. Zudem zeigten Prüsse *et al.* [1997], dass auch die Immobilisierung des Palladiumkatalysators in PVA/PEG-Matrices möglich ist.

3.4 Ausblick

Nachdem es gelungen ist, standardisierte PVA/PEG-Kugeln im Labormaßstab automatisch zu produzieren, können diese vielversprechenden Immobilisate nun im großtechnischen Maßstab in verschiedensten Reaktortypen eingesetzt werden. Da in der PVA-Matrix sowohl chemische als auch viele Biokatalysatoren sowie ganze Zellen eingehüllt werden können, können diese Immobilisate für die vielfältigsten Synthesen eingesetzt werden.

Ein sehr erfolgversprechender Einsatz dieser Hydrogele ist die BAL-katalysierte Herstellung unterschiedlicher chiraler α -Hydroxyketone. Da die Substrate und auch die α -Hydroxyketone schwer wasserlöslich sind, erscheint es sinnvoll, die Synthese in einem Zweiphasensystem mit einer organischen Lösungsmittelphase durchzuführen. Durch die Einhüllung der BAL in die Polymermatrix kann das Enzym in einem solchen Zweiphasensystem erfolgreich eingesetzt werden. Auch die Etablierung eines kontinuierlichen Reaktionskonzepts wird durch die Zurückhaltung des Biokatalysators und die Extraktion des Produkts in die Lösungsmittelphase ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die (*R*)-2,2'-Furoinsynthese, katalysiert durch in PVA-Kugeln immobilisierte BAL, in einem kontinuierlich betriebenen Wirbelschichtreaktor untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass eine Optimierung der Synthese durch einen Lösungsmittelwechsel nicht erreicht werden kann, da die Substrataktivierung inaktivierende Effekte der Lösungsmittel vollständig überlagert. Diese Schlussfolgerung wurde durch den Einsatz einer BAL-Variante, die gegen Lösungsmittel wie MTBE eine wesentlich höhere Lagerstabilität zeigt als das native Protein, verifiziert. Auch beim Einsatz der BAL-Variante ergaben sich im Wirbelschichtreaktor weder eine erhöhte Halbwertszeit der BAL noch gesteigerte Umsätze. Somit sind auf diesem Gebiet weitere Optimierungen notwendig bevor es zu einer großtechnischen Produktion kommen kann. Vor allem die Herstellung einer BAL-Variante mit gesteigerter Stabilität gegen die eigenen Substrate erscheint als unerlässlich.

Des Weiteren ist es erstmals gelungen, das sterisch sehr anspruchsvolle α -Hydroxyketon (*R*)-4,4'-Biphenylbenzoin enantiomerenrein durch Kombination einer Palladium-katalysierten Kreuzkupplung mit einer BAL-katalysierten Carboligation in einer Eintopfsynthese zu

produzieren. Dies gelang ohne Zwischenaufreinigung, was die entwickelte Eintopfsynthese im Hinblick auf „green chemistry“ zukunftsweisend macht. Auch hier gibt es jedoch noch ausreichendes Optimierungspotential. Als besonders vielversprechend erscheint die Möglichkeit, die sensitive BAL in PVA/PEG-Kugeln zu immobilisieren und ähnlich wie in der 2,2'-Furoinsynthese ein kontinuierliches Reaktionssystem zu etablieren.

4. Literaturverzeichnis

Adam, W., Fell, R. T., Mock-Knoblauch, C., Saha-Möller, C. R. [1996]. Synthesis of optically active α -hydroxy carbonyl compounds by (salen)Mn(III)-catalyzed oxidation of silyl enol ethers and silyl ketene acetals. *Tetrahedron Letters* **37**: 6531-6534.

Adam, W., Saha-Möller, C. R., Zhao, C.-G. [1998]. Enantioselective oxidation of *vic*-diols to optically active α -hydroxy ketones by a fructose-derived dioxirane. *Tetrahedron Asymmetry* **9**: 4117-4122.

Adam, W., Diaz, M. T., Saha-Möller, C. [1998]. Lipase-catalyzed kinetic resolution of α,β -unsaturated α' -acetoxy ketones. *Tetrahedron Asymmetry* **9**: 791-796.

Adam, W., Fell, R. T., Stegmann, V. R., Saha-Möller, C. R. [1998a]. Synthesis of optically active α -hydroxy carbonyl compounds by the catalytic, enantioselective oxidation of silyl enol ethers and ketene acetals with (salen)manganese(III) complexes. *Journal of the American Chemical Society* **120**: 708-714.

Adam, W., Fell, R. T., Saha-Möller, C. R., Zhao, C.-G. [1998b]. Synthesis of optically active α -hydroxy ketones by enantioselective oxidation of silyl enol ethers with a fructose - derived dioxirane. *Tetrahedron Asymmetry* **9**: 397-401.

Adlercreutz, P. [2000]. Biocatalysis in non-conventional media. *Applied biocatalysis* (2nd edition), Amsterdam: Harwood Academic Press: 295-316.

Adlercreutz, P. [2008]. Fundamentals of biocatalysis in neat organic solvents. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*, Weinheim: VCH-Wiley: 3-24.

Ahn, Y., Ko, S.-B., Kim, M.-J., Park, J. [2008]. Racemization catalysts for the dynamic kinetic resolution of alcohols and amines. *Coordination Chemistry Reviews* **252**: 647-658.

Alamsetti, S. K., Muthupandi, P., Sekar, G. [2009]. Chiral cobalt-catalyzed enantiomer-differentiating oxidation of racemic benzoin by using molecular oxygen as stoichiometric oxidant. *Chemistry - A European Journal* **15**: 5424-5427.

Ansorge-Schumacher, M. B. [2007]. Two-phase systems with solidified water phases – Tools for technical use of sensitive catalysts. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **4**: 243-245.

Ansorge-Schumacher, M. B., Greiner, L., Schroeper, F., Mirtschin, S., Hischer, T. [2006]. Operational concept for the improved synthesis of (*R*)-3,3'-furoin and related hydrophobic compounds with benzaldehyde lyase. *Biotechnology Journal* **1**: 564-568.

Aoyagi, Y., Agata, N., Shibata, N., Horiguchi, M., Williams, R. M. [2000]. Lipase TL-mediated kinetic resolution of benzoin: facile synthesis of (1*R*,2*S*)-erythro-2-amino-1,2-diphenylethanol. *Tetrahedron Letters* **41**: 10159–10162.

Aoyagi, Y., Iijima, A., Williams, R. M. [2001]. Asymmetric synthesis of [2,3-¹³C₂,¹⁵N]-4-Benzyloxy-5,6-diphenyl-2,3,5,6-tetrahydro-4*H*-oxazine-2-one via lipase TL-mediated kinetic resolution of benzoin: General procedure for the synthesis of [2,3-¹³C₂,¹⁵N]-L-Alanine. *The Journal of Organic Chemistry* **66**: 8010–8014.

Ballesteros, A., Bornscheuer, U., Capewell, A., Combes, D., Condoret, J. S., Koenig, K., Kolisis, F. N., Marty, A., Menge, U., Scheper, T., Stamatis, H., Xenakis, A. [1995]. Enzymes in non-conventional phases. *Biocatalysis and Biotransformation* **13**: 1-42.

Baskaran, S., Das, J., Chandrasekaran, S. [1989]. Heterogeneous permanganate oxidations: an improved procedure for the direct conversion of olefins to α -diketones/ α -hydroxy ketones. *The Journal of Organic Chemistry* **54**: 5182-5184.

Batra, R., Gupta, M. N. [1994]. Enhancement of enzyme activity in aqueous - organic solvent mixtures. *Biotechnology Letters* **16**: 1059–1064.

Bel-Rhliid, R., Fauve, A., Veschambre, H. [1989]. Synthesis of the pheromone components of the grape borer *Xylotrechus pyrrhoderus* by microbiological reduction of an α -diketone. *The Journal of Organic Chemistry* **54**: 3221-3223.

Belleville, C., Robert, P., Hoebler, C., Barry, J. L. [1995]. Infrared Spectroscopic Determination of Poly(ethylene glycol) for Nutritional Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**: 2672-2677.

Bieler, N. C., Ansorge-Schumacher, M. B., Greiner, L. [2010]. Automated lab-scale production of PVA/PEG-enzyme immobilisates. *Biotechnology Journal* **5**: 881-885.

Bogar, K., Hoyos, P., Alcantara, A. R., Bäckvall, J.-E. [2007]. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of sterically hindered allylic alcohols under mild conditions: A synthetic route to enantiomerically enriched acyloin acetates. *Organic Letters* **9**: 3401–3404.

- Bogevig, A., Sunden, H., Cordova, A.** [2004]. Direct catalytic enantioselective α -aminoxylation of ketones: a stereoselective synthesis of α -hydroxy and α,α' -dihydroxy ketones. *Angewandte Chemie, International Edition* **43**: 1109-1112.
- Bortolini, O., Casanova, E., Fantin, G., Medici, A., Poli, S., Hanau, S.** [1998]. Kinetic resolution of *vic*-diols by *Bacillus stearothermophilus* diacetyl reductase. *Tetrahedron Asymmetry* **9**: 647-651.
- Breslow, R.** [1958]. Mechanism of thiamine action. IV. Evidence from studies on model systems. *Journal of the American Chemical Society* **80**: 3719-3726.
- Brown, S. P., Brochu, M. P., Sinz, C. J., MacMillan, D. W. C.** [2003]. The direct and enantioselective organocatalytic α -oxidation of aldehydes. *Journal of the American Chemical Society* **125**: 10808-10809.
- Burda, E., Hummel, W., Gröger, H.** [2008]. Modulare chemoenzymatische Eintopfsynthesen im wässrigen Medium: Kombination einer Palladium-katalysierten Kreuzkupplung mit einer asymmetrischen Biotransformation. *Angewandte Chemie* **120**: 9693-9696.
- Buthe, A., Hartmeier, W., Ansorge-Schumacher, M. B.** [2004]. Novel solvent-based method for preparation of alginate beads with improved roundness and predictable size. *Journal of Microencapsulation* **21**: 865-876.
- Cannizzaro, S.** [1853]. Über den der Benzoesäure entsprechenden Alkohol. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **88**: 129-130.
- Carrea, G., Riva, S.** [2000]. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angewandte Chemie, International Edition* **39**: 2226-2254.
- Carvalho, C. M. L., Cabral, J. M. S.** [2000]. Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie* **82**: 1063-1085.
- Curci, R., D'Accolti, L., Dinoi, A., Fusco, C., Rosa, A.** [1996]. Selective oxidation of *O*-isopropylidene derivatives of diols to 2-hydroxy ketones employing dioxiranes. *Tetrahedron Letters* **37**: 115-118.
- Davis, F. A., Chen, B. C.** [1992]. Asymmetric hydroxylation of enolates with *N*-Sulfonyloxaziridines. *Chemical Reviews* **92**: 919-934.

Demir, A. S., Hamamci, H., Tanyeli, C., Akhmedov, I. M., Doganel, F. [1998]. Synthesis and *Rhizopus oryzae* mediated enantioselective hydrolysis of α -acetoxy aryl alkyl ketones. *Tetrahedron Asymmetry* **9**: 1673–1677.

Demir, A. S., Pohl, M. Janzen, E., Müller, M. [2001]. Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatic kinetic resolution via C-C bond cleavage. *Journal of the Chemical Society* **1**: 633-635.

Demir, A. S., Hamamci, H., Sesenoglu, O., Aydogan, F., Capanoglu, D., Neslihanoglu, R. [2001]. Simple chemoenzymatic access to enantiopure pharmacologically interesting (*R*)-2-hydroxypropiophenones. *Tetrahedron Asymmetry* **12**: 1953–1956.

Demir, A. S., Hamamci, H., Sesenoglu, O., Neslihanoglu, R., Asikoglu, B., Capanoglu, D. [2002]. Fungal deracemization of benzoin. *Tetrahedron Letters* **43**: 6447-6449.

Demir, A. S., Sesenoglu, Ö., Eren, E., Hosrik, B., Pohl, M., Janzen, E., Kolter, D., Feldmann, R., Dünkemann, P., Müller M. [2002]. Enantioselective synthesis of α -hydroxy ketones via benzaldehyde lyase-catalyzed C-C bond formation reaction. *Advanced Synthesis & Catalysis* **344**: 96-103.

Demir, A. S., Sesenoglu, Ö., Dünkemann, P., Müller, M. [2003]. Benzaldehyde lyase-catalyzed enantioselective carbonylation of aromatic aldehydes with mono- and dimethoxy acetaldehyde. *Organic Letters* **5**: 2047-2050.

Demir, A. S., Findik, H., Köse, E. [2004]. A new and efficient chemoenzymatic route to both enantiomers of α' -acetoxy- α -methyl and γ -hydroxy- α -methyl cyclic enones. *Tetrahedron Asymmetry* **15**: 777–781.

Demir, A. S., Ayhan, P., Igdır, A. C., Duygu, A. N. [2004]. Enzyme-catalyzed hydroxymethylation of aromatic aldehydes with formaldehyde. Synthesis of hydroxyacetophenones and (*S*)-benzoins. *Tetrahedron* **60**: 6509-6512.

Demir, A. S., Hamamci, H., Ayhan, P., Duygu, A. N., Igdır, A. C., Capanoglu, D. [2004]. Fungi mediated conversion of benzil to benzoin and hydrobenzoin. *Tetrahedron Asymmetry* **15**: 2579-2582.

Demir, A. S., Ayhan, P., Demirtas, U., Erkilic, U. [2008]. *Fusarium roseum* and *Aspergillus oryzae*-mediated enantioselective reduction of benzyls to benzoins. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic* **55**: 164–168.

Dominguez de Maria, P., Pohl, M., Gocke, D., Gröger, H., Trauthwein, H., Stillger, T., Walter, L., Müller, M. [2007]. Asymmetric synthesis of aliphatic 2-hydroxy ketones by enzymatic carbonylation of aldehydes. *European Journal of Organic Chemistry*: 2940–2944.

Dünelmann, P., Kolter-Jung, D., Nitsche, A., Demir, A. S., Siegert, P., Lingen, B., Baumann, M., Pohl, M., Müller, M. [2002]. Development of a donor-acceptor concept for enzymatic cross-coupling reactions of aldehydes: the first asymmetric cross-benzoin condensation. *Journal of the American Chemical Society* **124**: 12084-12085.

Eckstein, M. F., Peters, M., Lembrecht, J., Spiess, A. C., Greiner, L. [2006]. Maximise equilibrium conversion in biphasic catalysed reactions: Mathematical description and practical guideline. *Advanced Synthesis & Catalysis* **348**: 1591-1596.

Eggers, D. K., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M. [1989]. Extractive catalysis - solvent effects on equilibria of enzymatic-reactions in 2-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology* **11**: 84-89.

Enders, D., Kallfass, U. [2002]. Ein effizienter nucleophiler Carben-Katalysator für die asymmetrische Benzoinkondensation. *Angewandte Chemie* **114**: 1822–1824.

Enders, D., Grossmann, A., Fronert, J., Raabe, G. [2010]. *N*-heterocyclic carbene catalysed asymmetric cross-benzoin reactions of heteroaromatic aldehydes with trifluoromethyl ketones. *Journal of the Chemical Society. Chemical Communications* **46**: 6282–6284.

Fernandes, P., Cabral, J. M. [2008]. Biocatalysis in biphasic systems: General. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media, Weinheim: VCH-Wiley*.

Gala, D., DiBenedetto, D. J., Clark, J. E., Murphy, B. L., Schumacher, D. P., Steinman, M. [1996]. Preparations of antifungal Sch 42427/SM 9164: Preparative chromatographic resolution, and total asymmetric synthesis via enzymatic preparation of chiral α -hydroxy arylketones. *Tetrahedron Letters* **37**: 611–614.

Halling, P. J. [1990]. Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: Predictions of effects on equilibrium position. *Biotechnology and Bioengineering* **35**: 691-701.

Halling, P. [2002]. Enzymic conversions in organic and other low-water media. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Weinheim: VCHWiley*.

Hashiyama, T., Morikawa, K., Sharpless, K. B. [1992]. α -Hydroxy ketones in high enantiomeric purity from asymmetric dihydroxylation of enol ethers. *Journal of Organic Chemistry* **57**: 5067–5068.

Hayashi, Y., Yamaguchi, J., Sumiya, T., Shoji, M. [2004]. Direct proline-catalyzed asymmetric α -aminooxylation of ketones. *Angewandte Chemie, International Edition* **43**: 1112–1115.

Hischer, T., Gocke, D., Fernández, M., Hoyos, P., Alcántara, A. R., Sinisterra, J. V., Hartmeier, W., Ansorge-Schumacher, M. B. [2005]. Stereoselective synthesis of novel benzoin catalysed by benzaldehyde lyase in a gel-stabilised two-phase system. *Tetrahedron* **61**: 7378–7383.

Hischer, T., Steinsiek, S., Ansorge-Schumacher, M. B. [2006]. Use of polyvinyl alcohol cryogels for the compartmentation of biocatalysed reactions in non-aqueous media. *Biocatalysis and Biotransformation* **24**: 437–442.

Hoyos, P., Fernandez, M., Sinisterra, J. V., Alcantara, A. R. [2006]. Dynamic kinetic resolution of benzoin by lipase-metal combo catalysis. *The Journal of Organic Chemistry* **71**: 7632–7637.

Hoyos, P., Sansottera, G., Fernandez, M., Molinari, F., Sinisterra, J. V., Alcantara, A. R. [2008]. Enantioselective monoreduction of different 1,2-diaryl-1,2-diketones catalysed by lyophilised whole cells from *Pichia glucozyma*. *Tetrahedron* **64**: 7929–7936.

Hoyos, P., Buthe, A., Ansorge-Schumacher, M. B., Sinisterra, J. V., Alcantara, A. R. [2008]. Highly efficient one pot dynamic kinetic resolution of benzoin with entrapped *Pseudomonas stutzeri* lipase. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic* **52-53**: 133–139.

Hoyos, P., Sinisterra, J.-V., Molinari, F., Alcantara, A. R., Dominguez de Maria, P. [2010]. Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of α -hydroxy ketones. *Accounts of Chemical Research* **43**: 288–299.

Janzen, E. [2002]. Dissertation. Die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* – Biochemische Charakterisierung und die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen. *Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*.

- Janzen, E., Müller, M., Kolter-Jung, D., Kneen, M. M., McLeish, M. J., Pohl, M.** [2006]. Characterization of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*: A versatile enzyme for asymmetric C-C bond formation. *Bioorganic Chemistry* **34**: 345-361.
- Jeon, N. Y., Ko, S. J., Lee, Y. S., Kim, B. T., Won, K., Lee, H.** [2007]. Synthesis of optically pure halogenated phenyl 2-hydroxypropanones by lipase-catalyzed enantioselective transesterification. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic* **48**: 38–41.
- Jäntges, T. I.** [2009]. Dissertation. Charakterisierung und Anwendung eines gelstabilisierten Zweiphasensystems für die asymmetrische Synthese neuartiger Benzoinen mit immobilisierter Benzaldehydlyase. *RWTH Aachen*.
- Kajiro, H., Mitamura, S., Mori, A., Hiyama, T.** [1998]. Enantioselective synthesis of 2-hydroxy-1-indanone, a key precursor of enantiomerically pure 1-amino-2-indanol. *Tetrahedron Asymmetry* **9**: 907–910.
- Kim, P. Y., Pollard, D. J., Woodley, J. M.** [2007]. Substrate supply for effective biocatalysis. *Biotechnology Progress* **23**: 74-82.
- Knight, R. L., Leeper, F. J.** [1997]. Synthesis of and asymmetric induction by chiral bicyclic thiazolium salts. *Tetrahedron Letters* **38**: 3611-3614.
- Knight, R. L., Leeper, F. J.** [1998]. Comparison of chiral thiazolium and triazolium salts as asymmetric catalysts for the benzoin condensation. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chemistry* **12**: 1891-1894.
- Koike, T., Murata, K., Ikariya, T.** [2000]. Stereoselective synthesis of optically active α -hydroxy ketones and anti-1,2-diols via asymmetric transfer hydrogenation of unsymmetrically substituted 1,2-diketones. *Organic Letters* **2**: 3833-3836.
- Konishi, J., Ohta, H., Tsuchihashi, G.-I.** [1985]. Asymmetric reduction of benzil to benzoin catalyzed by the enzyme system of a microorganism. *Chemistry Letters* **8**: 1111-1112.
- Lapworth, A.** [1903]. Reactions involving the addition of hydrogen cyanide to carbon compounds. *Journal of the Chemical Society* **83**: 995-1005.
- Leidig, E., Prüsse, U., Vorlop, K. D., Winter, J.** [1999]. Biotransformation of poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. *Bioprocess Engineering* **21**: 5-12.

- Lozinsky, V. I., Vainerman, E. S., Domotenko, L. V., Mamtsis, A. M., Titova, E. F., Belavtseva, E. M.** [1986]. Study of cryostructurization of polymer systems VII. Structure formation under freezing of poly(vinyl alcohol) aqueous solutions. *Colloid and Polymer Science* **264**: 19-24.
- Lozinsky, V. I., Solodova, E. V., Zubov, A. L., Simenel, I. A.** [1995]. Study of cryostructuration of polymer systems. XI. The formation of PVA cryogels by freezing-thawing the polymer aqueous solution containing additives of some polyols. *Journal of Applied Polymer Science* **58**: 171-177.
- Lozinsky, V. I.** [1998]. Cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol) solutions. *Russian Chemical Reviews* **67**: 573-586.
- Lozinsky, V. I., Plieva, F. M.** [1998]. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme and Microbial Technology* **23**: 227-242.
- Lozinsky, V. I.** [2002]. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. *Russian Chemical Reviews* **71**: 489-511.
- Lozinsky, V. I., Damshkaln, L. G., Kurochkin, I. N., Kurochkin, I. I.** [2008]. Study of cryostructuring of polymer systems: 28. Physicochemical properties and morphology of poly(vinylalcohol) cryogels formed by multiple freezing-thawing. *Colloid Journal* **70**: 189-198.
- Maraite, A., Schmidt, T., Ansorge-Schumacher, M. B., Brzozowski, A. M., Grogan, G.** [2007]. Structure of the ThDP-dependent enzyme benzaldehyde lyase refined to 1.65 Å resolution. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications* **63**: 546-548.
- Marcune, B. F., Karady, S., Reider, P. J., Miller, R. A., Biba, M., Di Michele, L., Reamer, R. A.** [2003]. Asymmetric synthesis of cyclic hydroxy ketones derived from enol ethers via Sharpless asymmetric dihydroxylation. A study in the correlation of the enol ether chain length and enantioselectivity. *Journal of Organic Chemistry* **68**: 8088-8091.
- Martinek, K., Semenov, A. N., Berezin, I. V.** [1981]. Enzymatic synthesis in biphasic aqueousorganic systems. I. Chemical equilibrium shift. *Acta Biochimica et Biophysica* **658**: 76-89.

- Meise, M., Haag, R.** [2008]. A highly active water-soluble cross-coupling catalyst based on dendritic polyglycerol *N*-heterocyclic carbene palladium complexes. *ChemSusChem* **1**: 637-642.
- Metrangolo-Ruiz De Temiño, D., Hartmeier, W., Ansorge-Schumacher, M. B.** [2005]. Entrapment of the alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir* in polyvinyl alcohol for the synthesis of chiral hydrophobic alcohols in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* **36**: 3-9.
- Mikhalev, O. I., Sierpinski, M., Lozinsky, V. I., Kapanin, P. V., Chkheidze, I. I., Al'fimov, M. V.** [1991]. Method for determination of liquid microphase volume: application to the investigation of frozen H₂O-poly(vinyl alcohol) system. *Cryo-Letters* **12**: 197-206.
- Momiyama, N., Yamamoto, H.** [2003]. Catalytic Enantioselective Synthesis of α -Aminoxy and α -Hydroxy Ketone Using Nitrosobenzene. *Journal of the American Chemical Society* **125**: 6038-6039.
- Morikawa, K., Park, J., Andersson, P. G., Hashiyama, T., Sharpless, K. B.** [1993]. Catalytic asymmetric dihydroxylation of tetrasubstituted olefins. *Journal of the American Chemical Society* **115**: 8463-8464.
- Mosbacher, T. G., Müller, M., Schulz, G. E.** [2005]. Structure and mechanism of the ThDP-dependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*. *The FEBS Journal* **272**: 6067-6076.
- Murahashi, S., Saito, T., Hanaoka, H., Murakami, Y., Naota, T., Kumobayashi, H., Akutagawa, S.** [1993]. Ruthenium-catalyzed oxidative transformation of alkenes to α -ketols with peracetic acid. Simple synthesis of cortisone acetate. *Journal of Organic Chemistry* **58**: 2929-2930.
- Muthupandi, P., Alamsetti, S. K., Sekar, G.** [2009]. Chiral iron complex catalyzed enantioselective oxidation of racemic benzoin. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* **22**: 3288-3290.
- Nestl, B. M., Bodlener, A., Stürmer, R., Hauer, B., Kroutil, W., Faber, K.** [2007]. Biocatalytic racemization of synthetically important functionalized α -hydroxy ketones using microbial cells. *Tetrahedron Asymmetry* **18**: 1465-1474.

Nestl, B. M., Voss, C. V., Bodlenner, A., Ellmer-Schaumberger, U., Kroutil, W., Faber, K. [2007]. Biocatalytic racemization of *sec*-alcohols and α -hydroxy ketones using lyophilized microbial cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**: 1001–1008.

Ohta, H., Ikemoto, M., Il, H., Okamoto, Y., Tsuchihaschi, G. [1986]. Preparation of optically active α -acetoxyacylophenones via enzyme mediated hydrolysis. *Chemistry Letters* 1169–1172.

Onomura, O., Arimoto, H., Matsumura, Y., Demizu, Y. [2007]. Asymmetric oxidation of 1,2-diols using *N*-bromosuccinimide in the presence of chiral copper catalyst. *Tetrahedron Letters* **48**: 8668–8672.

Ödman, P., Wessjohann, L. A., Bornscheuer, U. T. [2005]. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of acyloins. *Journal of Organic Chemistry* **70**: 9551–9555.

Plietker, B. [2005]. The RuO₄-catalyzed ketohydroxylation, part II: A regio-, chemo- and stereoselectivity study. *European Journal of Organic Chemistry*: 1919–1929.

Plieva, F. M., Kochetkov, K. A., Singh, I., Parmar, V. S., Belokon, Y. N., Lozinsky, V. I. [2000]. Immobilization of hog pancreas lipase in macroporous poly(vinyl alcohol)-cryogel carrier for the biocatalysis in water-poor media. *Biotechnology Letters* **22**: 551–554.

Pollard, D., Kosjek, B. [2008]. Industrial-scale applications of enzymes in non-aqueous solvents. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media, Weinheim: VCH-Wiley*.

Prüsse, U., Hörold, S., Vorlop, K.-D. [1997]. Verkapselung mikroskopischer Katalysatoren in gelförmigen Polymernetzwerken. *Chemie Ingenieur Technik* **69**: 100-103.

Prüsse, U., Bruske, F., Vorlop, K.-D. [1998]. Improvement of the jet cutting method for the preparation of spherical particles from viscous polymer solutions. *Chemical Engineering & Technology* **21**: 153–157.

Prüsse, U. [2000]. Dissertation. Entwicklung, Charakterisierung und Einsatz von Edelmetallkatalysatoren zur Nitratreduktion mit Wasserstoff und Ameisensäure sowie des Strahlschneider-Verfahrens zur Herstellung Polyvinylalkohol-verkapselter Katalysatoren. *Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft* **214**.

Prüsse, U., Dalluhn, J., Breford, J., Vorlop, K.-D. [2000]. Production of spherical beads by JetCutting. *Chemical Engineering & Technology* **23**: 1105–1110.

Saito, T., Maruyama, R., Ono, S., Yasukawa, N., Kodaira, K., Nishizawa, M., Ito, S., Inoue, M. [2003]. Asymmetric reduction of benzyl to (*S*)-benzoin with whole cells of *Bacillus cereus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **111**: 185–190.

Scheid, G., Ruijter, E., Konarzycka-Bessler, M., Bornscheuer, U. T., Wessjohann, L. A. [2004]. Synthesis and resolution of a key building block for epothilones: a comparison of asymmetric synthesis, chemical and enzymatic resolution. *Tetrahedron Asymmetry* **15**: 2861–2869.

Scheid, G., Kuit, W., Ruijter, E., Orru, R. V., Henke, E., Bornscheuer, U. T., Wessjohann, L. A. [2004]. A new route to protected acylolins and their enzymatic resolution with lipases. *European Journal of Organic Chemistry* 1063–1074.

Schmidt, T. [2008]. Dissertation. Experimentelle Analyse, Modellierung und biochemische Charakterisierung von Ein- und Zweiphasenreaktionen für die technische Biokatalyse. *RWTH Aachen*.

Shanmuganathan, S., Natalia, D., van den Wittenboer, A., Kohlmann, C., Greiner, L., Domínguez de María, P. [2010]. Enzyme-catalyzed C-C bond formation using 2-Methyltetrahydrofuran (2-MTHF) as (co)solvent: Efficient and bio-based alternative to DMSO and MTBE. *Green Chemistry* DOI:10.1039/C0GC00590H.

Sheehan, J. C., Hunneman, D. H. [1966]. Homogeneous asymmetric catalysis. *Journal of the American Chemical Society* **88**: 3666-3667.

Shriver, D. F., Atkins, P. W., Langford, C., H. [1994]. Inorganic Chemistry. *Oxford University press, Oxford, United Kingdom*.

Silva, D. J., Kahne, D., Kraml, C. M. [1994]. Chromomycin A3 as a blueprint for designed metal complexes. *Journal of the American Chemical Society* **116**: 2641–2642.

Spiess, A. C., Eberhard, W., Peters, M., Eckstein, M. F., Greiner, L., Büchs, J. [2008]. Prediction of partition coefficients using COSMO-RS: Solvent screening for maximum conversion in biocatalytic two-phase reaction systems. *Chemical Engineering and Processing* **47**: 1034-1041.

Stillger, T. [2004]. Dissertation. Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen. Charakterisierung und reaktionstechnische Bearbeitung der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I. *Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*.

- Sunden, H., Engqvist, M., Casas, J., Ibrahim, I., Cordova, A.** [2004]. Direct amino acid-catalyzed asymmetric α -oxidation of ketones with molecular oxygen. *Angewandte Chemie, International Edition* **43**: 6532-6535.
- Szczesna, M., Galas, E.** [2001]. *Bacillus subtilis* cells immobilised in PVA-cryogels. *Biomolecular Engineering* **17**: 55-63.
- Takai, T., Yamada, T., Mukaiyama, T.** [1991]. Aerobic oxygenation of olefinic compounds to the corresponding α -hydroxy ketones using an osmium tetroxide-nickel(II) complex catalyst system. *Chemistry Letters* **9**: 1499-502.
- Tanyeli, C., Demir, A. S., Dikici, E.** [1996]. New chiral synthon from the PLE catalyzed enantiomeric separation of 6-acetoxy-3-methylcyclohex-2-en-1-one. *Tetrahedron Asymmetry* **7**: 2399-2402.
- Tanyeli, C., Ozdemirhan, F., Iyigun, C.** [2005]. The first enzymatic resolution of quaternary α' -acetoxy α,β -unsaturated cyclohexenones and cyclopentenones. *Tetrahedron Asymmetry* **16**: 4050-4055.
- Tanyeli, C., Akhmedov, I., Iyigun, C.** [2006]. The first enzymatic resolution of quaternary α -acetoxy α -substituted cyclic ketones. *Tetrahedron Asymmetry* **17**: 1125-1128.
- Toukoniitty, E., Maeki-Arvela, P., Kuzma, M., Villela, A., Neyestanaki, A. K., Salmi, T., Sjoeholm, R., Leino, R., Laine, E., Murzin, D. Y.** [2001]. Enantioselective Hydrogenation of 1-Phenyl-1,2-propanedione. *Journal of Catalysis* **204**: 281-291.
- Van den Wittenboer, A.** [2009]. Dissertation. Stabilitäten der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* und der Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* in wässrig-organischen Zweiphasensystemen. *RWTH Aachen*.
- Van den Wittenboer, A., Niemeijer, B., Kumar Karmee, S., Ansorge-Schumacher, M. B.** [2010]. Systematic assessment of the stability of benzaldehyde lyase in aqueous-organic biphasic systems and its stabilization by modification with methoxy-poly(ethylene) glycol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Doi:10.1016/j.molcatb.2010.08.007.
- Vermue, M. H., Tramper, J.** [1995]. Biocatalysis in Nonconventional Media – Medium Engineering Aspects. *Pure and Applied Chemistry* **67**: 345-373.
- Zaks, A., Klibanov, A. M.** [1988]. The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry* **263**: 8017-8021.

Zhang, Y., Shen, Z., Tang, J., Zhang, Y., Kong, L., Zhang, Y. [2006]. Direct, efficient, and inexpensive formation of α -hydroxyketones from olefins by hydrogen peroxide oxidation catalyzed by the 12-tungstophosphoric acid/cetylpyridinium chloride system. *Organic & Biomolecular Chemistry* **4**: 1478–1482.

Zelinski, T., Kula, M.-R. [1997]. Asymmetric enzymatic reduction of lipophilic ketones in aqueous solution containing cyclodextrin. *Biocatalysis and Biotransformation* **15**: 57–74.

Zelinski, T., Liese, A., Wandrey, C., Kula, M.-R. [1999]. Asymmetric reductions in aqueous media: Enzymatic synthesis in cyclodextrin containing buffer. *Tetrahedron Asymmetry* **10**: 1681–1687.