

**Charakterisierung und Stabilisierung der löslichen Hydrogenase aus
Ralstonia eutropha H16 für den technischen Einsatz bei der reduktiven
Cofaktorregenerierung**

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin
Juliane Ratzka
aus Hennigsdorf

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: Professor Dr. rer. nat. Peter Hildebrandt (TU Berlin)

Berichter: Professor Dr. rer. nat. Marion B. Ansorge-Schumacher (TU Berlin)

Berichter: Professor Dr. rer. nat. Udo Kragl (Universität Rostock)

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.10.2011

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 im Rahmen des Exzellenzclusters „Unifying Concepts in Catalysis“.

Zunächst danke ich Frau Prof. Dr. Marion Ansorge-Schumacher für die Überlassung des interessanten Themas und die stete Diskussionsbereitschaft im Laufe der letzten Jahre. Herrn Prof. Dr. Udo Kragl danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Gutachtens und dem Interesse an meiner Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt dem Arbeitskreis Friedrich/Lenz, insbesondere Lars Lauterbach und Dr. Oliver Lenz, für die anfängliche Unterstützung bei der Zellkultivierung und Proteinaufreinigung sowie für die stete Diskussionsbereitschaft während der Entstehung dieser Arbeit.

Ganz besonders großer Dank gilt Nicole Herr und Jason Theobald, die im Rahmen ihrer Diplom- bzw. Forschungsarbeiten maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Meinen lieben Kollegen, insbesondere Valantina Yazbik und Nora Bieler, danke ich für die immer sehr herzliche Arbeitsatmosphäre, die netten Feierabende sowie die stete Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Astrid Müller-Klauke für ihre Unterstützung bei NMR-Messungen.

Schließlich schulde ich meinen Eltern tiefen Dank für die fortwährende Unterstützung in allen Belangen während meiner gesamten naturwissenschaftlichen Ausbildung. Auch meinen Freunden und meinem Freund kann ich gar nicht genug für die stete moralische Unterstützung in den letzten Jahren danken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, 09. September 2011

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Enzyme in der organischen Synthese	1
1.2 Anforderungen an Enzyme für die technische Anwendung	3
1.3 Strategien zur Enzymstabilisierung für die technische Anwendung	5
1.3.1 Chemische Modifizierung	6
1.3.2 Immobilisierung	8
1.4 Die lösliche Hydrogenase aus <i>Ralstonia eutropha</i> H16	10
1.4.1 Biochemische Eigenschaften	10
1.4.2 Reaktionsspektrum	12
1.4.3 Anwendungsfelder	13
1.5 Reduktive Cofaktorregenerierung	15
1.5.1 Formiatdehydrogenasegekoppelte Cofaktorregenerierung	16
1.5.2 Hydrogenasegekoppelte Cofaktorregenerierung	17
1.6 Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Sonstige Materialien	23
2.1.3 Geräte	24
2.1.4 Medien und Puffer	25
2.2 Bereitstellung der Enzyme	26
2.2.1 Lösliche Hydrogenase aus <i>Ralstonia eutropha</i> H16	26
2.2.2 Carbonylreduktase aus <i>Candida parapsilosis</i>	27
2.3 Proteinmengenbestimmung nach Bradford	28
2.4 SDS-PAGE	28
2.5 Charakterisierung der SH	29
2.5.1 Bestimmung der Enzymaktivität	29

2.5.2	Untersuchung der Enzymaktivität in Abhängigkeit verschiedener isolierter Einflüsse	30
2.5.3	Bestimmung der Enzymstabilität	32
2.5.4	Untersuchung der Enzymstabilität in Abhängigkeit verschiedener isolierter Einflüsse	33
2.5.5	Untersuchung der Enzymaktivität und -stabilität mittels Design of Experiments	34
2.6	Bestimmung der Enzymaktivität der CPCR und FDH.....	36
2.7	Chemische Modifizierung der SH mit Methoxypolyethylenglykol (mPEG).....	37
2.7.1	Aktivierung von Methoxypolyethylenglycol	37
2.7.2	Bestimmung des Aktivierungsgrades von <i>p</i> -Nitrophenyl-mPEG-carbonat durch alkalische Hydrolyse.....	38
2.7.3	Modifizierung des Enzyms.....	38
2.7.4	Charakterisierung des modifizierten Enzyms	38
2.8	Immobilisierung der SH	39
2.8.1	Adsorptive Immobilisierung der SH	39
2.8.2	Kovalente Immobilisierung der SH.....	39
2.8.3	Immobilisierung der chemisch modifizierten SH	40
2.8.4	Bestimmung der Aktivität der Immobilisate.....	40
2.8.5	Bestimmung der Stabilität der Immobilisate.....	41
2.8.6	Bestimmung der Rezyklierbarkeit der Immobilisate	41
2.8.7	Charakterisierung der Immobilisate	41
2.9	Reduktive Cofaktorregenerierung	42
2.9.1	Einsatz der chemisch modifizierten SH	43
2.9.2	Einsatz der immobilisierten SH.....	44
3	Ergebnisse und Diskussion.....	45
3.1	Charakterisierung der Aktivität und Stabilität der SH in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflüssen	45
3.1.1	Abhängigkeit der Aktivität der SH von verschiedenen isolierten Einflüssen ..	45
3.1.2	Abhängigkeit der Stabilität der SH von verschiedenen isolierten Einflüssen..	54

3.1.3	Charakterisierung der Aktivität und Stabilität der SH unter Berücksichtigung der gegenseitigen Beeinflussung von Temperatur und pH-Wert mittels Design of Experiments.....	64
3.1.4	Zusammenfassung.....	73
3.2	Stabilisierung der SH mittels der chemischen Modifizierung mit Methoxypolyethylenglykol (mPEG).....	74
3.2.1	Modifizierung der SH mit verschiedenen aktivierten Methoxypolyethylenglykolen (mPEGs).....	75
3.2.2	Stabilität der modifizierten SH.....	81
3.2.3	Zusammenfassung.....	85
3.3	Stabilisierung der SH durch adsorptive Immobilisierung.....	85
3.3.1	Optimierung des Immobilisierungsverfahrens.....	86
3.3.2	Aktivität der Immobilisate.....	91
3.3.3	Stabilität der Immobilisate.....	93
3.3.4	Rezyklierung der Immobilisate.....	98
3.3.5	Zusammenfassung.....	99
3.4	Stabilisierung der SH durch kovalente Immobilisierung.....	100
3.4.1	Optimierung des Immobilisierungsverfahrens.....	102
3.4.2	Aktivität der Immobilisate.....	108
3.4.3	Stabilität der Immobilisate.....	110
3.4.4	Rezyklierung der Immobilisate.....	114
3.4.5	Zusammenfassung.....	115
3.5	Einsatz der SH bei der reduktiven Cofaktorregenerierung.....	116
3.5.1	Regenerierung von NADH mit nativer SH.....	117
3.5.2	Regenerierung von NADH mit chemisch modifizierter SH.....	119
3.5.3	Regenerierung von NADH mit adsorptiv immobilisierter SH.....	120
3.5.4	Regenerierung von NADH mit kovalent immobilisierter SH.....	122
3.5.5	Zusammenfassung.....	123
4	Zusammenfassung.....	124
5	Literatur.....	128

Liste der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Veröffentlichungen

J. Ratzka, L. Lauterbach, O. Lenz, M. B. Ansorge Schumacher, Systematic evaluation of the dihydrogen-oxidising and NAD⁺-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 as a cofactor regeneration catalyst. *Biocat. Biotrans.* (2011) in Druck.

J. Ratzka, L. Lauterbach, O. Lenz, M. B. Ansorge Schumacher, Stabilisation of the soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 through modification with methoxypoly(ethylene) glycol. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* (2011) akzeptiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Methoden zur Immobilisierung von Enzymen.	9
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung der hexameren SH aus <i>R.eutropha</i> H16 nach Burgdorf <i>et al.</i> 2005a.	11
Abbildung 1.3	Schematischer Aufbau der enzymatischen Brennstoffzelle.	13
Abbildung 1.4	Substratgekoppelte Cofaktorregenerierung.	16
Abbildung 1.5	Reaktionsschema des <i>L-tert</i> -Leucinprozesses.	17
Abbildung 1.6	Hydrogenasegekoppelte Cofaktorregenerierung.	18
Abbildung 2.1	Die dreidimensionale Konfiguration eines Central-Composite-Designs.	35
Abbildung 2.2	Der nach dem Central-Composite-Design erhaltene Versuchsplan für zwei Faktoren (Temperatur, pH) mit der jeweiligen Faktorkombination, bei denen die Enzymaktivität und -stabilität untersucht wurden.	35
Abbildung 3.1	Abhängigkeit der SH-Aktivität von der Temperatur.	46
Abbildung 3.2	Abhängigkeit der SH-Aktivität vom pH-Wert.	46
Abbildung 3.3	Einfluss verschiedener Salze auf die SH-Aktivität.	47
Abbildung 3.4	Einfluss von 10 und 25 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol auf die SH-Aktivität.	48
Abbildung 3.5	Einfluss von MTBE, Toluol und n-Heptan auf die SH-Aktivität.	50
Abbildung 3.6	Einfluss von 2,5, 5 und 10 % (v/v) verschiedener ILs auf die SH-Aktivität.	52
Abbildung 3.7	Einfluss von verschiedenen Additiven auf die SH-Aktivität.	53
Abbildung 3.8	Abhängigkeit der Halbwertszeit der SH von der Temperatur.	55
Abbildung 3.9	Abhängigkeit der Halbwertszeit der SH vom pH-Wert.	56
Abbildung 3.10	Einfluss verschiedener Salze auf die Halbwertszeit der SH.	57
Abbildung 3.11	Einfluss von 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol auf die Halbwertszeit der SH.	58
Abbildung 3.12	Einfluss von MTBE, Toluol und n-Heptan auf die Halbwertszeit der SH. .	59
Abbildung 3.13	Einfluss von 2,5, 5 und 10 % (v/v) verschiedener ILs auf die Halbwertszeit der SH.	61
Abbildung 3.14	Einfluss von verschiedenen Additiven auf die Halbwertszeit der SH.	62
Abbildung 3.15	Einfluss von mechanischer Beanspruchung auf die Halbwertszeit der SH.	64

Abbildung 3.16	Der nach <i>central composite design</i> erhaltene Versuchsplan mit den Messergebnissen für die Aktivität [in U mL ⁻¹] und Halbwertszeit [in h] der SH bei Variation des pH-Wertes [-] und der Temperatur [in °C].	66
Abbildung 3.17	Der mittels DOE erhaltene <i>replicate index</i> für die Aktivität [in U mL ⁻¹] und Halbwertszeit [in h] der SH.	67
Abbildung 3.18	Der mittels DOE erhaltene <i>investigation plot</i> für die Aktivität und Halbwertszeit der SH.	67
Abbildung 3.19	Der mittels DOE erhaltene <i>deleted studentized residuals plot</i> für die Aktivität und Halbwertszeit der SH.	69
Abbildung 3.20	Der mittels DOE erhaltene <i>interaction plot</i> für die Aktivität [in U mL ⁻¹] und Halbwertszeit [in h] der SH in Abhängigkeit vom pH-Wert [-] und der Temperatur [in °C].	69
Abbildung 3.21	Der mittels DOE erhaltene <i>contour plot</i> für die Aktivität [in U mL ⁻¹] (links) und Halbwertszeit [in h] (rechts) der SH in Abhängigkeit vom pH-Wert [-] und der Temperatur [in °C].	70
Abbildung 3.22	Der mittels DOE erhaltene <i>surface plot</i> für die Aktivität [in U mL ⁻¹] (links) und Halbwertszeit [in h] der SH (rechts) in Abhängigkeit vom pH-Wert [-] und der Temperatur [in °C].	71
Abbildung 3.23	Die <i>sweet spot</i> -Analyse für die Aktivität (links) und Halbwertszeit (rechts) der SH in Abhängigkeit vom pH-Wert [-] und der Temperatur [in °C].	72
Abbildung 3.24	Die <i>sweet spot</i> Analyse für die Aktivität und Halbwertszeit der SH in Abhängigkeit vom pH-Wert [-] und der Temperatur [in °C] bei einer geforderten maximalen Enzymaktivität und -stabilität.	72
Abbildung 3.25	Aktivierung von mPEG mit <i>p</i> -Nitrophenylchloroformat.	75
Abbildung 3.26	Modifizierung primärer Aminogruppen mit aktiviertem mPEG.	76
Abbildung 3.27	SDS-Gel der SH nach der Modifizierung mit mPEG ₂₀₀₀ und mPEG ₅₀₀₀ bei einem Enzym-mPEG-Verhältnis von 1:500 und 1:1000.	77
Abbildung 3.28	Aktivität der SH nach der Modifizierung mit mPEG ₂₀₀₀ und mPEG ₅₀₀₀ bei einem Enzym-mPEG-Verhältnis von 1:500 und 1:1000.	78
Abbildung 3.29	Aktivität der modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol und Vergleich mit der nativen SH.	79

Abbildung 3.30	Aktivität der modifizierten SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO ₄] und [MTEOA][MeSO ₄] und Vergleich mit der nativen SH.	80
Abbildung 3.31	Stabilität der modifizierten SH in rein wässrigen Medien unter mechanischer Beanspruchung und ohne und Vergleich mit der nativen SH... ..	82
Abbildung 3.32	Stabilität der modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol und Vergleich mit der nativen SH.....	83
Abbildung 3.33	Stabilität der modifizierten SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO ₄] und [MTEOA][MeSO ₄] und Vergleich mit der nativen SH.	84
Abbildung 3.34	Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf verschiedenen Trägern.	88
Abbildung 3.35	Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei pH 7,0 und 8,0.	89
Abbildung 3.36	Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei verschiedenen Enzym-Träger-Verhältnissen.....	90
Abbildung 3.37	Aktivität der adsorptiv immobilisierten nativen und modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol und Vergleich mit der nativen SH. 92	
Abbildung 3.38	Aktivität der adsorptiv immobilisierten nativen und modifizierten SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO ₄] und [MTEOA][MeSO ₄] und Vergleich mit der nativen SH.....	93
Abbildung 3.39	Stabilität der adsorptiv immobilisierten nativen und modifizierten SH in rein wässrigen Medien unter mechanischer Beanspruchung und ohne und Vergleich mit der nativen SH.....	94
Abbildung 3.40	Stabilität der adsorptiv immobilisierten nativen und modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol und Vergleich mit der nativen SH. 96	
Abbildung 3.41	Stabilität der adsorptiv immobilisierten nativen und modifizierten SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO ₄] und [MTEOA][MeSO ₄] und Vergleich mit der nativen SH.....	97
Abbildung 3.42	Aktivität der adsorptiv immobilisierten nativen [A] und modifizierten [B] SH während der Rezyklierung bei fünf Reaktionsdurchläufen.	99
Abbildung 3.43	Reaktionschema der kovalenten Bindung eines Enzyms an einen festen Träger.....	102

Abbildung 3.44	Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei pH 7,0 und 8,0.	103
Abbildung 3.45	Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei verschiedenen Glutardialdehydkonzentrationen.	104
Abbildung 3.46	Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei verschiedenen Inkubationszeiten des Trägers. ...	105
Abbildung 3.47	Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei verschiedenen Inkubationszeiten des Enzyms....	106
Abbildung 3.48	Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei verschiedenen Enzym-Träger-Verhältnissen.....	107
Abbildung 3.49	Aktivität der kovalent immobilisierten nativen und modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol und Vergleich mit der nativen SH	109
Abbildung 3.50	Aktivität der kovalent immobilisierten nativen und modifizierten SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO ₄] und [MTEOA][MeSO ₄] und Vergleich mit der nativen SH.....	110
Abbildung 3.51	Stabilität der kovalent immobilisierten nativen und modifizierten SH in rein wässrigen Medien unter mechanischer Beanspruchung und ohne und Vergleich mit der nativen SH.....	111
Abbildung 3.52	Stabilität der kovalent immobilisierten nativen und modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol und Vergleich mit der nativen SH	113
Abbildung 3.53	Stabilität der kovalent immobilisierten nativen und modifizierten SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO ₄] und [MTEOA][MeSO ₄] und Vergleich mit der nativen SH.....	114
Abbildung 3.54	Aktivität der kovalent immobilisierten nativen [A] und modifizierten [B] SH während der Rezyklierung bei fünf Reaktionsdurchläufen.....	115
Abbildung 3.55	Reaktionsumsätze von Acetophenon bei variierenden SH- [A] und FDH-Konzentrationen [B].....	117
Abbildung 3.56	TTN [$n_{\text{Produkt}}/n_{\text{Enzym}}$] der SH und FDH nach Beendigung der Reaktion. ...	119
Abbildung 3.57	Reaktionsumsatz von Acetophenon unter Einsatz der chemisch modifizierten SH.....	120

-
- Abbildung 3.58 Reaktionsumsatz von Acetophenon beim Einsatz der adsorptiv immobilisierten SH bei zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen..... 121
- Abbildung 3.59 Reaktionsumsatz von Acetophenon beim Einsatz der kovalent immobilisierten SH bei zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen..... 122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Methoden zur chemischen Modifizierung von Enzymen.	7
Tabelle 1.2	Auswahl der möglichen Wasserstoffakzeptoren der SH und ihre entsprechende Hydrogenaseaktivität.....	12
Tabelle 2.1	Zusammensetzung von FN- und FGN-Medium pro Liter.	25
Tabelle 2.2	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	29
Tabelle 2.3	Zusammensetzung der Reaktionsansätze bei der SH- bzw. FDH- katalysierten Cofaktorregenerierung.....	42
Tabelle 2.4	Gaschromatographische Analyse von Acetophenon und 1-Phenylethanol.	43
Tabelle 3.1	Referenzwerte für die vier Indikatoren des <i>investigation plots</i>	68
Tabelle 3.2	Auswahl verschiedener Träger für die adsorptive Immobilisierung der SH	87
Tabelle 3.3	Parameter für die Optimierung der kovalenten Immobilisierung der SH..	103

Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
[BMIM][BF ₄]	1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat
[BMIM][OTf]	1-Butyl-3-methyl-imidazolium-trifluormethansulfonat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CPCR	<i>Candida parapsilosis</i> Carbonylreduktase
CSTR	<i>continuous stirred- tank reactor</i> (kontinuierlicher Rührtankreaktor)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DOE	<i>design of experiments</i> (statistische Versuchsplanung)
DTT	Dithiothreitol
ee	<i>enantiomeric excess</i> (Enantiomerenüberschuss)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EC	<i>enzyme commission</i> (Enzymkommission)
[EMIM][EtSO ₄]	1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-ethylsulfat
FDH	Formiatdehydrogenase (aus <i>Candida Boidinii</i>)
FGN	Fructose-Glycerin-Nährmedium
FMN	Flavin mononukleotid
FN	Fructose-Nährmedium
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GC	Gaschromatograph/ Gaschromatographie
[HMIM][Cl]	1-Hexyl-3-methyl-imidazolium-chlorid
IL	<i>ionic liquid</i> (ionische Flüssigkeit)
IP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani
Lys	Lysin
logP	Dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten
kDa	Kilodalton
mPEG	Methoxypolyethylenglykol
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
[MTEOA][MeSO ₄]	Tris-(2-hydroxyethyl)-methyl-ammonium-methylsulfat

n/n	Mol pro Mol
NADH/ NAD ⁺	Nikotinamid Adenin-Dinukleotid (reduzierte bzw. oxidierte Form)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
pH	pH-Wert
Q ²	<i>goodness of prediction</i> (Güte der Vorhersagbarkeit)
R ²	<i>goodness of fit</i> (Anpassungsgüte)
<i>R.eutropha</i>	<i>Ralstonia eutropha</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH	<i>soluble hydrogenase</i> (lösliche Hydrogenase) (aus <i>Ralstonia eutropha</i>)
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Trizma [®] Base
TTN	<i>total turnover number</i> (Umsatzzahl)
U	<i>unit</i> (Einheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolet
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse

Formelzeichen

A _v	Volumetrische Aktivität	U mL ⁻¹
c	Molare Konzentration	mM
d	Schichtdicke	cm
ε	Molarer Extinktionskoeffizient	mM ⁻¹ cm ⁻¹
<i>Ext</i>	Extinktion	-
ΔE	Extinktionsdifferenz	-
k	Inaktivierungskonstante	-

n_{Enzym}	Stoffmenge Enzym	mol
n_{Produkt}	Stoffmenge Produkt	mol
t	Zeit	Min bzw. h
$t_{1/2}$	Halbwertszeit	Min bzw. h
V_{E}	Volumen des Enzyms	mL
V_{ges}	Gesamtvolumen	mL

1 Einleitung

1.1 Enzyme in der organischen Synthese

Enzyme sind proteinogene Katalysatoren biologischen Ursprungs, die die Natur im Rahmen evolutiver Prozesse fortwährend weiterentwickelt und optimiert hat. Aus diesem Grund werden sie häufig als Biokatalysatoren bezeichnet. Ihre technische Nutzung umfasst den Einsatz isolierter Enzyme und ganzer Zellen, die sowohl natürliche als auch nicht natürliche Substanzen umsetzen. Ganze Zellen werden insbesondere bei synthetischen Reaktionen, die die Gegenwart von Cofaktoren erfordern, angewandt. Diese häufig sehr teuren Cofaktoren, bei denen es sich um für biokatalytische Prozesse essentielle, nicht-proteinogene Komponenten handelt, lassen sich auf diesem Weg *in vitro* regenerieren. Zudem hat der Einsatz ganzer Zellen den Vorteil, dass die Aufreinigung des Enzyms entfällt. Die Vorteile der Nutzung isolierter Enzyme liegen dagegen in der Vermeidung von Nebenreaktionen durch andere Enzyme sowie in höheren Enzym- und Produktkonzentrationen [Tyler *et al.*, 2006, Bommarius und Riebel, 2004, Faber, 2004, Schmid *et al.*, 2001].

Biokatalysatoren zeichnen sich vor allem durch ihre hohe katalytische Effizienz aus, die es ihnen ermöglicht, eine Reaktionsrate um Faktoren von 10^8 bis 10^{14} zu beschleunigen [Azerad, 1995]. In Folge dessen genügen oft bereits Enzymkonzentrationen zwischen 10^{-3} und 10^{-4} Mol-% im Reaktionsansatz, um hohe Produktausbeuten zu erzielen. Im Vergleich dazu werden chemische Katalysatoren in Konzentrationen zwischen 0,1 bis 1 Mol-% eingesetzt [Faber, 2004].

Eine herausragende Eigenschaft von Enzymen ist ihre Fähigkeit, ein weites Spektrum an Reaktionen zu katalysieren und gleichzeitig eine hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität zu besitzen. Folglich treten Nebenreaktionen wie Isomerisierungen, Racemisierungen und Epimerisierungen selten bis gar nicht auf, was zu einer deutlich höheren Reinheit des Produktes führt und somit dessen Aufreinigung erleichtert. Als Konsequenz bedarf es keinem oder einem verringerten Einsatz der Schutzgruppentechnik, die in der organischen Synthese oft unerlässlich ist [Tyler *et al.*, 2006, Bommarius und Riebel, 2004, Faber, 2004, Schmid *et al.*, 2001].

Enzyme sind unter milden Reaktionsbedingungen, normalerweise in einem Temperaturbereich zwischen 20 und 40 °C, in einem pH-Bereich zwischen 5 und 8 und unter atmosphärischem Druck, aktiv, was zu einer höheren Prozessökonomie aufgrund der verringerten Energieaufwendung führt. Darüber hinaus wirkt sich ihr Einsatz positiv auf die Prozessökologie aus, da Biokatalysatoren vollständig biologisch abbaubar und somit umweltverträglich sind [Tyler *et al.*, 2006, Straathof *et al.*, 2002].

Aufgrund der Vielzahl positiver Eigenschaften von Biokatalysatoren finden diese heutzutage zahlreiche Verwendung im industriellen Sektor. Die Anwendungen umfassen die Katalyse von Reaktionen, wie Synthesen, Umwandlungen oder Abbaureaktionen in der Pharma-, Nahrungsmittel-, Textil-, Papier-, Agrar- und Waschmittelindustrie [Aehle, 2007, Straathof *et al.*, 2002, Liese *et al.*, 2000].

Gegenwärtig existieren etwa 150 etablierte biokatalytische Prozesse, in den meisten Fällen für die Produktion von komplexen Substanzen mit geringen Produktionsvolumina, sogenannten Feinchemikalien [Osterath *et al.*, 2007, Schulze und Wubbolts, 1999]. Diese sind meist chiral und können mit Hilfe von Enzymen mit Enantiomerenüberschüssen (ee) von $\geq 99\%$ synthetisiert werden [Hilterhaus und Liese, 2007]. Zu den industriell bedeutendsten enantiomerenreinen Verbindungen zählen chirale Alkohole, Diole oder Hydroxyketone, die beispielsweise mittels Alkoholdehydrogenasen aus den jeweiligen prochiralen Ketonen hergestellt werden können [Hummel und Kula, 1989]. Die auf diesem Weg gewonnenen Substanzen stellen wichtige Bausteine für die Synthese von pharmazeutischen Wirkstoffen, Düngemitteln und Duftstoffen dar.

Im Bereich der Produktion achiraler Bulkchemikalien können Enzyme, unter anderem aufgrund ihres hohen Preises, selten gegenüber den etablierten chemischen Verfahren bestehen. Eine bedeutende Ausnahme ist die biotechnologische Produktion von Acrylamid. Dabei lassen sich aus der Ausgangssubstanz Acrylnitril mittels der Nitrilhydratase aus *Rhodococcus rhodochrous* mittlerweile jährlich 30 000 Tonnen Acrylamid mit einer 99,9%igen Ausbeute herstellen [Liese *et al.*, 2000].

Die bislang etablierten biokatalytischen Prozesse sowie der Einsatz unkonventioneller Medien zur Erweiterung des Reaktionsspektrums von Enzymen und somit derer Anwendungsbereiche verdeutlichen das gegenwärtige und zukünftige Potential der Enzymkatalyse. Weiterhin tragen Fortschritte im Bereich der Molekularbiologie und das wachsende Wissen im Bereich der Strukturaufklärung von Proteinen zur weiteren Optimierung von Enzymen und somit zur weiteren Erschließung neuer Anwendungsfelder bei.

1.2 Anforderungen an Enzyme für die technische Anwendung

Obwohl die Anzahl etablierter biokatalytischer Reaktionen in der Industrie stetig zunimmt existieren noch immer zahlreiche Barrieren, die den technischen Einsatz von Enzymen limitieren. Dazu zählt unter anderem, dass es einer hohen Effizienz des Biokatalysators bedarf, dieser jedoch gleichzeitig preiswert und in ausreichenden Mengen verfügbar sein sollte. Zudem erfordert der industrielle Einsatz von Enzymen eine hohe Aktivität und Stabilität des Biokatalysators bei hohen Temperaturen, extremen pH-Bedingungen, hohen Salzkonzentrationen, unter mechanischer Beanspruchung sowie in Gegenwart unkonventioneller Lösungsmittel [Iyer und Ananthanarayan, 2008, Bommarius und Riebel, 2004, Faber, 2004, Illanes, 1999].

Die genannten Anforderungen stellen in vielen Fällen noch immer Grenzen für die technische Nutzung von Biokatalysatoren dar. So lassen sich zahlreiche Enzyme nur sehr aufwendig und durch eine Vielzahl an Aufreinigungsschritten bereitstellen. In der Folge entstehen hohe Kosten für die Isolierung eines Enzyms, was wiederum zu hohen Preisen von Biokatalysatoren führt [Faber, 2004].

Bei zahlreichen Reaktionen bedarf es Bedingungen, die außerhalb des Aktivitäts- und Stabilitätsoptimums von Enzymen liegen. Dazu zählen extreme pH-Werte und hohe Temperaturen, die zu höheren Reaktionsraten sowie einer besseren Löslichkeit zahlreicher Reaktanden führen [Iyer und Ananthanarayan, 2008]. In der Folge kommt es in vielen Fällen zu einer Inaktivierung der Enzyme aufgrund der Entfaltung ihrer Tertiärstruktur unter den genannten Bedingungen, was eine weitere Begrenzung der technischen Umsetzung biokatalysierter Reaktionen darstellt.

Der Einsatz hoher Salzkonzentrationen in Gegenwart von Enzymen spielt insbesondere in der Lebensmittelindustrie eine bedeutende Rolle. Mit Ausnahme halophiler Enzyme zeigen zahlreiche Biokatalysatoren unter solchen Bedingungen eine ausgeprägte Instabilität aufgrund der starken Wechselwirkung der Salzionen mit schwachen ionischen Bindungen des Proteins, was wiederum den technischen Einsatz von Proteinen beschränkt [Iyer und Ananthanarayan, 2008].

Für die industrielle Anwendung von Enzymen ist deren mechanische Stabilität von großer Bedeutung, da unter Prozessbedingungen oft Scherkräfte zur Durchmischung der Reaktionslösung auf das Enzym einwirken, beispielsweise in einem kontinuierlichen Rührtankreaktor (CSTR). Aus der mechanischen Beanspruchung des Biokatalysators resultiert oft dessen Inaktivierung, was eine weitere Einschränkung der industriellen Nutzung von Enzymen darstellt.

Der Einsatz unkonventioneller Lösungsmitteln bei biokatalysierten Reaktionen ist infolge der begrenzten Löslichkeit vieler Substrate in rein wässrigen Medien oftmals unerlässlich. Zudem lassen sich unerwünschte wasserabhängige Nebenreaktionen unterdrücken, mikrobielle Verunreinigungen können eliminiert werden und die Produktisolierung wird aufgrund niedriger Siedepunkte und hoher Dampfdrücke vereinfacht [Carrea und Riva, 2000, Natarajan, 1991]. Die Nutzung unkonventioneller Medien umfasst unter anderem die Verwendung wasserlöslicher und -unlöslicher organischer Lösungsmittel, sowie ionischer Flüssigkeiten (ILs) [Castro und Knubovets, 2003, Carrea und Riva, 2000]. Der Einsatz von Enzymen in diesen Medien stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar, da die Proteinstabilität in Gegenwart der genannten Medien oft drastisch reduziert wird und es zu einer Inaktivierung des Enzyms kommt [Iyer und Ananthanarayan, 2008, Schiffer und Dötsch, 1996, Halling, 1990, Hahn-Hägerdal, 1986]. Dabei wird zwischen einer molekularen Toxizität und einer Grenzflächentoxizität ausgehend vom Medium unterschieden [Carrea und Riva, 2008]. Die molekulare Toxizität tritt in einem Einphasensystem auf, in dem die in der wässrigen Phase gelösten Lösungsmittelmoleküle toxisch auf das Protein wirken. Dabei erfolgt die Dehydratisierung des Enzyms, bei der Wassermoleküle an der Proteinoberfläche gegen Lösungsmittelmoleküle ausgetauscht werden, was zu einer Änderung der dreidimensionalen Proteinstruktur führt. Dadaurch kommt es zur Inaktivierung des Enzyms [Iyer und Ananthanarayan,

2008]. Zusätzlich hängt dieser Effekt von der Polarität des Lösungsmittels ab, wobei im Allgemeinen gilt: Je polarer das Lösungsmittel ist, desto größer ist sein Einfluss auf den Biokatalysator [Iyer und Ananthanarayan, 2008, Laane, *et al.* 1987]. Dieses Prinzip besitzt jedoch keine Allgemeingültigkeit und ist somit nicht auf alle Reaktionssysteme übertragbar. Im Fall der Grenzflächentoxizität, die neben der molekularen Toxizität in Zweiphasensystemen stattfindet, tritt das Enzym an der Phasengrenzfläche mit den Lösungsmittelmolekülen in Kontakt und wird in Folge dessen inaktiviert.

Aufgrund der genannten Limitierungen besteht für die industrielle Nutzung eines Biokatalysators der Anspruch, ihn so zu optimieren, dass er unter den beschriebenen technischen Anforderungen bestehen kann.

1.3 Strategien zur Enzymstabilisierung für die technische Anwendung

Zur Erhöhung der Stabilität von Enzymen für deren technische Nutzung existieren gegenwärtig verschiedene Strategien. Bei dem sogenannten *medium engineering* werden dem Enzym Additive wie Salze, Kryoprotektantien, Polyole, Zucker, Antioxidantien, Polyethylenglykole (PEG) und andere synthetische Polymere zugesetzt [Iyer und Ananthanarayan, 2008, Fágáin, 1995, Schmid, 1979]. Diese Methode beinhaltet zusätzlich die Veränderung des Reaktionsmediums durch den Zusatz von Cosolventien wie organische Lösungsmittel oder ionische Flüssigkeiten [Fágáin, 1995, Vermue und Tramper, 1995]. Darüber hinaus existieren Strategien, die auf Basis der DNA- sowie auf der Proteinebene eine Erhöhung der Enzymstabilität bewirken können. Ausgehend von der genetischen Ebene wird zwischen zwei Ansätzen unterschieden: dem rationalen Design und der gerichteten Evolution [Dalby, 2007]. Beim rationalen Design erfolgt die selektive Veränderung der Primärstruktur des Proteins [Eijsink *et al.*, 2004]. Hierbei bedarf es jedoch einer intensiven Kenntnis von Struktur-Funktionsbeziehung des Enzyms. Im Unterschied dazu werden bei der gerichteten Evolution Veränderungen auf Basis einer zufallsbasierten Mutation hervorgerufen [Rubin-Pitel und Zhao, 2006, Bornscheuer und Pohl, 2001]. Weiterhin gelten die kovalente chemische Modifizierung von Aminosäureresten des Proteins und die Immobilisierung des Enzyms durch Bindung an verschiedenen Trägermaterialien als vielversprechende Methoden, um die Stabilität von Biokatalysatoren zu erhöhen [Brady und Jordaan, 2009, Hartmann und Jung, 2009, Sheldon,

2007, Davis, 2003, DeSantis und Jones, 1999, Roig und Kennedy, 1992]. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Methoden näher vorgestellt.

1.3.1 Chemische Modifizierung

Die chemische Modifizierung von Biokatalysatoren ist eine der ältesten Methoden zur gezielten Veränderung der Proteineigenschaften infolge der kovalenten Bindung verschiedener Reagenzien an bestimmte funktionelle Gruppen der Aminosäureseitenketten des Enzyms. Prinzipiell stehen dazu alle Aminosäurereste zur Verfügung, wobei jedoch meist nur die polaren Aminosäuren eine ausreichende Reaktivität besitzen, was auf deren ionisierbare Seitenketten zurückzuführen ist. Die jeweils unprotonierten Spezies können als potente Nukleophile in verschiedenen Additionsreaktionen agieren.

Ursprünglich diente die Modifizierung von Enzymen der Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen [Means und Feeney, 1990]. Gegenwärtig wird sie hingegen bevorzugt zur Erhöhung der Enzymstabilität und -löslichkeit eingesetzt [DeSantis und Jones, 1999]. Dabei ist die Auswahl der zur Verfügung stehenden Methoden und modifizierenden Reagenzien weitreichend. Hinsichtlich der Modifizierungsmethoden wird zwischen mono-, bi- und multifunktionalen Reagenzien unterschieden. Bi- und multifunktionale Reagenzien führen zur intra- und intermolekularen Quervernetzung des Proteins, woraus die Bildung fester Enzymaggregate resultiert. Aus diesem Grund wird die Quervernetzung von Proteinen auch häufig der Immobilisierung zugeordnet. Monofunktionale Reagenzien dagegen besitzen nur eine reaktive Gruppe, die unter definierten Bedingungen mit bestimmten Aminosäureresten reagiert. Dem entsprechend lassen sich monofunktionale Reagenzien nur nach dem Aminosäurerest, mit dem sie spezifisch reagieren, oder nach der Art der durchgeführten Reaktion unterteilen. Eine Auswahl der zur Verfügung stehenden Methoden zur chemischen Modifizierung von Enzymen ist in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Tabelle 1.1 Methoden zur chemischen Modifizierung von Enzymen.

Funktionalität (Aminosäureseitenkette)	Reaktion	Reagenzien
Aminogruppe (α -, ϵ -Lys)	Amidierung	Imidoeste
	Acetylierung	Anhydride
	Reduktive Aminierung	NaBH ₄ , NaBH ₃ CN
	Sulfonierung	Trinitrobenzolsulfonat
	Cabamatbildung	Carbonate
Carboxylgruppe (Asp, Glu)	Urethanbildung	Carbodiimide
Guanidingruppe (Arg)	Alkylierung	Dicarbonyl-Derivate
Imidazolgruppe (His)	Alkylierung	Anhydride
Indolgruppe (Trp)	Oxidation	N-Bromsuccinimid
Phenolgruppe (Tyr)	Nitrierung	Tetranitromethan
Thiolgruppe (Cys)	Alkylierung	Halogenacetate
	Oxidation	Dithiobis(2-nitrobenzolsäure)
Thioethergruppe (Met)	Oxidation	Radikalbildner (z.B. H ₂ O ₂)

Ein Nachteil der chemischen Modifizierung von Enzymen ist die geringe Selektivität, mit der die entsprechenden Reagenzien an die verfügbaren Aminosäurereste binden. In Folge dessen kann das Modifizierungsreagenz neben der gewünschten auch an andere funktionelle Gruppen kovalent binden. Eine Möglichkeit auf die Reaktivität der Aminosäurereste Einfluss zu nehmen, ist die Veränderung des pH-Wertes während der Modifizierung, da eine Abhängigkeit zwischen der Reaktivität der funktionellen Gruppen und deren Protonierungsgrad besteht. Weitere Einflussparameter sind die Konzentration des Modifizierungsreagenzes sowie die Reaktionsdauer. Trotz dieser Möglichkeiten lassen sich häufig nur heterogene Enzymlösungen gewinnen, die wenig reproduzierbar sind [Means und Feeney, 1990].

Dennoch erfolgte die Etablierung der chemischen Modifizierung von Enzymen, um deren Eigenschaften gezielt zu verändern. Dazu zählt unter anderem die Erhöhung der Löslichkeit und Stabilität von Enzymen, beispielsweise durch eine Reaktion mit verschiedenen Anhydriden [Sangeetha und Abraham, 2006, Khajeh, *et al.*, 2001, Vinogradov *et al.*, 2001],

Aldehyden [Vinogradov *et al.*, 2001], Imidoestern [Ryan *et al.*, 1994, Basri *et al.*, 1992] oder aktivierten Polymeren [Vandertol-Vanier *et al.*, 2002, Hernáiz *et al.*, 1999, Kazan *et al.*, 1997]. Ein häufig eingesetztes Polymer ist Polyethylenglycol (PEG). Die kovalente Bindung von PEG an zugängliche Lysinreste an der Proteinoberfläche kann zu einer Erhöhung der Temperaturstabilität von Enzymen führen [Garcia-Arellano *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 1996, Gaertner und Puigserver, 1992] sowie zu einer Stabilisierung gegenüber inaktivierenden Einflüssen wie organischen Lösungsmitteln beitragen [Van den Wittenboer *et al.*, 2010, Szabo *et al.*, 2009, Salleh *et al.*, 2002, Vinogradov *et al.*, 2001].

1.3.2 Immobilisierung

Bei der Immobilisierung von Enzymen werden diese per Definition durch chemische oder physikalische Methoden in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt, wobei ihre katalytischen Fähigkeiten erhalten bleiben [Hartmeier, 1986]. Das bedeutet, dass ein immobilisierter Biokatalysator zum einen ausreichend katalytisch aktiv sein muss und zum anderen nicht mehr in Lösung gehen darf, woraus die Möglichkeit für eine vereinfachte Abtrennung des Enzyms aus der Produktlösung resultiert [Cao, 2005].

Durch die Immobilisierung von Enzymen ergibt sich für deren technische Anwendungen eine Reihe von Vorteilen. So wird der Biokatalysator zum einen in eine handhabbarere Form überführt und folglich eine einfache Rezyklierbarkeit des Enzyms sowie eine kontinuierliche Prozessführung ermöglicht. Zum anderen besitzen immobilisierte Enzyme hohe Katalysatordichten. Aufgrund dessen lassen sich die katalysierten Reaktionen wesentlich ökonomischer gestalten, was für industrielle Anwendungen von großer Bedeutung ist [Sheldon, 2007]. Darüber hinaus weisen immobilisierte Enzyme oft auch verbesserte Eigenschaften auf. Dazu zählen erhöhte Enzymaktivitäten [Mateo *et al.*, 2007, Goto *et al.*, 2005, Hsu *et al.*, 2000, Bastida *et al.*, 1998] und sehr häufig verbesserte Stabilitäten, insbesondere unter denaturierenden Bedingungen [Bolivar *et al.*, 2009, Mateo *et al.*, 2007, Mateo *et al.*, 2002, Fernandez-Lafuente *et al.*, 2000]. Dabei kann das Enzym beispielsweise gegenüber hohen Temperaturen oder auch organischen Lösungsmitteln stabilisiert werden [Goto *et al.*, 2005, Abian *et al.*, 2002, Klibanov, 1979]. Ferner kann die Immobilisierung eines Enzyms auch einen Einfluss auf dessen Selektivität ausüben. In diesem Zusammenhang lässt sich diese sowohl verändern [Cabrera *et al.*, 2009, Palomo 2008, Palomo *et al.*, 2002, Aoun und Baboulene 1998] als auch

erhöhen [Mateo *et al.*, 2007, Suh *et al.*, 2003, McIninch und Kantrowitz, 2001, Rotticci *et al.*, 2000].

Es existieren fünf grundsätzliche Methoden Enzyme zu immobilisieren. Dabei wird zwischen der Immobilisierung des Enzyms infolge der Ausbildung einer Bindung untereinander oder mit einem Träger und der Immobilisierung eines Biokatalysators durch dessen Einhüllung in polymere Matrices sowie seine Verkapselung in Membranen unterschieden, wie in Abbildung 1.1 dargestellt ist.

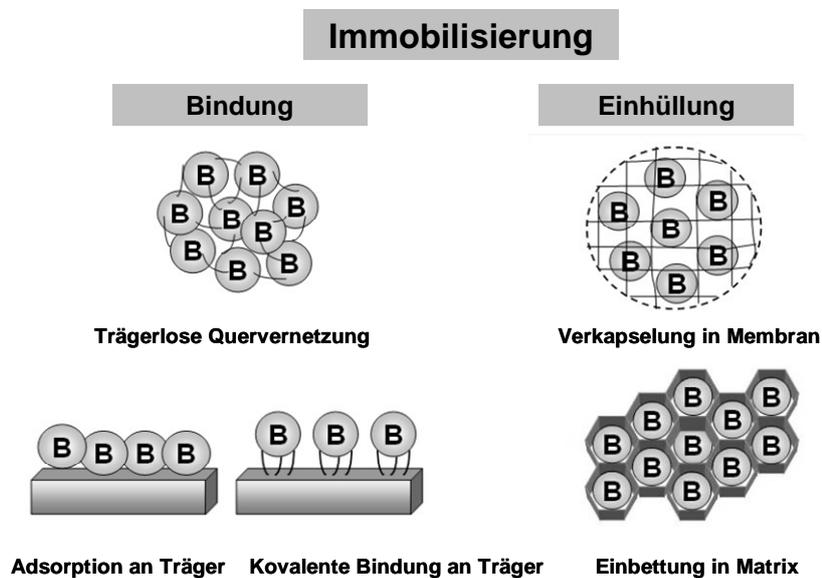


Abbildung 1.1 Methoden zur Immobilisierung von Enzymen.

Bei der Bindung an einen Träger kommen sehr viele anorganische und organische Stoffe sowie synthetische Polymere in Betracht, wobei zwischen der adsorptiven und kovalenten Bindung unterschieden wird. Die Adsorption ist die einfachste und älteste Methode, bei der die Biokatalysatoren über hydrophobe, polare und elektrostatische Wechselwirkungen an der Oberfläche des Trägers wie beispielsweise Holzschnitzel, Cellulose oder Silicate gebunden werden. Diese Methode zeichnet sich durch ihre einfache Ausführbarkeit und den geringen Einfluss auf die Konformation des Biokatalysators aus. Ihr Nachteil besteht jedoch in der Freisetzung des Biokatalysators während des Prozesses aufgrund der geringen Bindungsstärke [Cao, 2005, Faber, 2004, Hartmeier, 1986]. Im Gegensatz dazu tritt dieses Problem bei der kovalenten Bindung des Enzyms an einem Träger nicht auf, da der Biokatalysator über die funktionellen Gruppen seiner Aminosäuren kovalent gebunden ist, was zu einem stabileren

Biokatalysator-Träger-Komplex führt. Der wesentliche Nachteil dieser Methode liegt dagegen in der bestehenden Möglichkeit, essentielle Aminosäurereste innerhalb oder in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms in diese Bindung zu involvieren, woraus ein drastischer Verlust der katalytischen Aktivität resultiert [Hartmeier, 1986]. Bei der Quervernetzung (*cross-linking*) werden die einzelnen Biokatalysatoren durch bi- oder mehrfunktionelle Reagenzien wie z.B. Glutardialdehyd und Hexamethyldiisothiocyanate miteinander verbunden, was die Bildung von sehr hochmolekularen unlöslichen Aggregaten zur Folge hat. Ein Nachteil dieser Aggregate ist ihre meist gelatinöse Beschaffenheit, die ihren Einsatz in technischen Prozessen erschwert. Weiterhin kann es bei der Quervernetzung von Enzymen zu einer Blockierung derer aktiven Zentren innerhalb der entstehenden hochmolekularen Aggregate kommen, was mit Aktivitätsverlusten einhergeht.

1.4 Die lösliche Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16

Ralstonia eutropha H16 ist ein gramnegatives lithoautotrophes Knallgasbakterium, das zur β -Subklasse der Proteobakterien zählt [Pohlmann *et al.*, 2007]. Dieser Organismus verfügt über drei aktive Hydrogenasen: eine membrangebundene, eine regulative und eine lösliche [Burgdorf *et al.* 2005a, Löscher *et al.*, 2005]. Letztere ist dabei in der Lage, neben der reversiblen Spaltung von molekularem Wasserstoff in Protonen und Elektronen gleichzeitig die Reduktion von Elektronenakzeptoren wie Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) zu katalysieren [Schneider und Schlegel, 1976].

1.4.1 Biochemische Eigenschaften

Die lösliche Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16 (SH, EC 1.12.1.2) zählt wie alle Hydrogenasen zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen. Aufgrund ihres heterodinuklearen Ni-Fe-aktiven Zentrums ist sie innerhalb der Hydrogenasen der Subklasse der [NiFe]-Hydrogenasen zuzuordnen [Burgdorf *et al.*, 2005a]. Bei der SH handelt es sich um ein heterohexameren Proteinkomplex mit einer Molekularmasse von 208,2 kDa, der sich im Gegensatz zu einer Vielzahl von Standardhydrogenasen durch seine Toleranz gegenüber Sauerstoff auszeichnet und folglich eine aerobe Reaktionsführung erlaubt [Burgdorf *et al.*, 2005a, Van der Linden *et al.*, 2004a, Lenz *et al.*, 2002, Schneider und Schlegel, 1981]. Des Weiteren besitzt die SH eine nur geringe Sensitivität gegenüber Kohlenstoffmonoxid [Van der Linden *et al.*, 2004b].

Mittels Kristallographie ist es bereits gelungen detaillierte Informationen zur atomaren Struktur von einigen Standardhydrogenasen aus der [NiFe]-Subklasse zu erlangen [Frey, 2002], wohingegen die Kristallisation der sauerstofftoleranten Enzyme bislang noch nicht erreicht werden konnte. Zur Aufklärung von Proteinstruktur-Funktionsbeziehungen der SH wurde sich bis heute molekularbiologischer und spektroskopischer Techniken bedient, mit deren Hilfe eine schematische Vorstellung der Struktur entwickelt werden konnte [Löscher *et al.*, 2005, Burgdorf *et al.*, 2005a, Burgdorf *et al.*, 2005c]. Abbildung 1.2 zeigt diesen strukturellen Aufbau der SH.

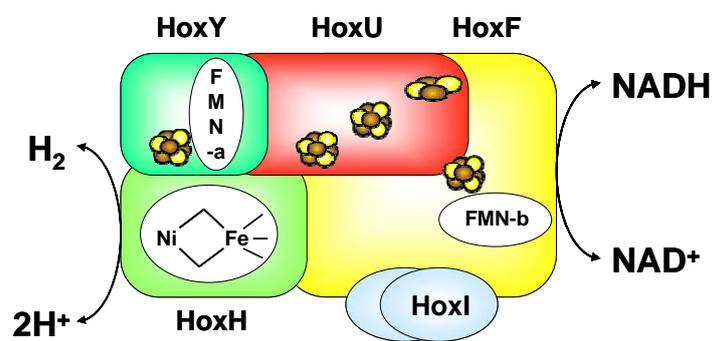


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der hexameren SH aus *R. eutropha* H16 nach Burgdorf *et al.* 2005a. [mit freundlicher Genehmigung von S. Karger AG Basel]

Die SH besteht aus zwei funktional unterschiedlichen heterodimeren Komplexen, wobei es sich um ein Hydrogenasemodul und ein NADH-dehydrogenase bzw. -diaphorasemodul handelt. Diese beiden Komplexe konnten bereits getrennt voneinander isoliert und charakterisiert werden [Lauterbach *et al.*, 2011, Horch *et al.*, 2010, Burgdorf *et al.*, 2005b, Burgdorf *et al.*, 2005c, Löscher *et al.*, 2005, Van der Linden *et al.* 2004a, Van der Linden *et al.* 2004b, Massanz *et al.* 1998, Schneider *et al.*, 1979, Schneider & Schlegel, 1978]. Demnach besitzt die SH ein [2Fe-2S]-Cluster, mindestens 3 [4Fe-4S]-Cluster und zwei nicht kovalent gebundene Flavinmononukleotidgruppen (FMN). Das Hydrogenasemodul, kodiert durch die Gene HoxH (55 kDa) und HoxY (23 kDa), beherbergt unter anderem das Ni-Fe-aktive Zentrum sowie eine der beiden FMN-Gruppen (FMN-a) und ist für die Hydrogenaseaktivität verantwortlich. Das Diaphorasemodul, kodiert durch die Gene HoxF (67 kDa) und HoxU (26 kDa), reguliert hingegen die Bindung und Umsetzung von NAD(H) und stellt die zweite FMN-Gruppe (FMN-b) sowie mehrere [Fe-S]-Cluster bereit.

Die wasserstoffabhängige Reduktion von NAD^+ erfordert das tetramere Konstrukt der SH (HoxHYUF). Die infolge der Wasserstoffspaltung bereitgestellten Elektronen werden dabei von der Ni-Fe-Seite über FMN-a, die [4Fe-4S]-Cluster und den [2Fe-2S]-Cluster bis hin zum FMN-b und schlussendlich auf NAD^+ übertragen. Die zwei zusätzlichen Untereinheiten, die vom HoxI-Gen (je 18,6 kDa) kodiert sind, wurden in dem höhergewichtigen hexameren Komplex entdeckt, wobei deren Funktion bislang noch nicht eindeutig geklärt ist [Burgdorf *et al.*, 2005b].

1.4.2 Reaktionsspektrum

Die SH katalysiert wie alle Hydrogenasen die Spaltung von molekularem Wasserstoff in Elektronen und Protonen. Zudem setzt sie aufgrund ihrer Bidirektionalität Elektronenakzeptoren wie NAD^+ um. Neben ihrer Spezifität gegenüber NAD^+ ist die SH ebenso in der Lage, ein breites Spektrum weiterer Wasserstoffakzeptoren vollständig zu reduzieren [Schneider und Schlegel, 1976]. Einige dieser möglichen Wasserstoffakzeptoren und die entsprechende Hydrogenaseaktivität der SH sind in Tabelle 1.2 aufgelistet.

Tabelle 1.2 Auswahl der möglichen Wasserstoffakzeptoren der SH und ihre entsprechende Hydrogenaseaktivität.

Wasserstoffakzeptor	Aktivität [%]
NAD	100
Methylviologen	70
Benzylviologen	34
Menaquinon	307
Ubiquinon	85
Methylenblau	125
Phenazinmethosulfat	354
Diazingrün	108
Ferricyanid	503
FMN	85

Die SH kann demnach neben NAD Elektronenakzeptoren wie Methylviologen, Menaquinon, Methylenblau bis hin zu Ferricyanid umsetzen. Dabei zeigt sie verglichen mit NAD⁺ 3-, 3,5- und 5-fach höhere Reaktionsraten bei der Reduktion von Menaquinon, Phenazinmethosulfat bzw. Ferricyanid. Des Weiteren setzt sie Methylviologen, Benzylviologen oder Ubiquinon vollständig um, jedoch mit verminderten Hydrogenaseaktivitäten im Vergleich zu NAD⁺.

1.4.3 Anwendungsfelder

Für den technischen Einsatz der SH sind insbesondere ihre Hydrogenaseaktivität sowie ihre Fähigkeit, NAD⁺ zu reduzieren von Bedeutung. In diesem Zusammenhang besteht einerseits ein großes Interesse an der Verwendung der SH in einer enzymatischen Brennstoffzelle sowie an ihrem Einsatz für eine lichtgetriebene Wasserstoffproduktion. Andererseits kann sie ebenfalls Anwendung bei der Regenerierung des Cofaktors NADH finden, welcher in einer Vielzahl enzymkatalysierter Reduktionen umgesetzt bzw. verbraucht wird.

Die Verwendung der SH in einer Brennstoffzelle beruht auf ihrer Fähigkeit, Wasserstoff in Elektronen und Protonen zu zerlegen und auf diese Weise aus Wasserstoff und Sauerstoff elektrischen Strom und Wasser zu produzieren, wie in Abbildung 1.3 in Anlehnung an Ludwig *et al.*, 2008 dargestellt ist [Ludwig *et al.*, 2008, Cracknell *et al.*, 2008, Vincent *et al.*, 2006, Vincent *et al.*, 2005a].

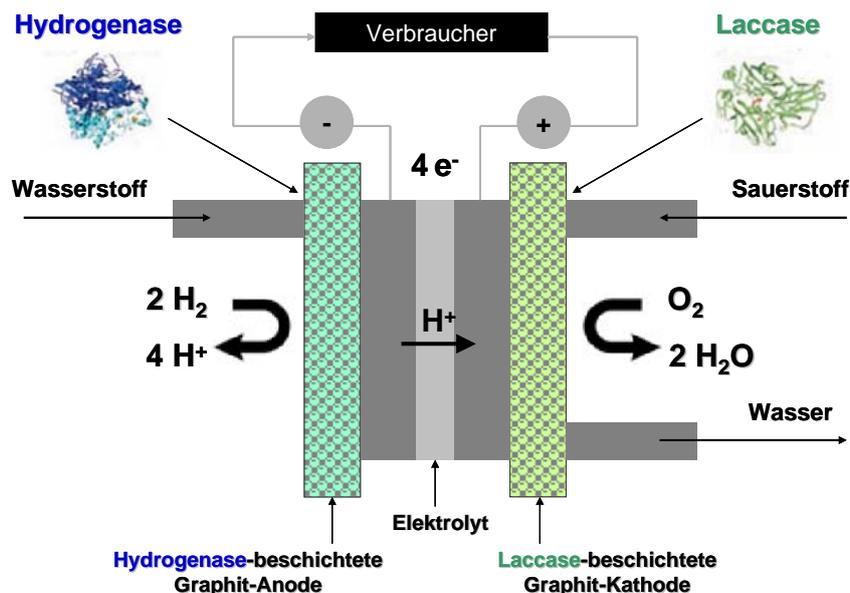


Abbildung 1.3 Schematischer Aufbau der enzymatischen Brennstoffzelle.

Wie konventionelle Brennstoffzellen besteht die enzymatische Brennstoffzelle aus zwei Elektroden, wobei diese nicht aus Platin sondern aus enzymbeschichtetem Graphit bestehen. Die Graphit-Anode ist dabei mit einer Hydrogenase beschichtet, die Kathode hingegen mit einer Sauerstoff-Reduktase, einer Laccase. Werden nun die entsprechenden Substrate, Wasserstoff und Sauerstoff, hinzugefügt lässt sich ein kontinuierlicher Strom erzeugen [Ludwig *et al.*, 2008, Vincent *et al.*, 2005b]. Im Vergleich zu konventionellen, Platin-basierten Brennstoffzellen besitzt die biologische unter anderem den Vorteil, dass es aufgrund der hohen Spezifität der Enzyme sowie der Sauerstofftoleranz der Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha* H16 keiner Trennung der Elektroden durch eine Protonen-Austausch-Membran bedarf. Zudem zeichnen sich die Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha* H16 durch ihre geringe Sensitivität gegenüber Kohlenstoffmonoxid aus, welches in ungereinigtem, aus fossilen Rohstoffen gewonnenem Wasserstoffgas in Spuren vorhanden ist und Platin-basierte Katalysatoren vergiftet. Das enzymatische System wird dagegen davon folglich nicht beeinträchtigt [Ludwig *et al.*, 2008, Cracknell *et al.*, 2008, Vincent *et al.*, 2006, Vincent *et al.*, 2005a, Vincent *et al.*, 2005b].

Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha* H16 zur Produktion von reinem Wasserstoff aus Licht und Wasser eignen. Dabei besteht das Ziel ein solches System in robusten Cyanobakterien zu etablieren, wodurch die Wasserstoffgewinnung bei gleichzeitiger Sauerstofffreisetzung angestrebt wird [Ludwig *et al.*, 2008].

Unter Voraussetzung der Gewinnung von Wasserstoff aus der oxygenen Photosynthese und der Erzeugung elektrischen Stroms aus diesem mittels der enzymatischen Brennstoffzelle ließe sich ein Kreislauf schließen, bei dem aus Licht und Wasser elektrischer Strom ausschließlich durch den Einsatz von Biokatalysatoren erzeugt werden könnte. In diesem Zusammenhang würde es zu keinem Anfall klimaschädlicher Abfallprodukte kommen, was aus ökologischer Sicht einen bedeutenden Vorteil darstellt. Unter wirtschaftlichen Aspekten gesehen stehen der Aufwand der Realisierung eines solchen Systems und die daraus gewonnenen Strom- bzw. Wasserstoffmengen bislang jedoch in keinem rentablen Verhältnis. Aus diesem Grund bedarf es der weiteren Optimierung und Stabilisierung der entsprechenden Enzyme unter den beschriebenen Bedingungen.

Der Einsatz der SH bei der reduktiven Cofaktorregenerierung wird im Folgenden näher beschrieben.

1.5 Reduktive Cofaktorregenerierung

Die asymmetrische Synthese chiraler Substanzen wie Hydroxysäuren [Simon *et al.*, 1989, Vasic-Racki *et al.*, 1989], Aminosäuren [Bommarius *et al.* 1998; Hummel & Kula 1989] oder Alkohole [Itoh *et al.*, 1999, Rissom *et al.*, 1999, Itoh *et al.*, 2002] aus den entsprechenden prochiralen Ketonen mittels Oxidoreduktasen erfordert in zahlreichen Reaktionen den Einsatz von Cofaktoren, am häufigsten NADH. Aufgrund der hohen Kosten der Cofaktoren ist deren Regenerierung im Reaktionsansatz für eine wirtschaftliche Produktion unerlässlich.

Gegenwärtig existieren verschiedene Strategien zur Regenerierung von NADH, wobei zwischen biologischen, elektrochemischen, chemischen und photochemischen Methoden zu unterscheiden ist. Die biologische Methode nutzt ganze Zellen oder isolierte Enzyme zur Wiedergewinnung des Cofaktors. Das elektrochemische Verfahren hingegen bedient sich elektrischer Energie und das photochemische der entsprechenden Lichtenergie. Bei der chemischen Regenerierung von NADH werden wiederum Reduktionsmittel eingesetzt [Wichmann und Vasic-Racki, 2003, Chenault *et al.*, 1988].

Ein industriell anwendbares Cofaktorregenerierungssystem sollte eine hohe Effizienz aufweisen, was sowohl hohe Reaktionsumsätze als auch hohe Reaktionsraten einschließt. In diesem Zusammenhang wird sich der Ermittlung der *total turnover number* (TTN) bedient, die diese Effizienz widerspiegelt. Hierbei gibt die TTN die Menge Produkt an, die mit Hilfe von 1 Mol Cofaktor produziert wird. Somit gibt sie die Anzahl der Reaktionszyklen, wie häufig ein Cofaktor oxidiert und reduziert werden kann, an [Chenault *et al.*, 1988]. Ein wirtschaftliches System sollte dabei den Cofaktor 10^3 - 10^5 mal regenerieren, was sowohl bei chemischen als auch bei elektro- und photochemischen Methoden nicht der Fall ist [Chenault und Whitesides, 1987]. Biologische Cofaktorregenerierungssysteme hingegen zeigen eine hohe Effizienz. Hierbei wird die Arbeit mit ganzen Zellen durch das Auftreten von Nebenreaktionen und Substrat- oder Produktinhibierungen begrenzt. Im Gegensatz dazu führt der Einsatz von isolierten Enzymen sowohl zu hohen TTNs als auch zur Vermeidung von Neben-

reaktionen, vorausgesetzt das Enzym besitzt eine ausreichend hohe Stabilität [Wichmann und Vasic-Racki, 2003, Chenault *et al.*, 1988].

Zur Regenerierung von NADH mittels isolierter Enzyme haben sich gegenwärtig zwei Strategien bewährt:

1. Bei der substratgekoppelten Regenerierung katalysiert die Oxidoreduktase, wobei es sich im speziellen um eine Alkoholdehydrogenase handelt, sowohl die Reduktion des Zielketons als auch die Cofaktorregenerierung (Abbildung 1.4). Dazu wird dem Reaktionsansatz ein Alkohol, beispielsweise Isopropanol, im Überschuss hinzugegeben, welcher im selben Maß oxidiert wird, wie das Keton reduziert wird.

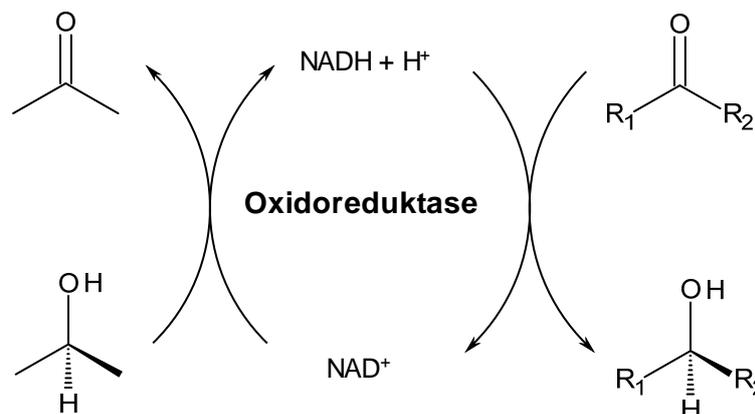


Abbildung 1.4 Substratgekoppelte Cofaktorregenerierung.

2. Die enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung nutzt ein zweites Enzym und sein Substrat.

1.5.1 Formiatdehydrogenasegekoppelte Cofaktorregenerierung

Die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (FDH, EC 1.2.1.2) mit Formiat als Substrat stellt das meist eingesetzte enzymgekoppelte Cofaktorregenerierungssystem dar, da es gegenüber dem substratgekoppelten System eine Reihe von Vorteilen besitzt [Orlich, 2000]:

- Erhöhung der Reduktionsrate, da Substrat und Cosubstrat nicht um dasselbe aktive Zentrum eines Enzyms konkurrieren.

- Formiat ist eine günstige Wasserstoffquelle und zudem in hohen Konzentrationen in Lösung stabil.
- Aufgrund des Übergangs des entstehenden Kohlenstoffdioxids in die Gasphase liegt das Reaktionsgleichgewicht stark auf der Produktseite ($\text{NADH} + \text{H}^+$).
- Die FDH ist kommerziell und zu niedrigen Preisen erhältlich.

Aufgrund der beschriebenen Vorteile findet die FDH-katalysierte Cofaktorregenerierung gegenwärtig industrielle Anwendung bei der Evonik Degussa GmbH, wo *L-tert*-Leucin aus Trimethylpyruvat mit einer Leucin-Dehydrogenase hergestellt wird (Abbildung 1.5) [Wöltinger *et al.*, 2005].

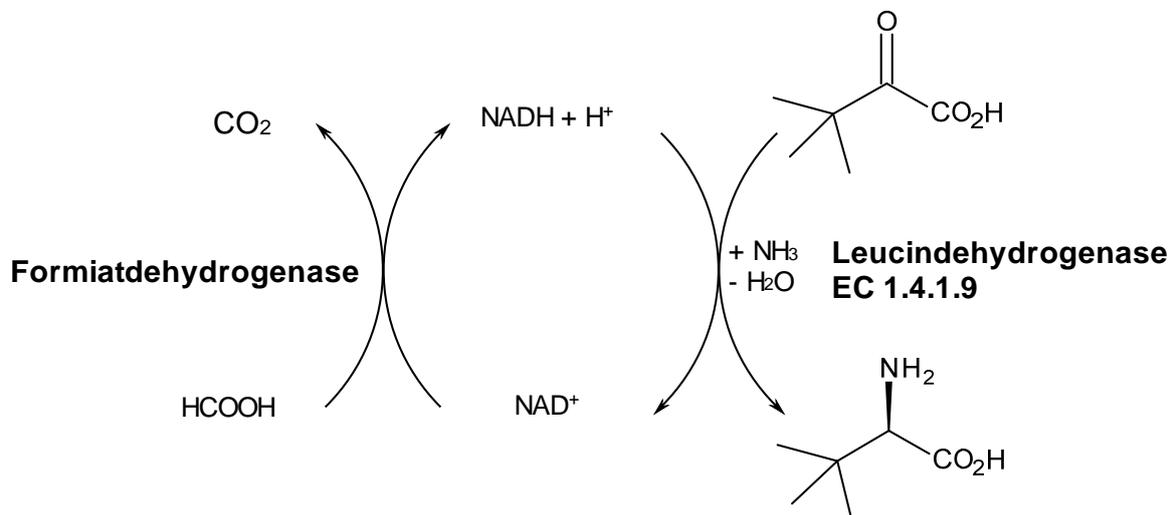


Abbildung 1.5 Reaktionsschema des *L-tert*-Leucinprozesses.

1.5.2 Hydrogenasegekoppelte Cofaktorregenerierung

Die Nutzung eines hydrogenasegekoppelten Systems zur Regenerierung von NADH stellt eine bemerkenswerte Alternative zum konventionell genutzten FDH-katalysierten System dar, vorausgesetzt die eingesetzte Hydrogenase besitzt neben einer Bindestelle zur Umsetzung von molekularem Wasserstoff eine weitere für NAD^+ , wie es bei der SH der Fall ist. In einem solchen System erfolgt die Regenerierung von NADH durch die Zugabe der Hydrogenase und ihres Substrates Wasserstoff (Abbildung 1.6).

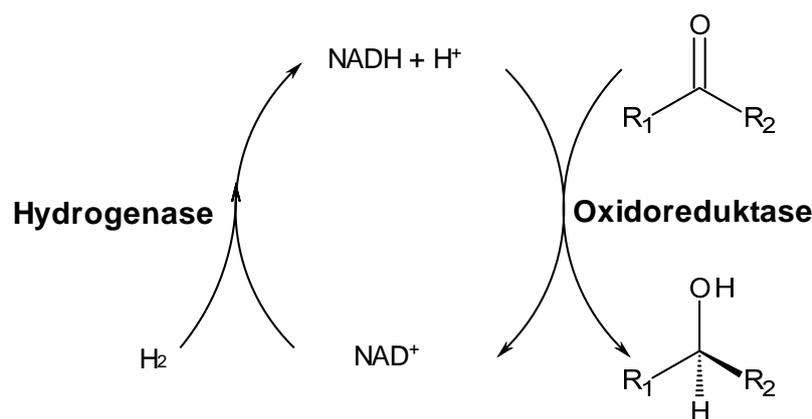


Abbildung 1.6 Hydrogenasegekoppelte Cofaktorregenerierung.

Aus dem Einsatz einer Hydrogenase zur Cofaktorregenerierung ergibt sich zunächst der Vorteil, eines der günstigsten zur Verfügung stehenden Reduktionsmittel nutzen zu können, molekularen Wasserstoff. Des Weiteren wird eine maximale Atomökonomie erzielt und die Entstehung von Nebenprodukten, wie es bei der FDH der Fall ist, vermieden. Zudem hat sich das FDH-gekoppelte System zwar bislang für industrielle Anwendungen bewährt, jedoch besitzt es noch immer eine Reihe von Nachteilen, die durch den Einsatz einer effizienten Hydrogenase kompensiert werden könnten. So besitzt die FDH eine geringe spezifische Aktivität, die zwischen 3 und 4 U mg^{-1} liegt und dazu führt, dass große Enzymmengen und lange Reaktionszeiten benötigt werden, um ausreichend hohe Reaktionsumsätze zu erzielen [Hummel, 1999]. In diesem Zusammenhang konnten bei der FDH-gekoppelten Regenerierung von NADH bislang nur TTNs zwischen 600 und 80000 erreicht werden [Chenault *et al.*, 1988, Kula und Wandrey, 1987], was die begrenzte Effizienz dieses Regenerierungssystems nochmals belegt. Zudem gilt die FDH in organischen Lösungsmitteln als wenig stabil [Gröger *et al.*, 2003, Kruse *et al.*, 1996], was die technische Anwendbarkeit zusätzlich limitiert. Der Einsatz von Formiat bei der FDH-gekoppelten Cofaktorregenerierung zieht darüber hinaus den ständigen Bedarf einer starken Pufferung des Reaktionssystems nach sich. Anderenfalls käme es zu einer starken Beeinträchtigung des pH-Wertes während der Reaktion, was die Inaktivierung der eingesetzten Enzyme zur Folge hätte.

Dass ein hydrogenasegekoppeltes Cofaktorregenerierungssystem grundsätzlich realisierbar ist, wurde bislang mittels verschiedener Hydrogenasen demonstriert. So konnte bereits gezeigt

werden, dass sich mithilfe der löslichen Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* NADPH mit einer hohen Effizienz regenerieren lässt [Mertens *et al.*, 2003]. Darüber hinaus wurde die generelle Realisierbarkeit der NADH-Regenerierung unter anderem mit einer Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* [Hilhorst *et al.*, 1993] sowie mit der SH gezeigt, wobei die Umsetzung mit der SH ihren Einsatz in der isolierten Form [Andersson *et al.*, 1998, Klivanov und Puglisi, 1980] als auch den Einsatz der ganzen Zellen [Hasumi *et al.*, 1992, Okura *et al.*, 1990, Otsuka *et al.*, 1989, Payen *et al.*, 1983] einschloss. Eine ausgiebige Bewertung und ein Vergleich mit der konventionell genutzten FDH wurden jedoch bislang nicht vorgenommen, wodurch noch keine Aussagen über die Effizienz des SH-katalysierten Cofaktorregenerierungssystems getroffen werden konnten.

1.6 Zielsetzung

Die asymmetrische Synthese chiraler Substanzen wie Hydroxysäuren, Aminosäuren oder Alkohole mittels Oxidoreduktasen erfordert häufig den Einsatz des Cofaktors NADH, weshalb eine Regenerierung dieses Cofaktors im Reaktionsansatz für eine ökonomische Prozessführung unerlässlich ist. Da das gegenwärtig etablierte Verfahren, das die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (FDH) als Cofaktorregenerierungsenzym nutzt, noch immer eine geringe Effizienz besitzt, besteht das Bestreben ein alternatives und effizienteres Regenerierungssystem bereitzustellen. Ein besonderes Interesse wird in diesem Zusammenhang dem Einsatz eines hydrogenasegekoppelten Regenerierungssystems beigemessen, vorausgesetzt es handelt sich um eine bidirektionale Hydrogenase, die neben der Bindestelle zur Umsetzung von molekularem Wasserstoff eine zweite für die Reduktion von NAD besitzt. Eine Hydrogenase, die diese Voraussetzung erfüllt und sich zudem durch eine geringe Sensitivität gegenüber Sauerstoff auszeichnet, ist die lösliche Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16 (SH). Für eine solche technische Anwendung der SH erfolgte jedoch bislang noch keine umfassende Charakterisierung, Bewertung sowie eine gezielte Anpassung des Enzyms an die geforderten Prozessbedingungen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst eine umfassende Charakterisierung der überexprimierten und mittels Strep-Tactin[®]-Affinitätschromatographie aufgereinigten, hexameren SH erfolgen, da in diesem Bereich nur unzureichend Literaturdaten existieren. Dazu sollte der Einfluss verschiedener isolierter und technisch relevanter Faktoren auf die Aktivität und Lagerungsstabilität der SH analysiert werden. Bei den zu untersuchenden Parametern sollte es sich um die Temperatur, den pH-Wert, verschiedene Salze, unterschiedliche wasserlösliche und -unlösliche organische Lösungsmittel sowie ionische Flüssigkeiten, verschiedene Additive und die mechanische Beanspruchung handeln. Zudem sollte die gegenseitige Beeinflussung des pH-Wertes und der Temperatur bezogen auf die Enzymaktivität und -stabilität mittels *design of experiments* (DOE, statistische Versuchsplanung) analysiert und die optimalen Bedingungen für eine maximale Aktivität und Stabilität sowie einer Balance zwischen den beiden Größen ermittelt werden. Basierend auf der Kenntnis dieser technisch relevanten Faktoren und deren Einfluss auf die Aktivität und Stabilität der SH sollte eine Bewertung der SH hinsichtlich ihres Einsatzes bei der Regenerierung von NADH erfolgen.

Basierend auf den Resultaten der Enzymcharakterisierung sollte die gezielte Stabilisierung der SH gegenüber deaktivierenden Einflüssen wie der Gegenwart organischer Lösungsmittel, ionischer Flüssigkeiten und unter mechanische Beanspruchung erfolgen. Da sich die Stabilisierung eines komplexen, heteromeren Enzyms wie der SH durch molekularbiologische Methode sehr aufwändig gestaltet, sollte die Stabilisierung der SH über die chemische Modifizierung der Proteinoberfläche und die adsorptive sowie kovalente Immobilisierung auf einen geeigneten Träger erfolgen. Dazu sollte für beide Immobilisierungsformen eine Optimierung des Immobilisierungsverfahrens durchgeführt und zudem eine Bewertung der erzielten Enzymstabilisierung vorgenommen werden. Durch die Immobilisierung der SH sollte neben einer Stabilisierung der SH die Entwicklung eines handhabbareren, rezyklierbaren Biokatalysators, der eine kontinuierliche Prozessführung erlaubt, erreicht werden.

Schlussendlich sollte die SH in ihrer nativen sowie in ihrer stabilisierten Form bei der reduktiven Regenerierung von NADH eingesetzt werden. Als Modellreaktion sollte dabei die durch die Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR) katalysierte Reduktion von Acetophenon zu (*S*)-1-Phenylethanol dienen. Anhand der Bestimmung der Reaktionsumsätze sowie der Berechnung der erreichten Umsatzzahlen (TTN) sollte die Effizienz dieses Regenerierungssystems ermittelt und über den Vergleich mit dem gegenwärtig etablierten FDH-gekoppelten System bewertet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acetophenon	Sigma Aldrich (Steinheim)
Ammoeng TM 101	RWTH Aachen (AK Leitner)
Biorad Protein Assay	Biorad (München)
[BMIM][BF ₄]	Roth (Karlsruhe)
[BMIM][OTf]	Roth (Karlsruhe)
D-Desthiobiotin	Sigma Aldrich (Steinheim)
DTT	Roth (Karlsruhe)
DMF	Roth (Karlsruhe)
DMSO	Roth (Karlsruhe)
[EMIM][EtSO ₄]	Roth (Karlsruhe)
FMN	Sigma Aldrich (Steinheim)
[HMIM][Cl]	Roth (Karlsruhe)
IPTG	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
MTBE	Roth (Karlsruhe)
[MTEOA][MeSO ₄]	RWTH Aachen (AK Leitner)
n-Heptan	Roth (Karlsruhe)
NAD ⁺	Roth (Karlsruhe)
NADH (Kaliumsalz)	Sigma Aldrich (Steinheim)
NADH (Natriumsalz)	Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese [®] Gel 40	Roth (Karlsruhe)
Toluol	Roth (Karlsruhe)

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

2.1.2 Sonstige Materialien

Durchfluss Strep-Tactin [®] Superflow [®] Säule	IBA (Göttingen)
FDH (58,3 U mL ⁻¹)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Ni-NTA-Säule	Qiagen (Hilden)
Page Ruler [™] Prestained Protein Ladder	Fermentas (Leon-Rot)
Page Blue [™] Protein Staining Solution	Fermentas (Leon-Rot)
Roti [®] -Load (4 x)	Roth (Karlsruhe)

Plasmide und Stämme

<i>Ralstonia eutropha</i> HF210(pHG1)	(Humboldt Universität Berlin, AK Friedrich/Lenz) [Kortlücke und Friedrich, 1992]
pGE760	41.2kB, <i>SH Operon (StrepHoxF)</i> <i>ΔhoxBCJ</i> in <i>pEDY309 TcR RK2 ori</i> <i>Mob+</i> (Humboldt Universität Berlin, AK Friedrich/Lenz) [Josta Hamann, Oliver Lenz, Lars Lauterbach, unveröffentlicht]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	[<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻)</i> <i>λ(DE3 [lacI lacUV5-T7gege 1 ind1 sam7 nin5])</i>] (Novagen)
pET26b(+)-CPCRhis	6.266 kb, <i>P_{T7lac}, Kan^R, lacI, ColEI-</i> <i>Replikon</i>

Träger für die Enzymimmobilisierung

Amberlite [™] XAD 761	Rohm und Haas (Chauny, Frankreich)
Amberlite [™] XAD 7HP	Rohm und Haas (Chauny, Frankreich)
Amberlite [™] FPA 54	Rohm und Haas (Chauny, Frankreich)

Amberlite™ FPC 3500	Rohm und Haas (Chauny, Frankreich)
CV-IB-A161	Chiralvision (Leiden, Niederlande)
CV-IB-C435	Chiralvision (Leiden, Niederlande)
Sepabeads® EC-EP	Resindion S.R.L (Binasco, Italien)

2.1.3 Geräte

Elektrophorese (SDS-PAGE)	Xcell SureLock™ Mini-Cell, Invitrogen (Karlsruhe)
FPLC	Amersham Bioscience Europa GmbH (Freiburg)
Gaschromatograph GC-2010	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Geldokumentation	Alpha Innotech (Hessisch Oldendorf)
Inkubator	Memmert (Schwabach)
Inkubationsschüttler	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
Autoklav	HSP Steriltechnik AG (Magdeburg)
Magnetrührer	VWR (Darmstadt)
pH-Meter	Metrohm (Filderstadt, Plattenhardt)
Rotationsverdampfer	Büchi (Essen)
Thermoblock	Peqlab (Erlangen)
Thermoschränke	Aqualytic (Dortmund)
Überkopfschüttler 3025	GFL (Burgwedel)
Ultraschallgeräte:	
Ultraschallbad Sonorex RK106	Bandelin (Berlin)
Ultraschallstab Labsonic M	Satorius (Göttingen)
UV-Vis-Spektrometer Cary 50	Varian (Darmstadt)
Vortexer Genius 3	IKA (Staufen)
Waage	Sartorius (Göttingen)
Zentrifugen:	
Minispin Plus	Eppendorf AG (Hamburg)
Biofuge Stratos	Heraeus, Thermo Fisher Scientific (Bonn)

2.1.4 Medien und Puffer

FN-/FGN-Medium (SH)

Tabelle 2.1 Zusammensetzung von FN- und FGN-Medium pro Liter.

Komponenten	FN-Medium	FGN-Medium
	Masse [g]	Masse [g]
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	4,47	4,47
KH ₂ PO ₄	1,5	1,5
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,02	0,02
FeCl ₃	0,0003	0,0003
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,001	0,001
NiCl ₂	0,000013	0,000013
ZnCl ₂	0,000014	0,000014
NH ₄ Cl	0,2	0,2
Fructose	0,4	0,2
Glycerin	-	0,2
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,0001	0,0001
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,00003	0,00003
H ₃ BO ₃	0,0003	0,0003
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,0002	0,0002
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,00001	0,00001
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,00003	0,00003

Die Selektion erfolgte durch Zusatz von 0,1 µg mL⁻¹ Tetrazyclin.

LB-Medium (CPCR)

Zusammensetzung pro Liter: 10 g Bacto-Trypton; 10 g NaCl; 5 g Hefeextrakt.

Die Selektion erfolgte durch Zusatz von 25 µg mL⁻¹ Kanamycin.

Laufpuffer für SDS-Gel (pH 8,3)

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

Puffer zur Aufreinigung der SH:**Lysepuffer (pH 7,0)**

0,05 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 ; 0,05 M Dinatriumsuccinat; 0,5 mM $NiCl_2$; 0,005 M $MgCl_2$.

Waschpuffer (pH 7,1)

0,05 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 .

Elutionspuffer (pH 7,0)

0,05 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 ; 0,005 M D-Desthiobiotin.

Puffer zur Aufreinigung der CPCR:**Lysepuffer (pH 8,0)**

0,05 M NaH_2PO_4 ; 0,3 M $NaCl$; 0,02 M Imidazol.

Waschpuffer (pH 8,0)

0,05 M NaH_2PO_4 ; 0,3 M $NaCl$; 0,08 M Imidazol.

Elutionspuffer (pH 8,0)

0,05 M NaH_2PO_4 ; 0,3 M $NaCl$; 0,25 M Imidazol.

Entsalzungspuffer (pH 8,0)

0,05 M TEA/HCl; 0,15 M $NaCl$.

2.2 Bereitstellung der Enzyme**2.2.1 Lösliche Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16****Kultivierung von *Ralstonia eutropha***

Die Kultivierung von *Ralstonia eutropha* erfolgte in 1 L-Schüttelkolben. Als Medium diente FGN, das mit dem Selektionsmarker Tetrazyklin versetzt wurde. Die FGN-Hauptkulturen wurden 1:50 mit einer 3 Tage FN-Vorkultur beimpft und etwa 48 Stunden bei ebenfalls 30 °C

und 150 Upm bis zum Erreichen einer OD_{436} von 8-11 inkubiert. Die Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation (10 min, 7500 Upm, 4 °C) und anschließender Resuspension in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0) sowie einer abschließenden Zentrifugation. Die Zellpellets wurden bei mindestens -20 °C gelagert.

Proteinaufreinigung

Die Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend in Lysepuffer resuspendiert (2 mL g^{-1} Zellfeuchtgewicht). Nach Zugabe von EDTA-freien Proteaseinhibitoren wurde der Ansatz abermals für eine Zeitdauer von 10 Minuten auf Eis gehalten. Im Anschluss erfolgte der Zellaufschluss mittels gepulsten Ultraschalls in 5 Zyklen über je 5 Minuten mit jeweils 1 Minute Pause auf Eis. Die Abtrennung der Trümmer erfolgte durch Zentrifugation unter Argonatmosphäre (60 min, 15000 Upm, 4 °C). Im Anschluss wurde der gesamte Überstand mit Sauerstoff begast und bei 4 °C etwa 15 Minuten lang gerührt.

Die Aufreinigung der SH erfolgte über den C-terminalen Strep-tag unter Verwendung einer Durchfluss Strep-Tactin[®]-Säule mit einem Matrixvolumen von 5 mL und ebenfalls bei 4 °C. Vor der Beladung der Strep-Tactin[®]-Säule wurde diese mit Waschpuffer equilibriert und der Enzymrohextrakt filtriert. Im Anschluss wurden zunächst ungebundene und unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix mit 3-5 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen, bevor selektiv das Zielprotein eluiert wurde. Dies erfolgte unter Verwendung von 6 x 0,5 Säulenvolumen Elutionspuffer. Die SH wurde unter Zugabe von 5 % Glycerin bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis*

Kultivierung von *Candida parapsilosis*

Die Expression der rekombinanten CPRC mittels der entsprechenden *E.coli* Zellen erfolgte in 1 L-Schüttelkolben. Als Medium diente LB, das mit dem Selektionsmarker Kanamycin versetzt wurde. Die Hauptkulturen wurden 1:50 mit einer Übernacht-Vorkultur beimpft und bei 37 °C und 250 Upm bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,8-1 inkubiert. Die Expression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert und erfolgte für etwa 6 Stunden ebenfalls bei 37 °C und 250 Upm. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (30 min, 7500 Upm, 4 °C), in 0,02 M Tris/HCl-Puffer (pH 8.0) resuspendiert und erneut über eine Zeitdauer von 25 Minuten zentrifugiert. Die Zellpellets wurden bei mindestens -20 °C gelagert.

Proteinaufreinigung

Die Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend in Lysepuffer resuspendiert (4 mL g⁻¹ Zellfeuchtgewicht). Nach Zugabe von 1 mg mL⁻¹ Lysozym erfolgte eine weitere Inkubation unter Rühren über eine Zeitdauer von 30 Minuten auf Eis. Nach der darauffolgenden Zugabe von 5 µg mL⁻¹ DNaseI und 1 % (v/v) TritonX100 wurde der Ansatz ebenfalls für 10 Minuten auf Eis gehalten. Der anschließende Zellaufschluss erfolgte mittels gepulsten Ultraschalls in 6 Zyklen über je 30 Sekunden mit jeweils 1 Minute Pause auf Eis. Die Zelltrümmer wurden schließlich durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 15000 Upm, 4 °C).

Die Aufreinigung der CPCPR erfolgte über den N-terminalen His-tag unter Verwendung eines FPLC-Systems mit einer Ni-NTA-Säule mit einem Matrixvolumen von 5 mL. Vor der Beladung der Ni-NTA-Säule wurde diese mit Lysepuffer equilibriert und der gesamte Überstand des Zellaufschlusses filtriert. Nach Auftragung des Enzymrohextraktes auf die Ni-NTA-Säule wurden zunächst ungebundene und unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix gewaschen, bevor im Anschluss selektiv das Zielprotein eluiert wurde. Dies erfolgte durch die direkte Erhöhung der Imidazolkonzentration von 0,001 M auf 0,25 M. Die Flussrate entsprach stets 5 mL min⁻¹. Die CPCPR wurde unter Zugabe von 50 % Glycerin bei -20 °C gelagert.

2.3 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen wurde nach der Methode von Bradford bestimmt [Bradford, 1976]. Die Quantifizierung des Proteins erfolgte dabei durch die Reaktion mit Coomassie Brilliant Blue spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm. Unter Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA) wurde in einem Konzentrationsbereich von 5-25 µg kalibriert. Jeweils 800 µL der entsprechenden Proben wurden mit 200 µL Bradfordreagenz versetzt und nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) vermessen.

2.4 SDS-PAGE

Der Proteinnachweis erfolgte über Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die genaue Zusammensetzung des Sammel- bzw. Trenngels ist Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Tabelle 2.2 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.

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

Die Proteinproben wurden 1:1 mit dem Puffer Roti[®]-Load (4x) versetzt und bei 95 °C 5 Minuten denaturiert. Im Anschluss wurde ein Probevolumen von jeweils 20 µL in die Probetasche gegeben. Als Standard zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine diente Page Ruler[™] Prestained Protein Ladder, von dem 5 µL ebenfalls in eine der Probetaschen gegeben wurde. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 180 Volt für 1-1,5 Stunden. Anschließend wurde das Gel 30 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und die Proteinbanden mit Page Blue[™] Protein Staining Solution über Nacht angefärbt. Die Entfärbung nicht proteinhaltiger Gelbereiche erfolgte wiederum mit destilliertem Wasser. Die Dokumentation der Proteinbanden erfolgte mittels einer Geldokumentation.

2.5 Charakterisierung der SH

2.5.1 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Aktivität der SH wurde spektralphotometrisch über die wasserstoffabhängige Bildung von NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm ermittelt. Das Reaktionsvolumen betrug 1 mL und setzte sich wie folgt zusammen:

Puffer	0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0)
NAD ⁺	1 mM
FMN	1 µM

Die Reaktionslösung wurde in eine Küvette überführt und mit einem gasdichten Septum versehen. Im Anschluss wurde die gesamte Lösung mit Wasserstoff gesättigt und die Reaktion durch die Zugabe von 1-10 μL Enzym gestartet. Die Zunahme der Absorption wurde für 1 Minute bei RT verfolgt, das Messintervall entsprach 1 Sekunde. Die molare Konzentration von NADH wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten aus der gemessenen Extinktion unter Verwendung des Lambert- Beerschen Gesetzes (Gleichung 2.1) berechnet.

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

wobei Ext der Extinktion [-], ε dem Extinktionskoeffizienten [$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$], c der Konzentration [mol L^{-1}] und d der Schichtdicke [cm] entspricht. Die Berechnung der volumetrischen Enzymaktivität erfolgte demnach nach der folgenden Gleichung:

$$A_v = \frac{\Delta E \cdot V_{ges}}{V_E \cdot \varepsilon_{340} \cdot d} \quad \text{Gleichung 2.2}$$

wobei A_v der volumetrischen Aktivität [U mL^{-1}], ΔE der Extinktionsdifferenz über die Zeit [-], V_{ges} dem Gesamtvolumen der Reaktion [mL], V_E dem Enzymvolumen [mL] und ε_{340} dem Extinktionskoeffizienten von NADH bei 340 nm [$6220 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$] entspricht. Die Schichtdicke der Küvette beträgt 1 cm. Demnach ist eine Unit (U) der SH als die Enzymmenge definiert, die die Reduktion von 1 $\mu\text{mol NAD}^+$ pro Minute katalysiert.

2.5.2 Untersuchung der Enzymaktivität in Abhängigkeit verschiedener isolierter Einflüsse

Die Untersuchung der Enzymaktivität erfolgte in Abhängigkeit von verschiedenen reaktionsrelevanten Parametern [Temperatur, pH, Salze, wasserlösliche und -unlösliche organische Lösungsmittel, ionische Flüssigkeiten (ILs) und Additive], deren Einfluss nacheinander unabhängig von einander analysiert wurde. Hierbei wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, bestimmt. Die jeweiligen, für die verschiedenen Parameter untersuchten Bedingungen sind nachfolgend beschrieben.

Temperatureinfluss

Der Temperatureinfluss wurde durch die Ermittlung der Enzymaktivität bei verschiedenen Temperaturen (25, 30, 35, 40, 45 °C) in 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) untersucht.

pH-Einfluss

Die Untersuchung des pH-Einflusses erfolgte anhand der Bestimmung der Enzymaktivität bei verschiedenen pH-Werten (7, 7,5, 8, 8,5, 9). Für die Einstellung des pH wurde stets ein 0,05 M Tris/HCl-Puffer verwendet, wobei die Reaktionstemperatur 35 °C betrug.

Einfluss verschiedener Salze

Für die Untersuchung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von Salzen wurde diese in Gegenwart von NaCl, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, KCl, K₂SO₄, K₂HPO₄, (NH₄)Cl, (NH₄)₂SO₄ und (NH₄)₂HPO₄ bestimmt. Die Salzkonzentration betrug 0,1 M. Die Reaktion wurde in einem Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) bei 35 °C durchgeführt.

Einfluss von wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln

Bei der Untersuchung des Einflusses von wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln auf die Enzymaktivität wurden mehrere funktionell unterschiedliche Lösungsmittel ausgewählt, wobei es sich um DMF, DMSO und Isopropanol handelte. Die Lösungsmittel wurden zu einem Anteil von jeweils 10 und 25 % (v/v) dem Reaktionssystem zugesetzt. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte bei 35 °C in einem Tris/HCl-Puffer (pH 8,0).

Einfluss von wasserunlöslichen organischen Lösungsmitteln

Die Untersuchung der Enzymaktivität in Gegenwart von wasserunlöslichen organischen Lösungsmitteln erfolgte unter der Verwendung funktionell unterschiedlicher Lösungsmittel, wobei es sich um MTBE, Toluol und n-Heptan handelte. Der für die Reaktion verwendete Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) wurde hierbei mit dem jeweiligen Lösungsmittel gesättigt und die Enzymaktivität bei 35 °C bestimmt.

Einfluss von ionischen Flüssigkeiten

Der Einfluss von ILs auf die Enzymaktivität wurde unter Verwendung verschiedener wasserlöslicher ILs durchgeführt. Dabei handelte es sich um AmmoengTM 101, [BMIM][BF₄],

[BMIM][OTf], [EMIM][EtSO₄], [HMIM][Cl] und [MTEOA][MeSO₄], die dem Reaktionssystem zu einem Anteil von jeweils 2,5, 5 und 10 % (v/v) zugesetzt wurden. Die Reaktion wurde in einem Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) bei 35 °C durchgeführt.

Einfluss von Additiven

Die Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Additiven auf die Enzymaktivität erfolgte unter Verwendung von jeweils 1 und 3 µM FMN, 0,5 mM und 1 mM DTT, 0,5 mM TCEP, 0,2 M Ascorbinsäure, 0,05 M PEG₄₀₀ und 0,05, 0,1 und 0,25 M Glycerin. Die Reaktion wurde in einem Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) bei 35 °C durchgeführt.

Bei allen Messungen der Enzymaktivität unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen erfolgte eine Dreifachbestimmung der Aktivität zur statistischen Sicherung der Ergebnisse.

2.5.3 Bestimmung der Enzymstabilität

Die Stabilität der SH wurde über die zeitliche Abnahme der Enzymaktivität und der daraus resultierenden Inaktivierungskonstante bestimmt. Dazu wurde das Enzym unter definierten Bedingungen inkubiert und die Restaktivität in regelmäßigen Abständen bestimmt. Dazu wurde dem Inkubationsansatz ein definiertes Volumen entnommen und die Enzymaktivität, wie unter 2.5.1 beschrieben ist, ermittelt. Die Inkubation des Enzyms fand bei allen Messungen unter aeroben Bedingungen statt.

Die Quantifizierung der Enzymstabilität erfolgte über die Halbwertszeit, die sich aus der Inaktivierungskonstante berechnen lässt (Gleichung 2.3) und als diejenige Zeit definiert ist, nach der das Enzym 50 % seiner Ausgangsaktivität zurückbehalten hat.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Gleichung 2.3}$$

wobei $t_{1/2}$ der Halbwertszeit [h] und k der Inaktivierungskonstante entspricht [h⁻¹].

2.5.4 Untersuchung der Enzymstabilität in Abhängigkeit verschiedener isolierter Einflüsse

Die Untersuchung der Enzymstabilität erfolgte analog zu den Untersuchungen der Enzymaktivität in Abhängigkeit von Temperatur, pH, Salzen, wasserlöslichen und -unlöslichen organischen Lösungsmitteln, ILs, sowie Additiven. Dabei wurden die verschiedenen Einflussgrößen unabhängig von ihrer gegenseitigen Beeinflussung nacheinander untersucht.

Temperaturstabilität

Die Analyse der Temperaturstabilität wurde über die Inkubation des Enzyms in einem 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) bei verschiedenen Temperaturen (4, 15, 25, 35, 45 °C) durchgeführt.

pH-Stabilität

Die pH-Stabilität wurde bei pH 7, 7,5, 8, 8,5 und 9 in 0,05 M Tris/HCl-Puffer untersucht. Die Inkubationstemperatur betrug stets 35 °C.

Salzstabilität

Zur Untersuchung der Salzstabilität wurde das Enzym in Gegenwart verschiedener Salze (NaCl, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, KCl, K₂SO₄, K₂HPO₄, (NH₄)Cl, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄) inkubiert, die dem Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) in einer Konzentration von 0,1 M zugesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 35 °C.

Lösungsmittelstabilität

Die Untersuchung der Lösungsmittelstabilität erfolgte zum einen unter Verwendung wasserlöslicher und zum anderen unter Verwendung wasserunlöslicher organischer Lösungsmittel. Dabei handelte es sich um funktionell unterschiedliche Lösungsmittel. Die Untersuchung des Einflusses von wasserunlöslichen Lösungsmitteln umschloss den Einsatz von DMF, DMSO und Isopropanol, die dem Inkubationsansatz zu einem Anteil von 10 % zugesetzt wurden. Der verwendete Puffer war stets Tris/HCl-Puffer (pH 8,0). Bei der Untersuchung der Enzymstabilität in Abhängigkeit von wasserunlöslichen organischen Lösungsmitteln wurden MTBE, Toluol und n-Heptan eingesetzt. Hierbei wurde der verwendete Puffer mit dem jeweiligen Lösungsmittel gesättigt. Die Inkubation erfolgte bei 35 °C.

IL-Stabilität

Die Untersuchung der IL-Stabilität erfolgte unter Verwendung von AmmoengTM 101, [BMIM][BF₄], [BMIM][OTf], [EMIM][EtSO₄], [HMIM][Cl] und [MTEOA][MeSO₄], die dem Reaktionssystem zu einem Anteil von jeweils 2,5, 5 und 10 % (v/v) zugesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte in einem Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) bei 35 °C.

Stabilität in Gegenwart verschiedener Additive

Bei der Untersuchung der Enzymstabilität in Gegenwart verschiedener Additive wurden jeweils 1 µM FMN, 0,25 mM Kaliumhexacyanoferrat, 0,05 M PEG₄₀₀ sowie 0,05, 0,1 und 0,25 M Glycerin dem Inkubationsansatz zugesetzt. Die Inkubation erfolgte in einem Tris/ HCl-Puffer (pH 8,0) bei 35 °C.

Mechanische Stabilität

Bei der Untersuchung der mechanischen Enzymstabilität wurde der Einfluss von Scherkräften in Form eines KPG-Rührers (400 Upm) und eines Magnetrührers (400 und 800 Upm) analysiert. Die Inkubation erfolgte in einem Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) bei 35 °C.

Bei allen Messungen der Enzymstabilität unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen erfolgte eine Dreifachbestimmung der Halbwertszeit zur statistischen Sicherung der Ergebnisse.

2.5.5 Untersuchung der Enzymaktivität und -stabilität mittels Design of Experiments

Durch den Einsatz von *design of experiments* (DOE, statistische Versuchsplanung) lassen sich im Gegensatz zu klassischen Methoden Wechselwirkungen zwischen mehreren Einflussgrößen auf eine Zielgröße ermitteln, da über statistische Zusammenhänge alle Faktoren gleichzeitig variiert werden können [Siebertz *et al.*, 2010]. Bei den untersuchten Zielgrößen handelte es sich um die Enzymaktivität und -stabilität, die in Abhängigkeit von der Temperatur und dem pH unter Berücksichtigung derer gegenseitigen Beeinflussung analysiert wurden. Die Temperatur und der pH stellten hierbei quantitative Faktoren dar, die einfach variiert werden konnten. Die beiden Einflussgrößen wurden in 2 Stufen festgelegt, wobei der Versuchsplan nach dem Central-Composite-Design erstellt wurde. Hierbei entstehen ein Würfel und ein

Stern, wobei der Würfel dem zweistufigen Versuchsplan entspricht und der Stern aus der Variation der einzelnen Faktoren, ausgehend von der Mittelstellung, dem sogenannten *center point*, resultiert, wie in Abbildung 2.1 nach Siebertz *et al.*, 2010 dargestellt ist. Der Stufenabstand übersteigt dabei den des Würfels, wodurch letztlich jeder Faktor auf 5 Stufen getestet wird und sich somit die Möglichkeit bietet, auch nichtlineare Zusammenhänge zu analysieren.

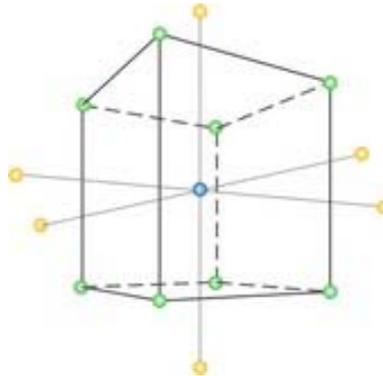


Abbildung 2.1 Die dreidimensionale Konfiguration eines Central-Composite-Designs.

Die Anzahl der Versuche sowie die Faktorkombination des einzelnen Versuchs können dem Versuchsplan entnommen werden, der in Abbildung 2.2 gezeigt ist.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	Temperatur	pH	Aktivität	Stabilität
2	1	N1	11	Incl	25	7		
3	2	N2	6	Incl	45	7		
4	3	N3	4	Incl	25	9		
5	4	N4	7	Incl	45	9		
6	5	N5	1	Incl	20,86	8		
7	6	N6	9	Incl	49,14	8		
8	7	N7	10	Incl	35	6,586		
9	8	N8	5	Incl	35	9,414		
10	9	N9	8	Incl	35	8		
11	10	N10	3	Incl	35	8		
12	11	N11	2	Incl	35	8		

Abbildung 2.2 Der nach dem Central-Composite-Design erhaltene Versuchsplan für zwei Faktoren (Temperatur, pH) mit der jeweiligen Faktorkombination, bei denen die Enzymaktivität und -stabilität untersucht wurden.

Die Untersuchung der Enzymaktivität und -stabilität erfolgte unter den entsprechenden Temperatur- und pH-Bedingungen in 0,05 M Tris/HCl-Puffer. Die Quantifizierung der Enzymstabilität erfolgte, wie bereits beschrieben, über die Halbwertszeit (Kapitel 2.5.3).

2.6 Bestimmung der Enzymaktivität der CPCR und FDH

CPCR

Die Bestimmung der Aktivität der CPCR erfolgte spektralphotometrisch über den Verbrauch von NADH, welches bei der Reduktion von Acetophenon zu 1-Phenylethanol stöchiometrisch zu NAD^+ oxidiert wird. Die Abnahme der Absorption wurde bei 340 nm für 1 Minute und bei 30 °C gemessen. Das Reaktionsvolumen betrug 1 mL und setzte sich wie folgt zusammen:

Puffer	0,1 M TEA/HCl-Puffer (pH 7,5)
Acetophenon	0,3 mM
NADH	0,3 mM

Die Reaktionslösung wurde zunächst vortemperiert und dann in eine Küvette überführt. Im Anschluss wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 μL Enzym gestartet. Demnach entspricht eine Unit CPCR der Enzymmenge, die die Reduktion von 1 μmol Acetophenon pro Minute katalysiert.

FDH

Die Bestimmung der Aktivität der FDH erfolgte spektralphotometrisch über die Reduktion von NAD^+ , wobei die Bildung von NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm über 1 Minute und bei 30 °C verfolgt wurde. Als Substrat diente Natriumformiat. Das Reaktionsvolumen betrug 1 mL und setzte sich wie folgt zusammen:

Puffer	0,1 M TEA/HCl-Puffer (pH 7,5)
Natriumformiat	0,25 M
NAD^+	1,7 mM

Die Reaktionslösung wurde zunächst vortemperiert und dann in eine Küvette überführt. Im Anschluss wurde die Reaktion durch die Zugabe von 5 μL Enzym gestartet. Demnach ent-

spricht eine Unit FDH der Enzymmenge, die die Umsetzung von 1 μmol Natriumformiat pro Minute katalysiert.

Die Berechnung der Aktivität der CPCR und FDH erfolgte analog zu den Berechnungen der Aktivität der SH.

2.7 Chemische Modifizierung der SH mit Methoxypolyethylenglykol (mPEG)

2.7.1 Aktivierung von Methoxypolyethylenglycol

Die Aktivierung des verwendeten mPEG₂₀₀₀ und mPEG₅₀₀₀ erfolgte mittels *p*-Nitrophenylchloroformat nach der Methode von Hernáiz *et al.*, 1997. Jeweils 10 g mPEG wurden in 20 mL wasserfreiem Acetonitril gelöst. Im Anschluss wurde eine Lösung bestehend aus 0,7 mL Triethylamin und 1 g *p*-Nitrophenylchloroformat zugegeben. Das Gemisch wurde für 20 Stunden bei RT und unter einer Stickstoff-Schutzgasatmosphäre gerührt, wobei ein weißer Niederschlag bestehend aus Triethylaminchlorid und mPEG entstand. Dieser wurde nach Ablauf der Reaktion abfiltriert und anschließend verworfen. Im nächsten Schritt wurde das Filtrat mit 200 mL wasserfreiem Diethylether versetzt und auf 4°C gekühlt. Es entstand ein weißer Niederschlag bestehend aus dem Produkt und nicht aktiviertem PEG und eine gelbliche zweite Phase bestehend aus überschüssigem Edukt. Zur Aufreinigung wurde der Niederschlag abfiltriert, getrocknet und anschließend in 10 mL wasserfreiem Acetonitril resolviert. Zu dieser Lösung wurden 200 mL wasserfreier Diethylether gegeben und auf 4°C gekühlt. Der hierbei entstandene Niederschlag wurde erneut abfiltriert und getrocknet. Dieser Schritt wurde insgesamt viermal wiederholt, bis kein *p*-Nitrophenylchloroformat mehr nachgewiesen werden konnte. Anschließend wurden Proben entnommen und mittels ¹H-NMR analysiert.

¹H-NMR *p*-Nitrophenyl-mPEG-carbonat:

(CDCl₃, 200 MHz, 20 °C): δ (ppm) = 8.53-8.63 (m, 2H), 8.28-8,35 (m, 2H), 3.69 (s, 4H), 3.37 (s, 3H)

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

Die Bestimmung des Aktivierungsgrades des mPEG erfolgte über die spektralphotometrische Quantifizierung von *p*-Nitrophenol, welches bei der Esterhydrolyse aus *p*-Nitrophenyl-mPEG-carbonat freigesetzt wird. Hierbei wurden 0,16 g aktiviertes mPEG pro Liter destilliertes Wasser gelöst. Die Hydrolyse wurde durch die Zugabe von 1 M NaOH ($1,2 \mu\text{L mL}^{-1}$) initiiert, wobei die Carbonatgruppen der aktivierten mPEG durch NaOH hydrolysiert und dabei neben mPEG *p*-Nitrophenol und Kohlendioxid freigesetzt werden. Die Lösung wurde für 40 Minuten unter leichtem Rühren bei RT vermischt und die Freisetzung des *p*-Nitrophenols anschließend spektralphotometrisch bei 400 nm gemessen. Die Konzentration des *p*-Nitrophenols wurde dann mittels einer entsprechenden Kalibrierung (0 - 0,1725 mM) berechnet.

2.7.3 Modifizierung des Enzyms

Für die Modifizierung der SH wurde zunächst eine Enzymlösung (1 mg mL^{-1}) in 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) hergestellt. Zu dieser Lösung wurde aktiviertes mPEG₂₀₀₀ bzw. mPEG₅₀₀₀ in molaren Überschüssen von 500- und 1000-fach gegeben. Die Modifizierung erfolgte bei 4 °C unter Rühren für 1 Stunde. Im Anschluss wurde die Lösung dann mittels Ultrazentrifugation über Zentrifugenfilter mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (8 Zentrifugationsschritte) aufgereinigt [Hernáiz *et al.*, 1997]. Die Filter dienen dabei der Entfernung von freigesetztem *p*-Nitrophenol und nicht reagiertem mPEG, während modifiziertes Enzym im Retentat zurückgehalten werden. Im Anschluss wurde das modifizierte Enzym mittels SDS-PAGE und des Standardaktivitätstests analysiert und bei 4 °C gelagert.

2.7.4 Charakterisierung des modifizierten Enzyms

Die Untersuchung der Aktivität und Stabilität der modifizierten SH erfolgte anhand des Standardaktivitätstests (Kapitel 2.5.1). Die Enzymaktivität und -stabilität wurde zunächst in rein wässrigen Medien (0,05 M Tris/HCl-Puffer) bei optimalen Reaktionsbedingungen (35 °C und pH 8,0) sowohl unter mechanischer Beanspruchung in Form eines Magnetrührers (400 Upm) als auch ohne analysiert. Im Anschluss wurde die Aktivität und Stabilität des modifizierten Enzyms in Gegenwart von wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln und ILs ebenfalls bei

35 °C und pH 8,0 untersucht. Hierbei handelte es sich zum einen um DMF, DMSO und Iso-propanol, die dem Reaktions- bzw. Inkubationsansatz zu einem Anteil von jeweils 10 % (v/v) zugesetzt wurden, und zum anderen um [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄], die den Ansätzen zu einem Anteil von 2,5 und 5 % (v/v) zugesetzt wurden. Es erfolgten stets Dreifachbestimmungen der Aktivität und Stabilität des modifizierten Enzyms zur statistischen Sicherung der Ergebnisse. Die erhaltenen Resultate wurden direkt mit dem nativen Enzym verglichen.

2.8 Immobilisierung der SH

2.8.1 Adsorptive Immobilisierung der SH

Die adsorptive Immobilisierung der SH wurde auf verschiedenen Träger getestet. Dazu wurden zunächst Lösungen, die jeweils 0,1 mg SH und 0,2 g des jeweiligen Trägers enthielten, hergestellt. Bei dem verwendeten Puffer handelte es sich um 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0). Die Immobilisierung erfolgte bei 4 °C in einem Überkopfschüttler über eine Zeitdauer von 1 Stunde. Im Anschluss wurden die Immobilisate mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) gewaschen und bei 4 °C gelagert. Nach Auswahl eines geeigneten Trägers, der zum einen zu einer maximalen Restaktivität des Enzyms als auch zu einer maximalen trägergebundenen Proteinmenge führte, erfolgte die Optimierung der Immobilisierungsmethode. Dazu wurde das Immobilisat sowohl hinsichtlich seiner Aktivität als auch der trägergebundenen Proteinmenge bei verschiedenen pH-Werten (7,0 und 8,0) während der Immobilisierung, bei verschiedenen Enzym-Träger-Verhältnissen (1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000) und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des Enzyms (1 und 2 h) analysiert. Zur statistischen Sicherung der Ergebnisse wurden die Enzymaktivität sowie die trägergebundene Proteinmenge stets dreifach bestimmt.

2.8.2 Kovalente Immobilisierung der SH

Für die kovalente Immobilisierung der SH wurde eine Anzahl verschiedener Träger getestet. Im ersten Schritt erfolgte die Aktivierung des jeweiligen Trägers, indem jeweils 0,2 g Träger mit 2,5 % (v/v) Glutardialdehyd über eine Zeitdauer von 1 Stunde bei RT in einem Überkopfschüttler inkubiert wurden. Im Anschluss wurde der jeweilige Träger mit destilliertem Wasser

gewaschen und zu 1 mL 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), der 0,1 mg SH enthielt, gegeben. Die Immobilisierung erfolgte für 1 Stunde bei RT im Überkopfschüttler. Im Anschluss wurden die Immobilisate mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) gewaschen und bei 4 °C gelagert. Zur Optimierung der Immobilisierungsmethode wurden der pH-Wert während der Immobilisierung (7,0 und 8,0), die Glutardialdehydkonzentration (0,5, 1, 2,5, 5 % (v/v)), die Inkubationszeit der Träger mit Glutardialdehyd (0,5, 1 und 2 h), die Inkubationszeit des Enzyms (0,25, 0,5, 1 und 2 h) sowie das Enzym-Träger-Verhältnis (1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000) variiert. Dabei wurden die jeweiligen Immobilisate hinsichtlich ihrer Aktivität und der trägergebundenen Proteinmenge analysiert. Auch bei diesen Untersuchungen erfolgte eine Dreifachbestimmung der Enzymaktivität und der trägergebundenen Proteinmenge zur statistischen Sicherung der Ergebnisse.

2.8.3 Immobilisierung der chemisch modifizierten SH

Für die adsorptive sowie kovalente Immobilisierung der chemisch modifizierten SH erfolgte zunächst die Modifizierung des Enzyms mit mPEG₅₀₀₀ unter optimierten Bedingungen (Kapitel 2.7.3). Für die anschließende Immobilisierung des modifizierten Enzyms wurden ebenfalls die in Kapitel 2.8.1 und 2.8.2 für das unmodifizierte Enzym ermittelten, optimalen Bedingungen gewählt.

2.8.4 Bestimmung der Aktivität der Immobilisate

Die Aktivität der Immobilisate wurde über die wasserstoffabhängige Bildung von NADH ermittelt. Das Reaktionsvolumen betrug 2,5 mL und setzte sich genauso wie bei der Aktivitätsbestimmung des nativen Enzyms zusammen (Kapitel 2.5.1). Die Reaktionslösung und 0,2 g Immobilisat wurden in ein 5 mL-Vial überführt, mit einem gasdichten Septum versehen und mit Wasserstoff gesättigt. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von NAD⁺ gestartet, wobei die Lösung während der Reaktion kontinuierlich mittels eines Magnetrührers (400 Upm) durchmischt wurde. Die Zunahme der Absorption wurde über eine Zeitdauer von 3 Minuten durch regelmäßige Probeentnahme verfolgt. Zur Vermeidung einer Aufkonzentrierung der Reaktionslösung wurden die Proben nach Messung der Absorption zur Reaktion zurückgegeben. Die Reaktionstemperatur betrug, wenn nicht anders definiert, RT. Die Berechnung der Aktivität der Immobilisate erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 bereits beschrieben wurde.

2.8.5 Bestimmung der Stabilität der Immobilisate

Die Untersuchung der Stabilität der Immobilisate erfolgte wie bei der nativen SH über die Ermittlung der Halbwertszeit (Kapitel 2.5.3). Dazu wurden 0,2 g Immobilisat unter definierten Bedingungen über eine definierte Zeitdauer inkubiert und im Anschluss daran die Restaktivität anhand des Aktivitätstest (Kapitel 2.8.4) bestimmt. Die Inkubation der Immobilisate fand bei allen Messungen unter aeroben Bedingungen statt.

2.8.6 Bestimmung der Rezyklierbarkeit der Immobilisate

Die Untersuchung der Rezyklierung der Immobilisate wurde anhand der Wiederholung der Reduktion von NAD^+ über 3 Minuten durchgeführt (Kapitel 2.8.4). Dazu wurden die Immobilisate nach jeder Reaktion mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer gewaschen und bei einer erneuten Reaktion eingesetzt. Die Reaktionstemperatur betrug dabei 35 °C. Zur statistischen Sicherung der Ergebnisse erfolgte eine Dreifachbestimmung der Rezyklierung der Immobilisate.

2.8.7 Charakterisierung der Immobilisate

Die Untersuchung der Aktivität und Stabilität der Immobilisate erfolgte anhand des beschriebenen Aktivitätstests (Kapitel 2.8.3). Die Aktivität und Stabilität des immobilisierten Enzyms wurde zunächst in rein wässrigen Medien (0,05 M Tris/HCl-Puffer) bei optimalen Reaktionsbedingungen (35 °C und pH 8,0) sowohl unter mechanischer Beanspruchung der Immobilisate in Form eines Magnetrührers (400 Upm) als auch ohne analysiert. Anschließend wurde die Aktivität und Stabilität des Immobilisats in Gegenwart von wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln und ILs ebenfalls bei 35 °C und pH 8,0 untersucht. Hierbei handelte es sich zum einen um DMF, DMSO und Isopropanol, die dem Reaktions- bzw. Inkubationsansatz zu einem Anteil von jeweils 10 % (v/v) zugesetzt wurden, und zum anderen um [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄], die den Ansätzen zu einem Anteil von 2,5 und 5 % (v/v) zugesetzt wurden. Zudem wurde auch das Ausbluten des Enzyms aus der Matrix in den verschiedenen Systemen untersucht. Zur statistischen Sicherung der Ergebnisse erfolgte eine Dreifachbestimmung der Aktivität und der Stabilität der Enzymimmobilisate. Alle Ergebnisse wurden direkt mit dem nativen Enzym verglichen.

2.9 Reduktive Cofaktorregenerierung

Zur Untersuchung des Einsatzes der SH bei der reduktiven Cofaktorregenerierung diente die CPCR-katalysierte Reduktion von Acetophenon zu (*S*)-1-Phenylethanol unter Verbrauch des Cofaktors NADH als Modellreaktion. Zudem erfolgten Vergleichsmessungen mit der FDH. Das Reaktionsvolumen betrug stets 3 mL, wobei sich die Ansätze wie folgt zusammensetzten.

Tabelle 2.3 Zusammensetzung der Reaktionsansätze bei der SH- bzw. FDH-katalysierten Cofaktorregenerierung.

	SH	FDH
CPCR	0,35 U mL ⁻¹	0,35 U mL ⁻¹
Acetophenon	45 mM	45 mM
NADH	1 mM (als Kaliumsalz)	1 mM (als Natriumsalz)
DTT	1 mM	1 mM
Natriumformiat	-	100 mM

Die Reaktionslösungen wurden in 5 mL-Vials überführt, wobei dieses im Fall der SH mit einem gasdichten Septum verschlossen wurde. Zur Pufferung des Reaktionssystems diente 0,1 M TEA/HCl-Puffer (pH 7,5). Bei den eingesetzten SH- bzw. FDH-Konzentrationen handelte es sich um jeweils 1, 2 und 4 U mL⁻¹. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe der CPCR und wurde bei 30 °C über eine Zeitdauer von 4 Stunden verfolgt, wobei die Reaktionslösung kontinuierlich mittels eines Magnetrührers (400 Upm) durchmischt wurde und im Fall der SH-katalysierten Cofaktorregenerierung zusätzlich eine kontinuierliche Begasung mit Wasserstoff erfolgte. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden dem Reaktionsansatz Proben entnommen und im Verhältnis 1:6 mit Ethylacetat versetzt, wodurch Acetophenon und 1-Phenylethanol extrahiert wurden und deren Konzentration anschließend mittels eines Gaschromatographen (GC) der Firma Shimadzu ermittelt werden konnte. Die Detektion erfolgte dabei über einen Flammenionisationsdetektor. Als Säule wurde eine apolare Säule (BPX-5) der Firma SGE verwendet. Weitere Einzelheiten der GC-Methode sind Tabelle 2.4 zu entnehmen. Zur statistischen Sicherung der Ergebnisse erfolgte bei allen Messungen des Reaktionsumsatzes über die Zeit eine Dreifachbestimmung.

Tabelle 2.4 Gaschromatographische Analyse von Acetophenon und 1-Phenylethanol.

Trärgas	Stickstoff (70 kPa)
Split	50 mL min ⁻¹
Injektionsvolumen	2 µL
Injektor/Detektor	230 °C/ 290 °C
Temperatur	80 °C
	98 °C (2 °C/ min)
	200 °C (20 °C/ min)
Retentionszeiten	Acetophenon 10,7 min
	1-Phenylethanol 10,4 min

Aus den bestimmten Acetophenon- und 1-Phenylethanolkonzentrationen wurden die Umsätze ermittelt sowie die Umsatzzahl, die *total turnover number* (TTN), die sich nach Gleichung 2.4 berechnen lässt und als Maß für die Effizienz eines Katalysators gilt.

$$TTN = \frac{n_{\text{Produkt}}}{n_{\text{Enzym}}} \quad \text{Gleichung 2.4}$$

wobei *TTN* der Umsatzzahl [-], n_{Produkt} der Stoffmenge des gebildeten Produktes [mol] und n_{Enzym} der Stoffmenge des eingesetzten Enzyms [mol] entspricht.

2.9.1 Einsatz der chemisch modifizierten SH

Die Untersuchung des Einsatzes der chemisch modifizierten SH erfolgte bei einer Acetophenonkonzentration und NADH-Konzentration von 45 mM bzw. 1 mM unter Zusatz von 1 mM DTT (Kapitel 2.9). Die CPCP-Aktivität betrug wie beim Einsatz der nativen SH 0,35 U mL⁻¹. Die native SH wurde unter optimierten Bedingungen mit mPEG₅₀₀₀ modifiziert und anschließend mit einer Aktivität von 4 U mL⁻¹ eingesetzt. Die Bestimmung der Reaktionsumsätze erfolgte wie in Kapitel 2.9 bereits beschrieben wurde.

2.9.2 Einsatz der immobilisierten SH

Die Untersuchung des Einsatzes der adsorptiv und kovalent immobilisierten SH erfolgte unter den in Kapitel 2.9 und 2.9.2 beschriebenen Bedingungen, wobei die Immobilisierung unter den jeweils optimierten Bedingungen stattfand. Die Aktivität der eingesetzten Immobilisate betrug 4 U mL^{-1} .

Rezyklierung der Immobilisate

Zur Untersuchung der Rezyklierbarkeit wurden die in Kapitel 2.9.3 verwendeten Immobilisate nach Beendigung einer Reaktion gewaschen und bei einer weiteren CPCR-katalysierten Reduktion von Acetophenon eingesetzt. Dabei erfolgte die Bestimmung der Reaktionsumsätze bei beiden Reaktionen über eine Zeit von 4 Stunden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der Aktivität und Stabilität der SH in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflüssen

Die industrielle Nutzung eines Biokatalysators setzt die hinreichende Kenntnis prozessrelevanter Parameter und deren Einfluss auf die Enzymaktivität und -stabilität voraus, da dadurch erst eine Anpassung des technischen Verfahrens erfolgen kann. Zu diesen technisch entscheidenden Faktoren zählen unter anderem die Temperatur, der pH-Wert, die Anwesenheit verschiedener Salze, die Zugabe von Lösungsvermittlern und Additiven sowie die mechanische Beanspruchung. Deren Einfluss auf die Aktivität und Lagerungsstabilität der rekombinanten SH wurde erstmalig im Rahmen dieser Arbeit systematisch untersucht, da bislang nur Literaturdaten für die aus dem Wildtyp isolierte SH existieren. Die Einflussgrößen wurden dabei anfangs isoliert voneinander betrachtet und nacheinander variiert. Die Charakterisierung der SH-Aktivität und -Stabilität erfolgte stets bei optimalen Temperatur- und pH-Bedingungen, die zu Beginn der Untersuchungen bestimmt wurden. Anschließend wurden die Wechselwirkungen zwischen der Temperatur und dem pH-Wert, bezogen auf die SH-Aktivität und -Stabilität, mittels *design of experiments* (DOE) analysiert und die optimalen Reaktionsbedingungen für eine Balance zwischen diesen beiden Größen ermittelt. Anhand der Ergebnisse der Enzymcharakterisierung erfolgte schließlich eine Bewertung der SH hinsichtlich ihres technischen Einsatzes bei der Regenerierung des Cofaktors NADH.

3.1.1 Abhängigkeit der Aktivität der SH von verschiedenen isolierten Einflüssen

Temperatureinfluss

Die Bestimmung des Temperaturoptimums der SH erfolgte in einem Bereich zwischen 25 und 45 °C bei pH 8,0. Dabei wurde ein Aktivitätsmaximum von 30,2 ($\pm 1,0$) U mg⁻¹ bei 35 °C ermittelt (Abbildung 3.1). Da keine Aktivitätsbestimmung zwischen den untersuchten Temperaturen stattfand, könnte das tatsächliche Temperaturmaximum wenige Grad über oder unter dem ermittelten liegen. Das bei diesen Untersuchungen erhaltene Temperaturoptimum befindet sich in Übereinstimmung mit Literaturdaten des SH-Wildtyps, die ein Aktivitätsmaximum zwischen 33 und 36 °C angeben [Schneider und Schlegel, 1976, Pfitzner *et al.*, 1970].

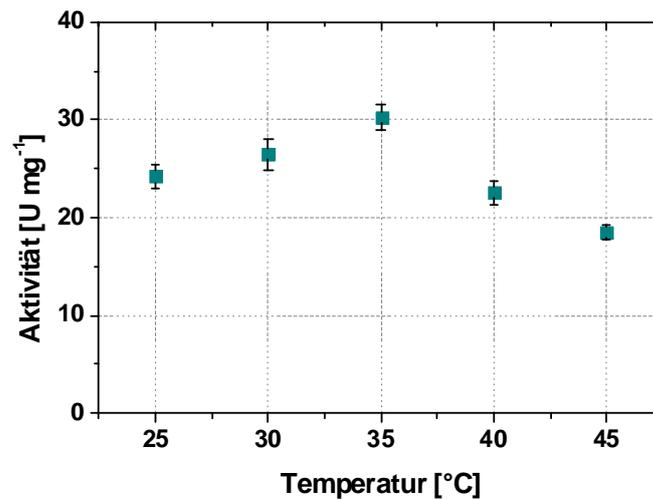


Abbildung 3.1 Abhängigkeit der SH-Aktivität von der Temperatur. [Temperatur wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 1 mM NAD⁺, 1 μM FMN]

pH-Einfluss

Die Untersuchung des pH-Optimums der SH erfolgte in einem Bereich zwischen 7,0 und 9,0 unter Verwendung eines 0,05 M Tris/HCl-Puffer. Die Reaktionstemperatur entsprach dabei stets dem ermittelten Temperaturoptimum von 35 °C. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.2 gezeigt.

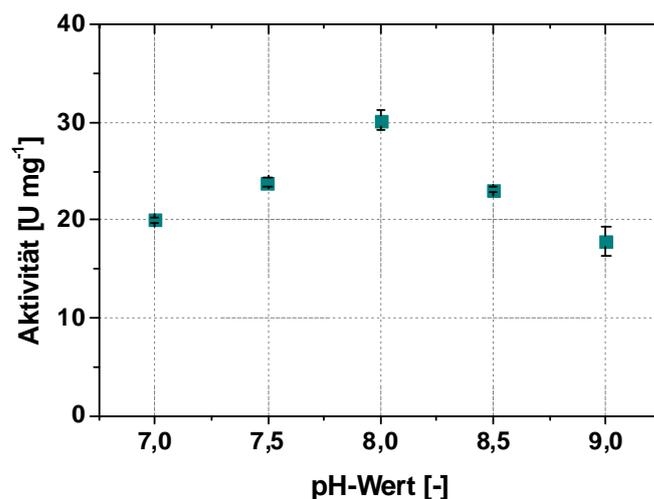


Abbildung 3.2 Abhängigkeit der SH-Aktivität vom pH-Wert. [pH-Wert wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer, 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 μM FMN]

Demnach besitzt die SH ihr Aktivitätsmaximum bei pH 8,0, wohingegen sie bei pH 7,5 und 8,5 bereits 21 bzw. 24 % ihrer maximalen Aktivität verliert. Das hierbei ermittelte pH-Optimum korreliert mit Literaturdaten, die ebenfalls ein pH-Optimum von 8,0 wiedergeben [Schneider und Schlegel, 1976, Pfitzner *et al.*, 1970]. Aufgrund der geringen Pufferkapazität von Tris/HCl außerhalb der betrachteten pH-Region wurde auf eine Untersuchung in diesem Bereich verzichtet. Basierend auf den Ergebnissen des Temperatur- und pH-Optimums der SH erfolgten alle weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung der Aktivität und Stabilität der SH bei den ermittelten optimalen Bedingungen.

Einfluss verschiedener Salze

Die Untersuchung der SH-Aktivität in Abhängigkeit von Salzionen erfolgte durch die Zugabe von verschiedenen, in technischen Anwendungen häufig verwendeten Salzen zum Reaktionsansatz. Hierbei handelte es sich um NaCl, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, KCl, K₂SO₄, K₂HPO₄, (NH₄)Cl, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄. In Gegenwart von Natriumionen konnte eine deutliche Abnahme der SH-Aktivität um etwa 70 % beobachtet werden (Abbildung 3.3). Die gleiche Entdeckung machten bereits Schneider und Schlegel und Keefe *et al.*, wobei letztere von einer Inhibierung der SH infolge der Zugabe von Natriumionen ausgingen [Keefe *et al.*, 1995, Schneider und Schlegel, 1976].

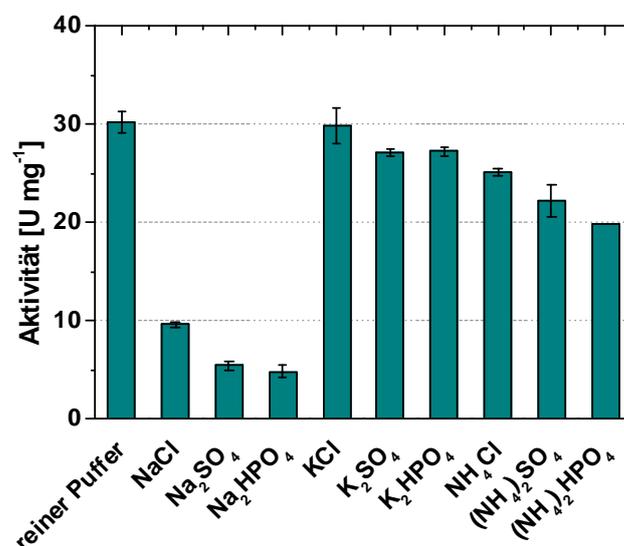


Abbildung 3.3 Einfluss verschiedener Salze auf die SH-Aktivität. [0,1 M Salzkonzentration, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 µM FMN]

Des Weiteren führte die Gegenwart von Ammoniumionen zu einer Abnahme der Enzymaktivität um bis zu 30 %, was ebenso von Keefe *et al.* zuvor beschrieben wurde [Keefe *et al.*, 1995]. Salze, die Sulfat- oder Phosphationen beinhalteten, verringerten die SH-Aktivität ebenfalls um bis zu 10 %. Keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hatten dagegen Kalium- und Chloridionen. Basierend auf diesen Resultaten sollte in technischen Anwendungen der SH ein Einsatz von Natriumsalzen vermieden werden und ein Austausch gegen Kaliumsalze erfolgen.

Einfluss von wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln

Für die Bestimmung der Aktivität der SH in Gegenwart von wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln wurden drei häufig in enzymkatalysierten Reaktionen eingesetzte Lösungsmittel ausgewählt, bei denen es sich um DMF (logP -1,0), DMSO (logP -1,3) und Isopropanol (logP 0,3) handelte [Azevedo *et al.*, 2001, Guagliardi *et al.*, 1989]. Diese wurden in Konzentrationen von 10 und 25 % (v/v) zum Reaktionsansatz gegeben, wie es in einer Vielzahl von Oxidoreduktase-katalysierten Reaktionen üblich ist, um eine Erhöhung der Substrat- bzw. Produktlöslichkeit zu erzielen [Vermue und Tramper, 1995, Vazquez-Duhalt *et al.*, 1993, Mozhaev *et al.*, 1989]. Dabei zeigten alle drei Lösungsmittel einen ausgeprägten inaktivierenden Einfluss auf die SH, wie in Abbildung 3.4 dargestellt ist.

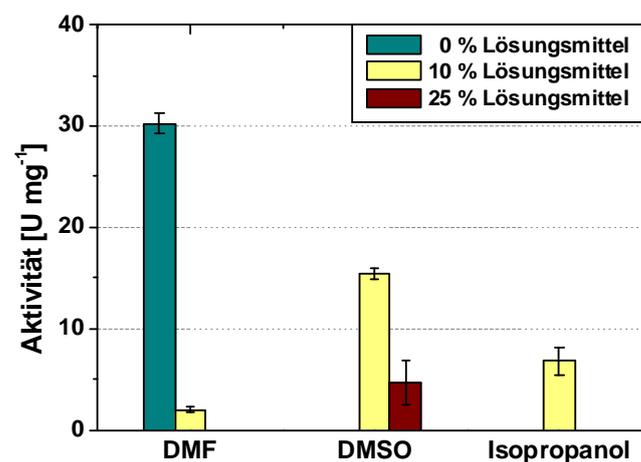


Abbildung 3.4 Einfluss von 10 und 25 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol auf die SH-Aktivität. [Lösungsmittelkonzentration wie angegeben, 0,05 M Tris/ HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 µM FMN]

Bezogen auf die Aktivität der SH, die ohne den Einsatz eines Cosolvents in reinem Tris/HCl-Puffer ermittelt wurde, war bei einer Lösungsmittelkonzentration von 25 % (v/v) nur noch in DMSO eine Enzymaktivität von $4,7 (\pm 2,2) \text{ U mg}^{-1}$ messbar, was einer Restaktivität von 15 % entspricht. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis war bei einer Lösungsmittelkonzentration von 10 % (v/v) ebenfalls im Fall von DMSO die höchste SH-Aktivität von $15,4 (\pm 0,5) \text{ U mg}^{-1}$ zu beobachten, was etwa der Hälfte der Enzymaktivität in reinem Puffer entspricht. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von DMF zur stärksten Inaktivierung der SH, wobei lediglich 7 % der ursprünglichen Enzymaktivität noch bestimmt werden konnten. Die Zugabe von 10 % (v/v) Isopropanol führte ebenfalls zu einem ausgeprägten Aktivitätsverlust um etwa 78 %, wobei eine Aktivität von $6,8 (\pm 1,3) \text{ U mg}^{-1}$ gemessen wurde.

Die Inaktivierung von Enzymen in Gegenwart organischer Lösungsmittel ist allgemein bekannt [Schmid *et al.*, 2001]. Die dabei auftretenden Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und dem zugesetzten organischen Lösungsmittel sind vielfältig. So können wasserlösliche Lösungsmittel Wassermoleküle von der Proteinoberfläche sowie aus dem katalytischen Zentrum des Enzyms verdrängen, was die thermodynamische Stabilisierung der Tertiärstruktur beeinflusst. In der Folge kann dies zu einer Inaktivierung aufgrund der Konformationsänderung führen [Pazhang *et al.*, 2006, Ogino und Ishikawa, 2001].

Dass Enzyme in Gegenwart von DMSO stabilisiert werden bzw. ein abweichendes Verhalten verglichen mit dem in anderen wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln zeigen, wurde bereits für eine Vielzahl von Enzymen beschrieben [Pazhang *et al.*, 2006, Azevedo *et al.*, 2001]. Hierbei wurde von einem geringeren inhibierenden Potential von DMSO in Kombination mit Enzymen ausgegangen. Dieses wurde auf spezielle Interaktionen zwischen DMSO und den proteinogenen Aminosäuren zurückgeführt, was in der Folge eine Konformationsänderung des Enzyms hervorruft und so zu dessen erhöhter Flexibilität führt, die wiederum eine erhöhte Aktivität bzw. einen geringeren Aktivitätsverlust in DMSO verursacht [Pazhang *et al.*, 2006]. Aufgrund unzureichender Strukturinformationen der SH bleiben genauere Aussagen über mögliche Ursachen für die beobachteten geringen Aktivitäten in den untersuchten Lösungsmitteln jedoch offen. Des Weiteren existieren keine Vergleichsdaten für die Aktivität der SH in den analysierten Lösungsmitteln, da entsprechende Untersuchungen der SH bislang nicht vorgenommen wurden.

Einfluss von wasserunlöslichen organischen Lösungsmitteln

Zur Bestimmung des Einflusses von wasserunlöslichen organischen Lösungsmitteln auf die Aktivität der SH wurden MTBE (logP 1,0), Toluol (logP 2,5) und n-Heptan (logP 4,0) ausgewählt, wobei diese funktionelle Unterschiede aufweisen sowie verschiedene Wasserlöslichkeiten besitzen (Wasserlöslichkeiten: MTBE 42 g L^{-1} , Toluol $0,5 \text{ g L}^{-1}$, n-Heptan $0,1 \text{ g L}^{-1}$). Die Untersuchungen berücksichtigten dabei einzig den Einfluss der molekularen Toxizität des jeweiligen Lösungsmittels, nicht aber die Grenzflächentoxizität. Dazu genügte die alleinige Sättigung des Puffers mit dem Lösungsmittel, wodurch ein monophasiges Reaktionssystem erhalten blieb. Die SH zeigte in jedem der drei untersuchten Lösungsmittel eine Verringerung ihrer maximalen, in reinem Puffer gemessenen Aktivität (Abbildung 3.5). Am deutlichsten war dieser Effekt bei der Sättigung des verwendeten Puffers mit Toluol zu sehen. Hierbei verlor die SH 45 % ihrer ursprünglichen Aktivität. In MTBE und n-Heptan hingegen betrug der Aktivitätsverlust 19 bzw. 22 %.

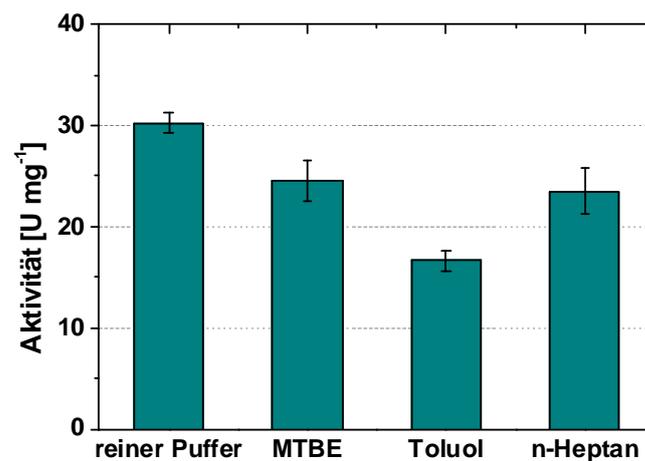


Abbildung 3.5 Einfluss von MTBE, Toluol und n-Heptan auf die SH-Aktivität. [Sättigung des Puffers mit Lösungsmittel, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 μM FMN]

Aufgrund dieser Resultate lässt sich schlussfolgern, dass der deaktivierende Einfluss der untersuchten Lösungsmittel nicht auf die Stärke der Wasserlöslichkeit der gewählten Medien zurückzuführen ist. Anderenfalls hätte die Enzymaktivität von MTBE hin zu n-Heptan zunehmen müssen, da n-Heptan die geringste Wasserlöslichkeit besitzt. Vielmehr ließen sich

die erhaltenen Ergebnisse auf die Funktionalität der untersuchten Lösemittel zurückführen, wobei auch in diesem Fall keine genauen Ursachen angegeben werden können, da nur unzureichende Strukturinformationen der SH existieren. Im Weiteren kann kein Vergleich mit Literaturdaten vorgenommen werden, da entsprechende Vergleichsinformationen für die SH bislang nicht vorliegen.

Einfluss von ionischen Flüssigkeiten

Ionische Flüssigkeiten (*ionic liquids* (ILs)) sind sogenannte flüssige Salze, die genauso wie organische Lösungsmittel löslichkeitsvermittelnde Eigenschaften besitzen, weshalb sie bereits bei einer Vielzahl biokatalytischer Reaktionen zur Erhöhung der Substrat- bzw. Produktlöslichkeit Einsatz fanden [Roosen *et al.*, 2008, Van Rantwijk und Sheldon, 2007, Kragl *et al.*, 2002, Sheldon *et al.*, 2002]. Darüber hinaus gelten sie als umweltfreundliche Alternative verglichen mit den herkömmlich eingesetzten organischen Lösungsmitteln. Bei den untersuchten ILs handelte es sich um AmmoengTM 101, [BMIM][BF₄], [BMIM][OTf], [EMIM][EtSO₄], [HMIM][Cl] und [MTEOA][MeSO₄], die alle vollständig wasserlöslich sind. Die untersuchten Konzentrationen im Reaktionsansatz betragen 2,5, 5 und 10 % (v/v). Wie in Abbildung 3.6 gezeigt ist, gehen von den analysierten ILs unterschiedliche, deaktivierende Einflüsse auf die SH aus. Demnach zeigte die SH in Gegenwart von 2,5 % (v/v) [BMIM][BF₄] und [EMIM][EtSO₄] noch immer 92 bzw. 94 % ihrer maximalen, in reinem Puffer ermittelten Aktivität. In 2,5 % (v/v) AmmoengTM 101 und [HMIM][Cl] betrug die Restaktivität der SH dagegen lediglich 50 bzw. 43 % ihrer maximalen Aktivität. Eine Erhöhung der IL-Konzentration auf 5 und 10 % (v/v) führte folglich zu einer weiteren Inaktivierung der SH. So ließen sich bei Zugabe von je 10 % (v/v) [BMIM][BF₄], [BMIM][OTf] und [HMIM][Cl] nur noch Restaktivitäten von 1, 1 bzw. 0,2 % bestimmen, wohingegen die SH in Gegenwart von 10 % [MTEOA][MeSO₄] immer noch 62 % ihrer ursprünglichen Aktivität besaß.

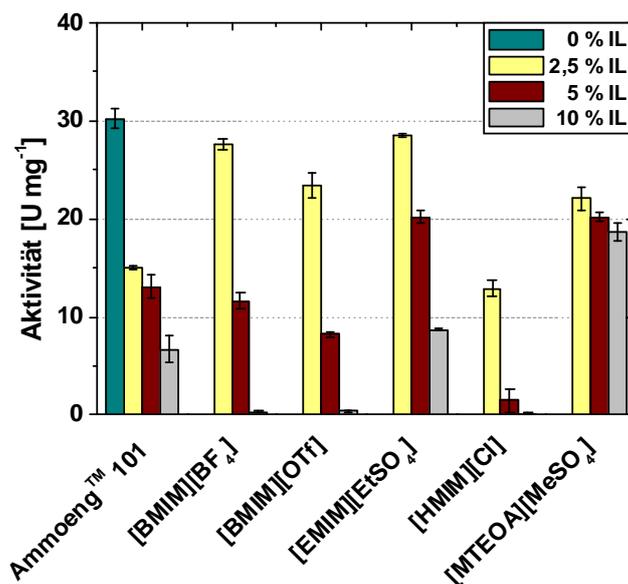


Abbildung 3.6 Einfluss von 2,5, 5 und 10 % (v/v) verschiedener ILs auf die SH-Aktivität. [IL-Konzentrationen wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 μM FMN]

Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten überein, in denen die Deaktivierung einer Vielzahl von Enzymen in Gegenwart von ILs beschrieben wurde [Nakashima *et al.*, 2006, Turner *et al.*, 2003, Sheldon *et al.*, 2002, Erbedinger *et al.*, 2000]. Dabei stellt die Polarität der ILs einen häufig diskutierten Aspekt bei deren Einfluss auf die Enzymaktivität dar. In diesem Zusammenhang werden ILs als moderat polar - analog zu kurzkettigen Alkoholen - eingeordnet [Zhao, 2010]. Des Weiteren können ILs ähnlich wie polare organische Lösungsmittel in Wechselwirkung mit der Tertiärstruktur des Enzyms treten und dadurch schließlich zu einer Konformationsänderung, die mit einer Deaktivierung des Proteins einhergeht, führen [Kragl *et al.*, 2002]. Für einen direkten Vergleich der ermittelten SH-Aktivitäten in den untersuchten ILs existieren bisher keine entsprechenden Literaturdaten.

Einfluss von Additiven

Basierend auf früheren Studien, in denen eine Aktivierung der SH in Gegenwart von Reduktionsäquivalenten beschrieben wurde, erfolgte die Untersuchung der SH-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen Additiven [Schneider und Schlegel, 1976]. Dabei galt es,

mögliche enzymaktivierende bzw. -deaktivierende Effekte dieser Reagenzien zu ermitteln. Bei den gewählten Zusätzen handelte es sich um den SH-Cofaktor FMN, Reduktionsäquivalente wie DTT, TCEP und Ascorbinsäure, sowie Glycerin und PEG₄₀₀. Die ausgewählten Additive wurden in definierten Konzentrationen zum Reaktionsansatz gegeben. Die dabei ermittelten Enzymaktivitäten sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

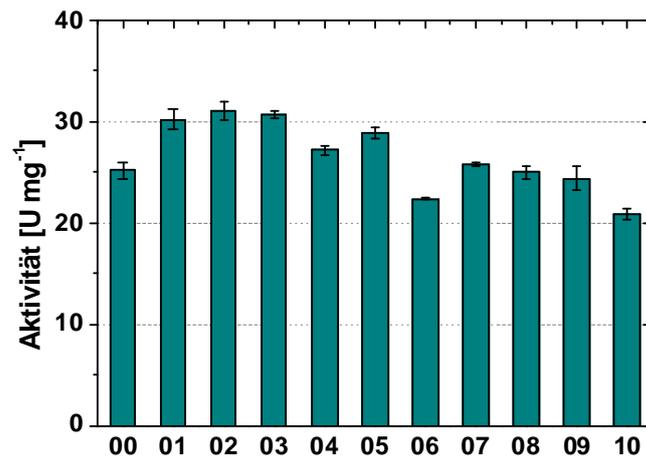


Abbildung 3.7 Einfluss von verschiedenen Additiven auf die SH-Aktivität. [00- ohne Additive, 01- 1 μM FMN, 02- 3 μM FMN, 03- 0,5 mM DTT, 04- 1 mM DTT, 05- 0,5 mM TCEP, 06- 0,2 M Ascorbinsäure, 07- 0,05 M PEG₄₀₀, 08- 0,05 M Glycerin, 09- 0,1 M Glycerin, 10- 0,25 M Glycerin; 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺]

Es zeigte sich, dass die Zugabe von 1 und 3 μM FMN zu einer Aktivierung der SH um 20 bzw. 24 % führt, wie es auch von Schneider und Schlegel in früheren Untersuchungen gezeigt wurde [Schneider und Schlegel, 1976]. Die beobachtete Enzymaktivierung durch die Zugabe von FMN ist darauf zurückzuführen, dass die SH durch NADH, das während der Reaktion entsteht, in ihren reduzierten Zustand überführt wird und dabei an der HoxY-Untereinheit nicht kovalent gebundenes FMN-a verliert. In der Folge sinkt die Aktivität der SH, da es zu einer Hinderung der Elektronenübertragung kommt [Lauterbach *et al.*, 2011, Van der Linden *et al.*, 2004b]. Somit verhindert die Zugabe von FMN diese Inaktivierung der SH infolge der Wiederherstellung der uneingeschränkten Elektronenübertragung zwischen dem Hydrogenase- und Diaphorasedimer. Die Anwesenheit von DTT führte genauso wie FMN zu einer Aktivierung der SH. In diesem Fall betrug der Aktivitätsgewinn bei einer Konzentration von

0,5 mM 22 % und bei einer Konzentration von 1 mM lediglich 8 %, was zeigt, dass die Zugabe höherer Konzentrationen von Reduktionsäquivalenten die Aktivierung der SH stören kann. DTT ist in diesem Zusammenhang für die Überführung der SH in ihren reduzierten Zustand verantwortlich, der laut Schneider und Schlegel die aktivierte Enzymform darstellt [Schneider und Schlegel, 1976]. Dem entsprechend sollte TCEP einen vergleichbaren Effekt nach sich ziehen, wie auch beobachtet wurde, da die SH in Gegenwart einer 0,5 mM Konzentration eine um 15 % erhöhte Aktivität verglichen mit der in reinem Puffer zeigte. Die Zugabe von 0,2 M Ascorbinsäure führte dagegen zu einer Abnahme der SH-Aktivität um 11 %, was nicht erwartet wurde, da dieses Reagenz ebenfalls dem Oxidationsschutz des Enzyms dient und folglich ein ähnliches Resultat wie bei der Zugabe von DTT und TCEP erwartet wurde. Dem gegenüber wurden in Anwesenheit des Polymers PEG₄₀₀ sowie unterschiedlicher Konzentrationen von Glycerin keine veränderten Enzymaktivitäten ermittelt.

3.1.2 Abhängigkeit der Stabilität der SH von verschiedenen isolierten Einflüssen

Die Untersuchung der Stabilität der SH in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflüssen erfolgte anhand der Bestimmung der Abnahme der Enzymaktivität über die Zeit bei definierten Inkubationsbedingungen. Daraus ließ sich die Halbwertszeit des Enzyms berechnen. Die Temperatur sowie der pH-Wert während der Inkubation der SH entsprachen stets dem in Kapitel 3.1.1 ermittelten Temperatur- und pH-Optimum von 35 °C und pH 8,0 unter Verwendung eines 0,05 M Tris/HCl-Puffers.

Temperaturstabilität

Die Untersuchung der Stabilität der SH in Abhängigkeit von der Temperatur erfolgte zwischen 4 und 45 °C. Hierbei zeigte sich eine hohe Temperatursensitivität des Enzyms (Abbildung 3.8). So konnte eine maximale Halbwertszeit von 48,5 (\pm 4,4) h bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C ermittelt werden. Bei ihrem Aktivitätsoptimum von 35 °C betrug die Halbwertszeit der SH dagegen nur noch 5,3 (\pm 0,7) h. Die weitere Erhöhung der Inkubationstemperatur um 10 °C auf 45 °C führte nochmals zu einem 5-fachen Stabilitätsverlust ($t_{1/2}$: 1,0 (\pm 0,1) h). Da bisher keine entsprechenden Untersuchungen der Temperaturstabilität der SH erfolgten, ist ein Vergleich mit Literaturdaten nicht möglich.

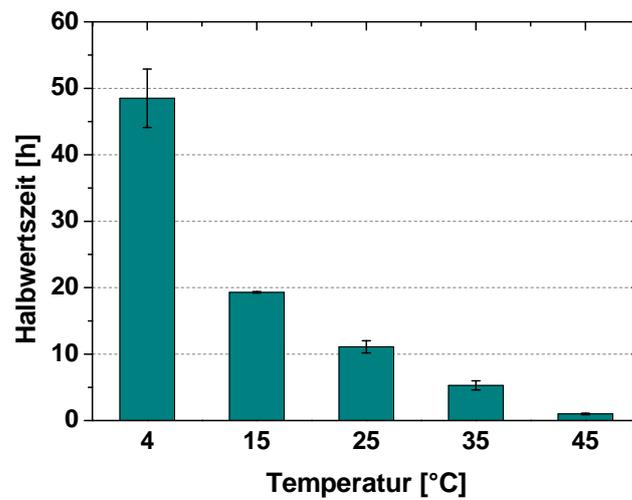


Abbildung 3.8 Abhängigkeit der Halbwertszeit der SH von der Temperatur. [Temperatur wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0)]

Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen sollte die hohe Sensitivität der SH gegenüber hohen Temperaturen bei technischen Anwendungen Berücksichtigung finden bzw. gegebenenfalls eine Anpassung des Enzyms mittels einer geeigneten Stabilisierungsmethode erfolgen.

pH-Stabilität

Die Untersuchung der pH-Stabilität der SH erfolgte in einem Bereich zwischen pH 7,0 und 9,0. Die Ergebnisse dieser Messungen ergaben eine starke Abhängigkeit der Halbwertszeit der SH vom pH-Wert (Abbildung 3.9). So führte die Verringerung des pH-Wertes von 8,0 auf 7,0 zu einer deutlichen Erhöhung der Halbwertszeit von 5,3 ($\pm 0,7$) h auf 16,1 ($\pm 0,5$) h, wohingegen das Enzym bei der Erhöhung des pH-Wertes auf 9,0 eine klare Abnahme seiner Halbwertszeit auf 0,5 ($\pm 0,0$) h zeigte. Auch für diese Ergebnisse existieren bislang noch keine entsprechenden Vergleichsdaten.

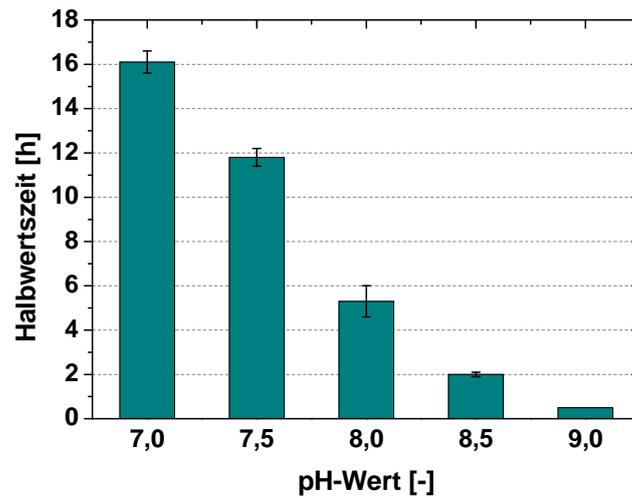


Abbildung 3.9 Abhängigkeit der Halbwertszeit der SH vom pH-Wert. [pH-Wert wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer, 35 °C]

Hinsichtlich eines technischen Einsatzes sollte demnach kein pH größer als 8,0 gewählt werden, sondern ein pH im Bereich zwischen 7,0 und 8,0. Anderenfalls sollte eine Anpassung des Enzyms durch eine geeignete Stabilisierungsstrategie erfolgen.

Salzstabilität

Die Untersuchung der SH-Stabilität in Gegenwart verschiedener Salzionen erfolgte über die Zugabe einer je 0,1 M Konzentration der folgenden Salze zum Inkubationsansatz: NaCl, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, KCl, K₂SO₄, K₂HPO₄, (NH₄)Cl, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄. Dabei zeigte sich, dass die Stabilität der SH in Anwesenheit von Phosphationen sinkt, da die Zugabe aller drei phosphathaltigen Salze zu verringerten Halbwertszeiten führte (Abbildung 3.10). Demnach betrug die Halbwertszeit der SH 3,3 (± 0,3) h in 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung, 4,5 (± 0,3) h in 0,1 M K₂HPO₄-Lösung und 3,7 (± 0,4) h in 0,1 M (NH₄)₂HPO₄-Lösung, was verglichen mit der Halbwertszeit in reinem Puffer (5,3 (± 0,7) h) einem Stabilitätsverlust um bis zu 38 % entspricht. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von Sulfatsalzen zu einer Stabilisierung des Enzyms, da die Halbwertszeit der SH 6,5 (± 0,6) h in 0,1 M K₂SO₄-Lösung und 6,9 (± 0,2) h in 0,1 M (NH₄)₂SO₄-Lösung betrug, was einer Stabilitätserhöhung um 23 bzw. 30 % entspricht. Diese Beobachtung korreliert mit früheren Untersuchungen von Schneider und Schlegel, die ebenfalls eine 25 %-ige Stabilitätserhöhung der SH in Gegenwart von

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ beschrieben [Schneider und Schlegel, 1976]. Des Weiteren wurde der stabilisierende Effekt von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auch bei einer Reihe anderer Enzyme beobachtet [Schmid, 1979].

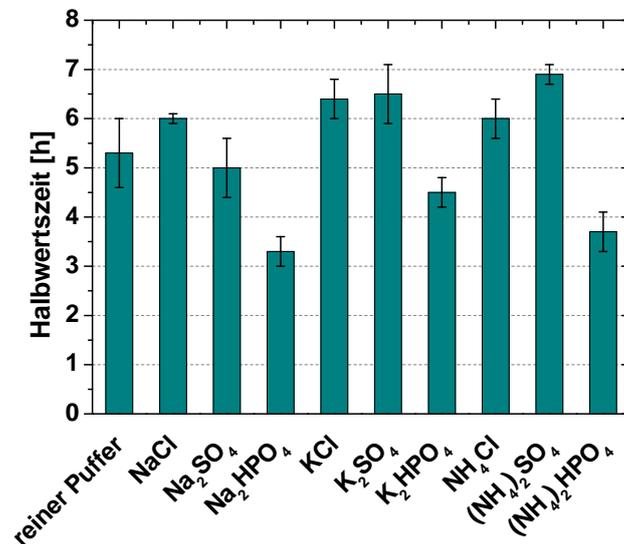


Abbildung 3.10 Einfluss verschiedener Salze auf die Halbwertszeit der SH. [0,1 M Salzkonzentration, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

Auf Basis der erhaltenen Resultate für die SH-Stabilität in Gegenwart von verschiedenen Salzen sollte bei technischen Anwendungen der SH der Zusatz von Phosphatsalzen vermieden werden, wohingegen Sulfatsalze aufgrund der beobachteten stabilisierenden Effekte bevorzugt Einsatz finden können.

Lösungsmittelstabilität (wasserlösliche Lösungsmittel)

Zur Analyse der SH-Stabilität in Gegenwart von wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln wurden je 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol zum Inkubationsansatz gegeben. Auf eine Erhöhung der Lösungsmittelkonzentration auf 25 % (v/v) wurde hierbei verzichtet, da die Untersuchung der SH-Aktivität in Gegenwart dieser Lösungsmittelkonzentration eine starke Inaktivierung der SH ergab (Kapitel 3.1.1), so dass im Vorfeld bereits von einer zu rapiden und nicht mehr erfassbaren Deaktivierung des Enzyms unter diesen Bedingungen ausgegangen werden konnte.

Die Messungen der Halbwertszeit der SH in Gegenwart der gewählten Lösungsmittel zeigten, dass jedes der drei eingesetzten Lösungsmittel zu einer rapiden Deaktivierung der SH führt (Abbildung 3.11).

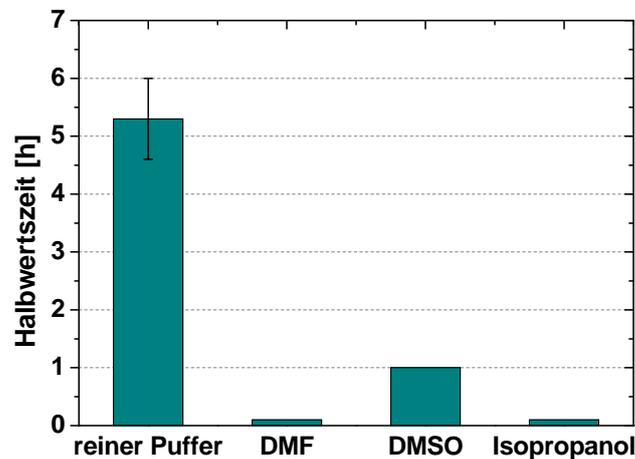


Abbildung 3.11 Einfluss von 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol auf die Halbwertszeit der SH. [Lösungsmittelkonzentration wie angegeben, 0,05 M Tris/ HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

Die höchste Halbwertszeit von 1,0 (± 0,0) h wurde dabei in DMSO ermittelt, was verglichen mit der Halbwertszeit ohne Zugabe eines Cosolvents (5,3 (± 0,7) h) einer Stabilitätsverringerung um 81 % entspricht. Die Anwesenheit von 10 % (v/v) DMF und Isopropanol führte in beiden Fällen zu einer Halbwertszeit von nur 0,1 (± 0,0) h und somit zu einer Destabilisierung der SH um 98 %. Ein Vergleich der erhaltenen Resultate mit Literaturdaten ist nicht möglich, da bisher keine entsprechenden Untersuchungen erfolgten.

Im Allgemeinen wurde die rapide Deaktivierung von Enzymen in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln bisher für eine Vielzahl von Enzymen beschrieben [Mattos und Ringe, 2001, Halling, 1990, Hahn-Hägerdal, 1986]. Als Ursache dafür gilt häufig die Entfaltung der dreidimensionalen Proteinstruktur in Folge der Veränderung der lokalen Umgebung des aktiven Zentrums des Enzyms [Knubovets *et al.*, 1999, Schiffer und Dötsch, 1996]. Im speziellen Fall der SH könnte zudem eine Aufhebung der Quartärstruktur im Zuge des Proteinzerfalls in seine einzelnen Untereinheiten die Inaktivierung des Enzyms hervorrufen. Genauere Aussa-

gen sind jedoch aufgrund der bislang unzureichenden Strukturinformationen der SH nicht zu treffen. Hinsichtlich einer technischen Anwendung der SH in wässrigen Lösungsmittelsystemen erwiesen sich die betrachteten Lösungsmittel als ungeeignet, woraus der Bedarf einer Stabilisierung des Enzyms gegenüber den beobachteten deaktivierenden Einflüssen der untersuchten Medien erwächst.

Lösungsmittelstabilität (wasserunlösliche Lösungsmittel)

Entsprechend der Aktivitätsuntersuchungen in Abhängigkeit von wasserunlöslichen organischen Lösungsmitteln (Kapitel 3.1.1) erfolgte die Analyse der SH-Stabilität ebenfalls durch die jeweilige Sättigung des verwendeten Inkubationspuffers mit MTBE, Toluol bzw. n-Heptan. Hierbei verringerte sich die Halbwertszeit der SH von 5,3 ($\pm 0,7$) h in reinem Puffer auf bis zu 0,4 ($\pm 0,0$) h in MTBE-gesättigtem Puffer, was einem Stabilitätsverlust von 92 % entspricht (Abbildung 3.12).

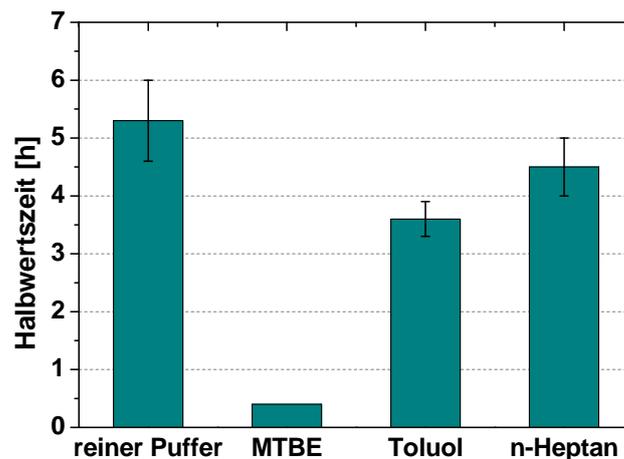


Abbildung 3.12 Einfluss von MTBE, Toluol und n-Heptan auf die Halbwertszeit der SH. [Sättigung des Puffers mit Lösungsmittel, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

In dem mit Toluol bzw. n-Heptan gesättigtem Puffer betrug die Halbwertszeit der SH dagegen 3,6 ($\pm 0,3$) bzw. sogar 4,5 ($\pm 0,5$) h, was einer Verringerung der Stabilität um nur 32 bzw. 15 % gleichkommt. Auch im Rahmen dieser Untersuchungen ist kein Vergleich mit früheren Studien möglich, da diese für die SH bislang nicht durchgeführt wurden.

Im Allgemeinen deuten die beobachteten Tendenzen für den Einfluss von wasserunlöslichen organischen Lösungsmitteln auf die Halbwertszeit der SH auf eine Abhängigkeit der Enzymstabilität von der Wasserlöslichkeit des eingesetzten Lösungsmittels hin. So handelt es sich bei MTBE um das Lösungsmittel mit der höchsten Wasserlöslichkeit (42 g L^{-1}), welches infolge des stark ausgeprägten Kontaktes mit dem Enzym zu dessen rapider Deaktivierung führt. Im Gegensatz dazu besitzt n-Heptan die geringste Wasserlöslichkeit ($0,1 \text{ g L}^{-1}$). Somit kommt es im Fall von n-Heptan zur schwächsten Wechselwirkung mit der SH, was wiederum die nur geringfügige Deaktivierung der SH in diesem Lösungsmittelsystem zur Folge hat. Basierend auf diesen Resultaten gilt es für technische Anwendungen der SH in vergleichbaren Lösungsmittelsystemen mittels einer geeigneten Stabilisierungsmethode die Stabilität der SH in diesen Medien zu erhöhen.

IL-Stabilität

Die Untersuchung der SH-Stabilität in ILs erfolgte analog zu den Aktivitätsmessungen (Kapitel 3.1.1) durch die Zugabe verschiedener Konzentrationen (2,5, 5 und 10 % (v/v)) der folgenden ILs zum Inkubationspuffer: AmmoengTM 101, [BMIM][BF₄], [BMIM][OTf], [EMIM][EtSO₄], [HMIM][Cl] und [MTEOA][MeSO₄]. Dabei zeigte die SH in allen untersuchten ILs mit Ausnahme von [MTEOA][MeSO₄] deutlich verringerte Halbwertszeiten verglichen mit der in reinem Puffer ($5,3 (\pm 0,7) \text{ h}$), wie in Abbildung 3.13 dargestellt ist. So ließ sich bei einer IL-Konzentration von 10 % (v/v) nur noch in [MTEOA][MeSO₄] eine Halbwertszeit der SH ermitteln. Diese betrug in diesem Fall $0,9 (\pm 0,2) \text{ h}$. Alle anderen untersuchten ILs führten bei dieser Konzentration zu einer vollständigen und nicht mehr messbaren Deaktivierung der SH. In Gegenwart von 5 % (v/v) der gewählten ILs zeigte die SH neben [MTEOA][MeSO₄] des Weiteren in [EMIM][EtSO₄] eine noch erfassbare Halbwertszeit, die in [MTEOA][MeSO₄] $1,8 (\pm 0,7) \text{ h}$ und in [EMIM][EtSO₄] $0,5 (\pm 0,1) \text{ h}$ betrug. Wurden 2,5 % (v/v) dieser beiden ILs zum Inkubationsansatz gegeben, besaß die SH eine Halbwertszeit von $7,1 (\pm 0,8)$ bzw. $0,9 (\pm 0,1) \text{ h}$, was im Fall von [MTEOA][MeSO₄] sogar einer erhöhten Halbwertszeit der SH verglichen mit der in reinem Puffer entspricht. Somit führten geringe Konzentrationen von [MTEOA][MeSO₄] zu einer Stabilisierung der SH. Da auch im Bereich der SH-Stabilität in ILs keine Literaturdaten vorhanden sind, kann kein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse vorgenommen werden.

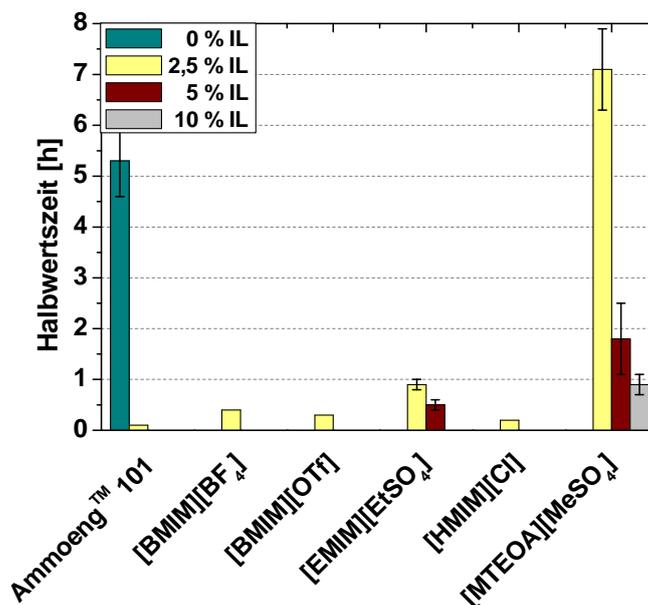


Abbildung 3.13 Einfluss von 2,5, 5 und 10 % (v/v) verschiedener ILs auf die Halbwertszeit der SH. [IL-Konzentrationen wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

Da die Untersuchung der SH-Stabilität in Abhängigkeit von Salzen einen stabilisierenden Effekt für Sulfationen ergab (Kapitel 3.1.2), könnten die erhöhten Halbwertszeiten der SH im Fall von [MTEOA][MeSO₄] und [EMIM][EtSO₄] ebenfalls auf die bei diesen ILs vorliegenden Sulfationen zurückzuführen sein. Aufgrund dessen sollten in technischen Anwendungen, in denen Löslichkeitsvermittler wie ILs benötigt werden, bevorzugt sulfatenthaltende ILs wie [MTEOA][MeSO₄] in Kombination mit der SH eingesetzt werden. Weiterhin gilt diese IL als gesundheitlich unbedenklich und umweltschonend, da sie biologisch abbaubar ist [Wasserscheid und Welton, 2008].

Stabilität in Gegenwart von Additiven

In Analogie zu den Aktivitätsuntersuchungen für die SH in Abhängigkeit von verschiedenen Additiven (Kapitel 3.1.1) erfolgte eine entsprechende Analyse der SH-Stabilität. In dieser galt es, mögliche enzymdestabilisierende bzw. -stabilisierende Effekte durch den Zusatz verschiedener Additive zu ermitteln. Dazu wurden definierte Konzentrationen der folgenden Additive zum Inkubationsansatz gegeben: FMN, Kaliumhexacyanoferrat, PEG₄₀₀ und Glycerin. Von PEG und Glycerin gingen hierbei bereits bei einer Reihe von Enzymen stabilisierende Effekte

aus [Iyer und Ananthanarayan, 2008, Schmid, 1979]. Bei Kaliumhexacyanoferrat handelt es sich dagegen um ein schwaches Oxidationsmittel, welches die SH in ihre oxidierte und nach Schneider und Schlegel stabilisierte Enzymform überführen sollte [Schneider und Schlegel, 1976].

Wie in Abbildung 3.14 dargestellt ist, zeigte die SH in Gegenwart von 1 μM FMN und 0,25 M Kaliumhexacyanoferrat eine Halbwertszeit von 4,8 ($\pm 0,2$) bzw. 1,6 ($\pm 0,1$) h, was verglichen mit ihrer Halbwertszeit ohne den Zusatz eines Additivs (5,3 ($\pm 0,7$) h) einer Stabilitätsabnahme um 9 bzw. 70 % entspricht. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von PEG₄₀₀ zu einer geringfügigen Erhöhung der Halbwertszeit um 25 % auf 6,6 ($\pm 0,9$) h. Ein ähnliches Verhalten zeigte die SH in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Glycerin, wobei bei einer Glycerinkonzentration von 0,1 M eine erhöhte Halbwertszeit von bis zu 7,4 ($\pm 0,3$) h bestimmt wurde. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit entsprechenden Literaturdaten ist an dieser Stelle nicht möglich, da entsprechende Untersuchungen bislang noch nicht durchgeführt wurden.

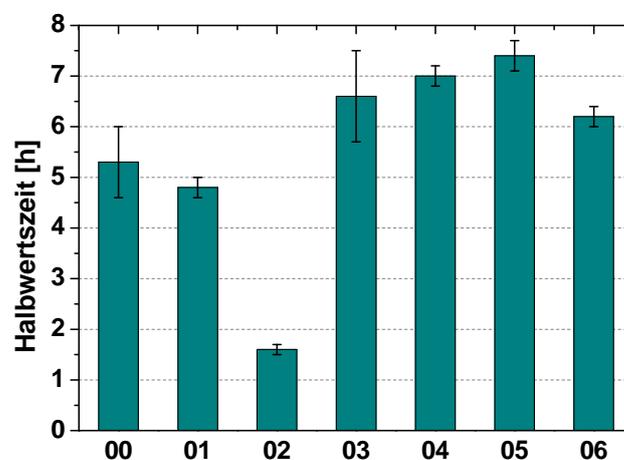


Abbildung 3.14 Einfluss von verschiedenen Additiven auf die Halbwertszeit der SH. [00- ohne Additive, 01- 1 μM FMN, 02- 0,25 M Kaliumhexacyanoferrat, 03- 0,05 M PEG₄₀₀, 04- 0,05 M Glycerin, 05- 0,1 M Glycerin, 06- 0,25 M Glycerin; 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

Basierend auf den ermittelten Ergebnissen konnte im Fall des Oxidationsmittels Kaliumhexacyanoferrat keine zusätzliche Oxidation und somit Stabilisierung der SH erzielt werden. Die Zugabe dieser oxidierenden Komponente führte vielmehr zu einer deutlichen Erhöhung der Deaktivierungsrate der SH. Möglicherweise lag die SH vor der Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat schon weitestgehend oxidiert vor, so dass dessen Gegenwart zu einer divergenten Deaktivierung der SH führte. Auch die Zugabe von FMN zeigte keinen stabilisierenden Einfluss auf die SH. Lediglich der Zusatz des Polymers PEG₄₀₀ sowie die Anwesenheit von Glycerin stabilisierten die SH, was mit Literaturdaten korreliert, in denen der stabilisierende Effekt durch die Zugabe von PEG und Glycerin für zahlreiche Enzyme beschrieben wurde [Iyer und Ananthanarayan, 2008, Schmid, 1979].

Aufgrund der gezeigten Resultate erweist sich der Zusatz von PEG-Polymeren und Glycerin in technischen Anwendungen der SH als geeignet. Auf die Zugabe von Oxidationsmittel wie Kaliumhexacyanoferrat zum Reaktionssystem sollte dagegen verzichtet werden.

Mechanische Stabilität

Da in technischen Anwendungen von Enzymen eine Durchmischung des Reaktionssystems unerlässlich ist, wurde die SH unter mechanischer Beanspruchung in Form von Scherkräften untersucht. Die Stabilitätsmessungen erfolgten zum einen unter Verwendung verschiedener Rührertypen und zum anderen bei variierenden Rührgeschwindigkeiten. Hierzu wurden ein KPG-Rührer sowie ein Magnetrührer ausgewählt und deren Einfluss auf die Halbwertszeit der SH bestimmt. Die Rührgeschwindigkeit betrug dabei zunächst 400 Upm bei beiden Rührertypen und wurde dann im Fall des Magnetrührers in einer zusätzlichen Messung auf 800 Upm erhöht. Dabei zeigte die SH eine deutlich verringerte Stabilität, wenn der Inkubationsansatz bei 400 Upm gerührt wurde (Abbildung 3.15). Die Rührerform hatte dagegen keinen Einfluss auf die SH-Stabilität, da die Halbwertszeit der SH beim Einsatz eines KPG-Rührers bei einer Rührgeschwindigkeit von 400 Upm $1,8 (\pm 0,1)$ h betrug und im Fall des Magnetrührers eine vergleichbare Halbwertszeit von $1,9 (\pm 0,1)$ h erhalten wurde. Verglichen mit der Enzymstabilität ohne eine mechanische Beanspruchung in Form von Scherkräften ($5,3 (\pm 0,7)$ h) betrug die Verringerung der Stabilität in beiden Fällen etwa 65 %. Wurde die Rührgeschwindigkeit weiter auf 800 Upm erhöht, kam es wie erwartet zu einer weiteren Abnahme der Halbwertszeit der SH auf nur $0,8 (\pm 0,1)$ h, was einem Stabilitätsverlust von insgesamt 85 %

entspricht. Auch im Bereich der SH-Stabilität in Abhängigkeit von mechanischer Beanspruchung existieren bislang noch keine Literaturdaten, die einen Vergleich der erhaltenen Ergebnisse erlauben.

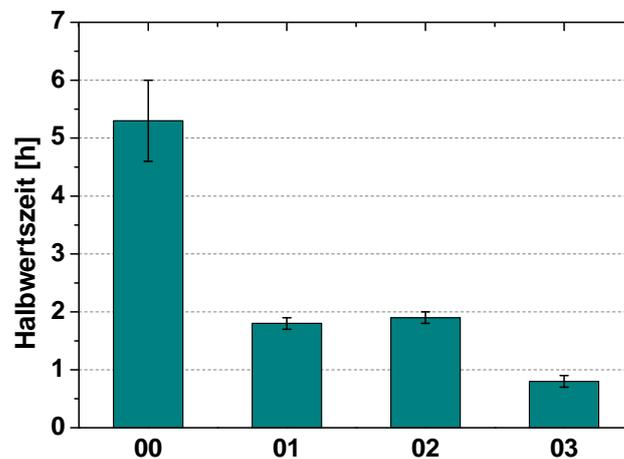


Abbildung 3.15 Einfluss von mechanischer Beanspruchung auf die Halbwertszeit der SH. [00- ohne Rühren, 01-KPG- Rührer (400 Upm), 02- Magnetrührer (400 Upm), 03- Magnetrührer (800 Upm); 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

Eine der möglichen Ursachen für den drastischen Stabilitätsverlust der SH unter Einwirkung von Scherkräften stellt der Zerfall der SH in ihre einzelnen Untereinheiten dar. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse ist eine Stabilisierung der SH gegenüber deaktivierender Einflüsse ausgehend von Scherkräften unerlässlich, insbesondere in Hinblick auf technische Anwendungen, welche eine Durchmischung des Reaktionssystems erfordern.

3.1.3 Charakterisierung der Aktivität und Stabilität der SH unter Berücksichtigung der gegenseitigen Beeinflussung von Temperatur und pH-Wert mittels Design of Experiments

Bei der klassischen Methode zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Parameter auf ein System wird lediglich ein Einflussfaktor variiert, während alle anderen Parameter konstant gehalten werden, wie auch in Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 vorgegangen wurde. Eine effiziente Alternative für diese Methode stellt das mathematische Verfahren der Versuchsplanung dar,

welches unter dem Begriff *design of experiments* (DOE) zusammengefasst wird. Dadurch ist es möglich, die gegenseitige Wechselwirkung der Einflussparameter des Systems zu untersuchen, da jegliche Parameter gleichzeitig variiert werden können. In der Folge werden zuverlässige Karten, die sogenannten *contour plots* und *surface plots*, erhalten, die die Messergebnisse präsentieren und zu einem verbesserten Verständnis des untersuchten Systems führen [Eriksson *et al.*, 2000].

Das allgemeine Vorgehen des DOEs beruht auf der Festlegung eines relevanten Standard-experiments, das den sogenannten Nullpunkt *center point* darstellt und um welchen herum in symmetrischer Weise weitere Experimente durchgeführt werden. Zudem gilt es, zu Beginn der Untersuchungen das Problem zu formulieren. Dies umfasst die Auswahl der Zielsetzung, der Einflussfaktoren und der Zielgrößen, sowie des anzuwendenden Modells und des Designs. Im letzten Schritt erhält man den entsprechenden Versuchsplan, der die Kombinationen der durchzuführenden Experimente wiedergibt. Abschließend erfolgt die Analyse der Messergebnisse mittels des DOE [Eriksson *et al.*, 2000].

Der zu Beginn festgelegte *center point* im Rahmen dieser Untersuchung stellte das in Kapitel 3.1.1 ermittelte Temperatur- und pH-Optimum der SH (35 °C, pH 8,0) dar. Bei den untersuchten Einflussfaktoren, deren gegenseitige Beeinflussung es zu analysieren galt, handelte es sich um die Temperatur und den pH-Wert, wohingegen die Enzymaktivität und die Halbwertszeit die Zielgrößen darstellten. Beim anzuwendenden Modell wurde das quadratische gewählt, so dass die Möglichkeit entstand, auch nichtlineare Zusammenhänge zu erfassen. Der nach dem *central composite design* erhaltene Versuchsplan für einen Temperaturbereich zwischen 25 und 45 °C und einem pH-Bereich zwischen 7,0 und 9,0 sowie die für die Aktivitäts- und Stabilitätsmessungen erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Hierbei bestätigte sich nochmals das in Kapitel 3.1.1 erhaltene Aktivitätsoptimums der SH, welches bei einer Reaktionstemperatur von 35 °C und einem pH-Wert von 8,0 zu finden ist. Im Gegensatz dazu zeigte die SH ihre geringste Aktivität von 134 U mL^{-1} bei 25 °C und pH 7,0. Die niedrigste Stabilität der SH wurde dagegen bei 45 °C und pH 9,0 ermittelt, wobei die Halbwertszeit der SH bei diesen Bedingungen 0,0 h betrug. Dem gegenüber zeigte die SH ihre maximale Halbwertszeit von 13,9 h innerhalb des untersuchten Messbereichs bei 20,86 °C und pH 8,0.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	Temperatur	pH	Aktivität	Halbwertszeit
2	1	N1	11	Incl	25	7	134	12,9
3	2	N2	6	Incl	45	7	152,5	1,1
4	3	N3	4	Incl	25	9	180,4	0,7
5	4	N4	7	Incl	45	9	237,4	0
6	5	N5	1	Incl	20,86	8	180,6	13,9
7	6	N6	9	Incl	49,14	8	137,1	0,3
8	7	N7	10	Incl	35	6,586	147,9	5,6
9	8	N8	5	Incl	35	9,414	253,2	0,1
10	9	N9	8	Incl	35	8	349,2	4,1
11	10	N10	3	Incl	35	8	346,6	3,9
12	11	N11	2	Incl	35	8	367,6	5,2

Abbildung 3.16 Der nach *central composite design* erhaltene Versuchsplan mit den Messergebnissen für die Aktivität [in U mL⁻¹] und Halbwertszeit [in h] der SH bei Variation des pH-Wertes [-] und der Temperatur [in °C]. [Temperatur und pH-Wert wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 1 mM NAD⁺ und 1 µM FMN bei der Reaktion]

Datenanalyse

Zur Analyse der erhaltenen Daten für die Aktivität und Stabilität der SH bei den untersuchten Faktorkombinationen sowie für die Bewertung der statistischen Berechnungen existieren verschiedene Methoden innerhalb des DOE.

Den ersten Schritt bei der Datenanalyse bildet die Bewertung der erhaltenen Daten in Form des *replicate index*. Dabei erhält man einen Überblick über die Reproduzierbarkeit der ermittelten Messergebnisse [Eriksson *et al.*, 2000]. Der mittels DOE erhaltene *replicate index* ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die gemessenen Werte sowohl für die Aktivität als auch für die Halbwertszeit der SH bei den verschiedenen Faktorkombinationen eine hohe Reproduzierbarkeit aufwiesen, da die jeweiligen Werte für den *center point* (Proben 9, 10 und 11) dicht beieinander lagen.

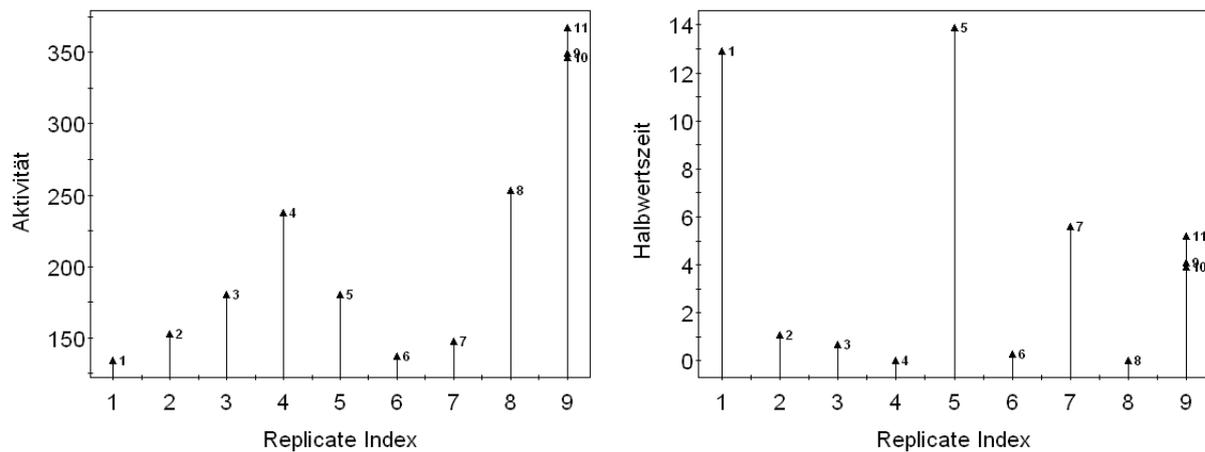


Abbildung 3.17 Der mittels DOE erhaltene *replicate index* für die Aktivität [in U mL⁻¹] und Halbwertszeit [in h] der SH.

Zudem gibt der *investigation plot* in Form eines Balkendiagramms einen zusammenfassenden Überblick über die generelle Güte der durchgeführten Experimente und zeigt wesentliche Kriterien der Anwendbarkeit des gewählten Modells auf (Abbildung 3.18). Dazu existieren vier Indikatoren, die die vier verschiedenen Balken darstellen [Eriksson *et al.*, 2000].

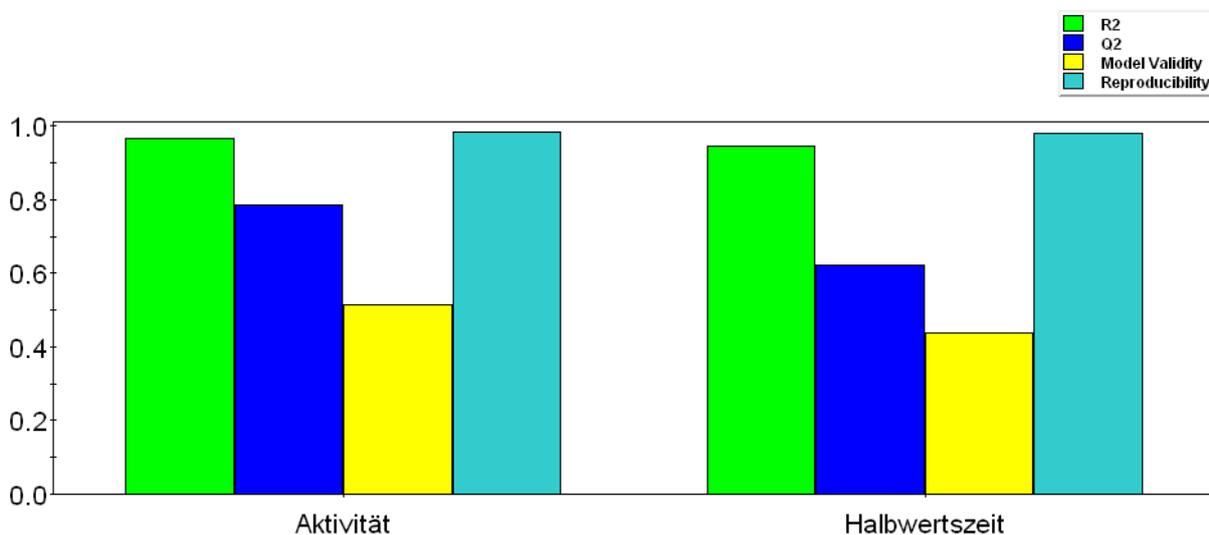


Abbildung 3.18 Der mittels DOE erhaltene *investigation plot* für die Aktivität und Halbwertszeit der SH.

R^2 (*goodness of fit*), die sogenannte Anpassungsgüte, stellt das Maß für die Anpassbarkeit des Regressionsmodells für die erhaltenen Daten dar. Dieser Wert wird in Kombination mit Q^2 (*goodness of prediction*), der Güte der Vorhersagbarkeit, betrachtet, wobei eine Aussage über

die Zuverlässigkeit des Modells hinsichtlich der Vorhersage weiterer Experimente getroffen werden soll. Die *model validity*, die Modellgültigkeit, weist das gewählte Modell als geeignet oder ungeeignet aus, wohingegen die *reproducibility*, die Reproduzierbarkeit, die Güte der experimentellen Daten zusammenfasst [Eriksson *et al.*, 2000]. Im Fall der Wahl eines zuverlässigen Modells, sollten diese Indikatoren den folgenden Referenzwerten entsprechen:

Tabelle 3.1 Referenzwerte für die vier Indikatoren des *investigation plots*.

Indikator	Referenzwert [-]
$R^2 - Q^2$	< 0,2-0,3
Q^2	> 0,5
<i>model validity</i>	> 0,25
<i>reproducibility</i>	> 0,5

Der *investigation plot* für die Aktivität der SH zeigte, dass sich die experimentellen Ergebnisse mit einem Wert nahe 1 für die *reproducibility* als sehr reproduzierbar einstufen ließen. Darüber hinaus wiesen sowohl R^2 als auch Q^2 mit einer Abweichung von 0,18 die statistische Auswertung als sehr zuverlässig aus. Auch die *model validity* lag mit einem Wert von 0,51 weit über den mindestens geforderten 0,25. Der *investigation plot* für die experimentellen Daten für die Halbwertszeit der SH wies diese ebenfalls als sehr reproduzierbar aus, da ebenso ein Wert nahe 1 für die Gesamtproduzierbarkeit erreicht wurde. Bei einem Wert von 0,45 für die *model validity* zeigte das gewählte Modell eine hohe Gültigkeit. Hinsichtlich der zugrunde liegenden statistischen Auswertungsmethode für das Untersuchungsobjekt wiesen sowohl R^2 als auch Q^2 unabhängig voneinander die Methode als aussagekräftig aus. Ihre Differenz untereinander ist jedoch 20 % höher als der geforderte maximale Abstand von 0,3.

Betrachtet man die Messergebnisse hinsichtlich möglicher Datenausreißer, so belegt der *deleted studentized residuals plot*, dass sich die Daten für die Aktivität der SH innerhalb der statistischen Bandbreite bewegen, wohingegen sich die Probe 3 bei den Daten für die Halbwertszeit der SH als Ausreißer erwies (Abbildung 3.19).

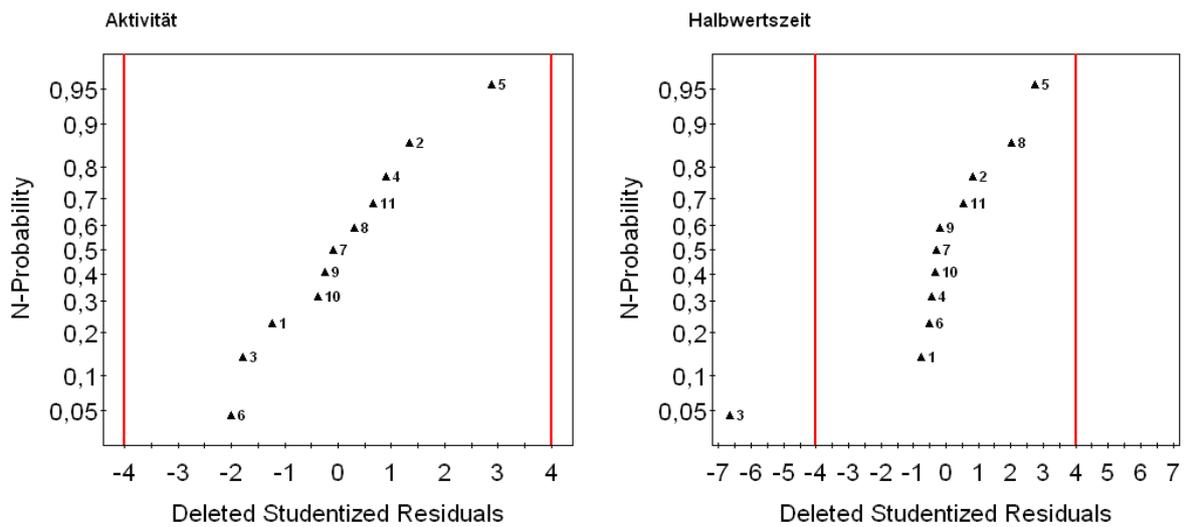


Abbildung 3.19 Der mittels DOE erhaltene *deleted studentized residuals plot* für die Aktivität und Halbwertszeit der SH.

Die Untersuchung der gegenseitigen Wechselwirkung der Einflussgrößen (Temperatur und pH-Wert) erfolgte mittels des *interaction plots*, der in Abbildung 3.20 gezeigt ist.

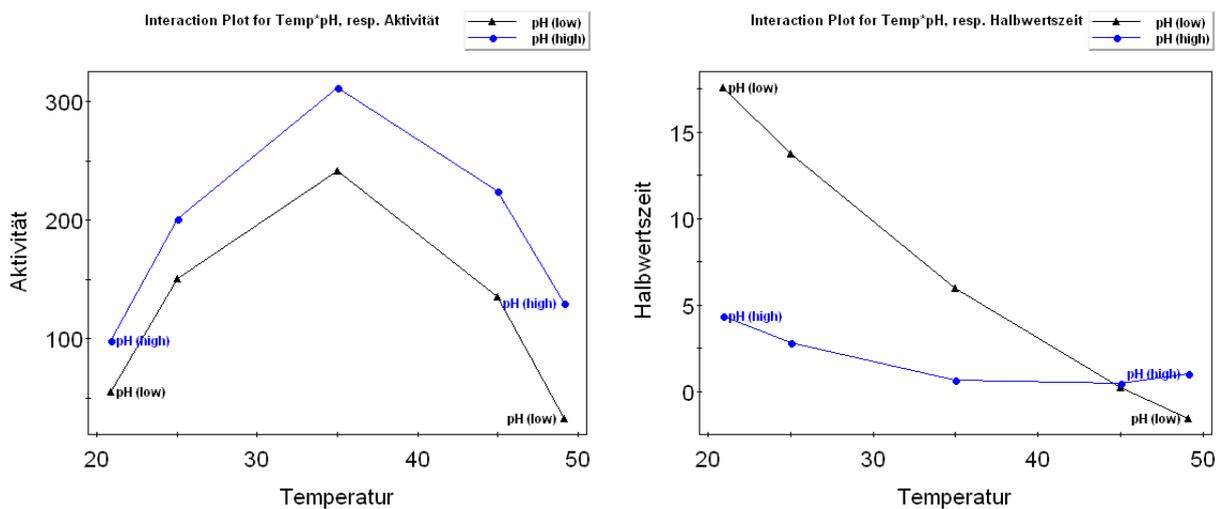


Abbildung 3.20 Der mittels DOE erhaltene *interaction plot* für die Aktivität [in U mL^{-1}] und Halbwertszeit [in h] der SH in Abhängigkeit vom pH-Wert [-] und der Temperatur [in $^{\circ}\text{C}$].

Hierbei wurde deutlich, dass die beiden Parameter Temperatur und pH-Wert bezüglich ihres Einflusses auf die Enzymaktivität nur geringfügig miteinander wechselwirken bzw. eine sehr schwach ausgeprägte gegenseitige Beeinflussung bei hohen Temperaturen erfolgt. Das bedeu-

tet, dass der pH-Wert während der Reaktion bei höheren Temperaturen einen stärkeren Einfluss auf die Aktivität der SH ausübt, als es bei niedrigen Temperaturen der Fall ist. Für die Stabilität der SH verdeutlichen die Ergebnisse, dass die untersuchten Parameter bei geringeren Temperaturen stärker miteinander wechselwirken. Das heißt, dass der pH-Wert in diesem Temperaturbereich einen entscheidenden Einfluss auf die Halbwertszeit der SH besitzt. Zu hohen Temperaturen hin nimmt dieser Einfluss ab, da in diesem Bereich die Temperatur selbst die bedeutende Relevanz für die Stabilität der SH besitzt.

Um ein verbessertes Verständnis des untersuchten Systems zu erhalten, kann man sich zwei- bzw. dreidimensionalen Darstellungen der Messergebnisse bedienen, den sogenannte *contour* bzw. *surface plots*. Diese beiden Darstellungsweisen nehmen eine optische Einordnung der erhaltenen Messergebnisse mit einem Farbcode vor [Eriksson *et al.*, 2000]. Die für die Aktivität und Stabilität erhaltenen *contour plots* sind in Abbildung 3.21 dargestellt.

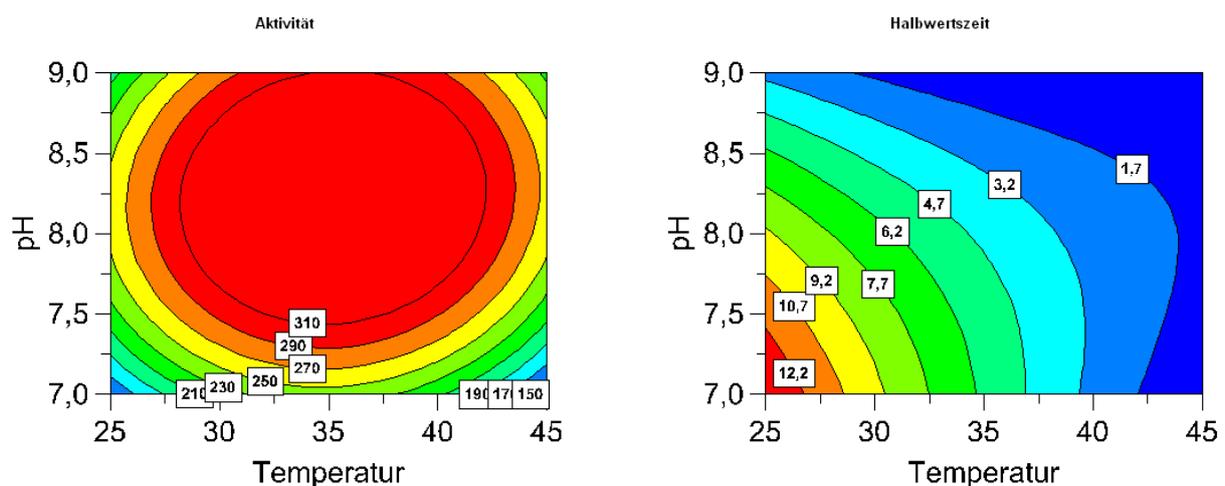


Abbildung 3.21 Der mittels DOE erhaltene *contour plot* für die Aktivität [in U mL⁻¹] (links) und Halbwertszeit [in h] (rechts) der SH in Abhängigkeit vom pH-Wert [-] und der Temperatur [in °C].

Wie anhand der *contour plots* für die Aktivität und Stabilität der SH ersichtlich ist, zeigte die SH auch im Rahmen der Untersuchungen mittels DOE eine maximale Aktivität in einem Bereich um das in Kapitel 3.1.1 bestimmte Aktivitätsoptimum von 35 °C und pH 8,0 herum. Eine maximale Stabilität der SH war dabei bei tiefen Temperaturen sowie niedrigen pH-Werten innerhalb des untersuchten Messbereichs zu beobachten, was mit den in Kapitel 3.1.2 erhal-

tenen Erkenntnissen übereinstimmt. Der *surface plot* der Messergebnisse stellt diese Effekte nochmals in dreidimensionaler Form grafisch dar (Abbildung 3.22). Zudem lassen sich anhand dieser Darstellung Aussagen über die Anpassung des Modells treffen [Eriksson *et al.*, 2000]. Diesbezüglich wird deutlich, dass das Verhältnis zwischen den Einflussfaktoren und der Aktivität der SH dem quadratischen Modell entspricht. Im Gegensatz dazu ist ersichtlich, dass die Abhängigkeit der Halbwertszeit der SH von den Einflussfaktoren mit dem quadratischen Modell weniger übereinstimmt, da die Fläche eine nur schwache Krümmung aufweist.

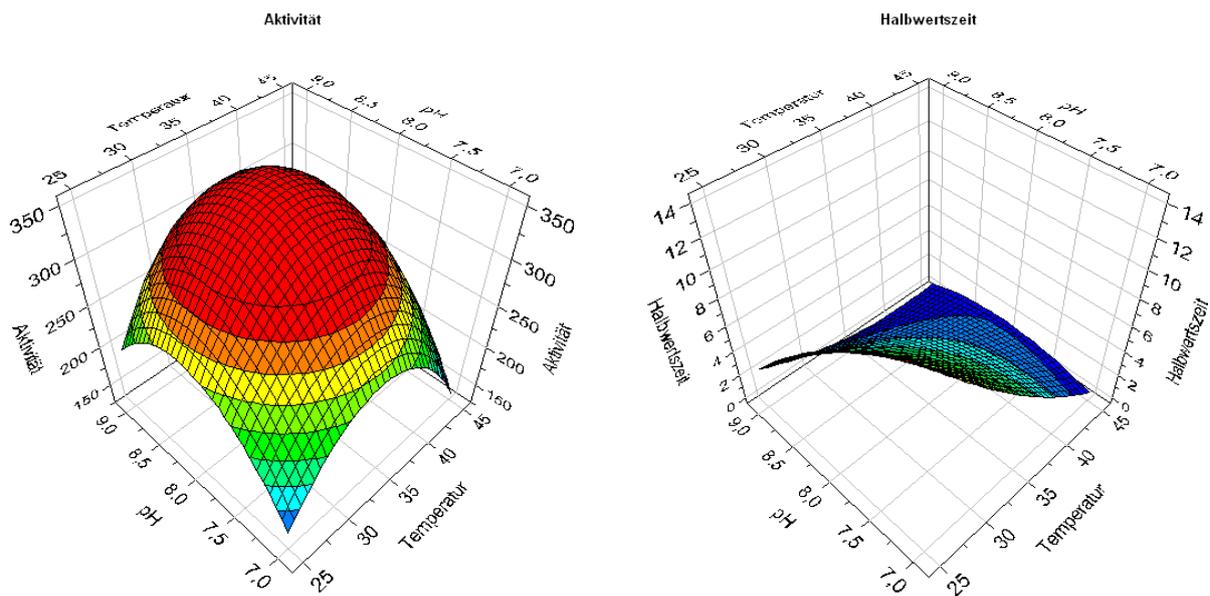


Abbildung 3.22 Der mittels DOE erhaltene *surface plot* für die Aktivität [in U mL⁻¹] (links) und Halbwertszeit [in h] der SH (rechts) in Abhängigkeit vom pH-Wert [-] und der Temperatur [in °C].

Da anhand des *contour* und *surface plots* nur eine grobe Abschätzung der optimalen Bedingungen für eine maximale Enzymaktivität bzw. -stabilität vorgenommen werden kann, wird sich der *sweet spot*-Analyse bedient, mit Hilfe welcher eine genaue Bestimmung dieser Bedingungen erfolgen kann, wie in Abbildung 3.23 dargestellt ist [Eriksson *et al.*, 2000]. Daraus ergab sich im Rahmen der Faktoreneinstellung ein optimaler Arbeitsbereich für eine maximale Enzymaktivität bei einer Reaktionstemperatur von 35 °C und einem pH-Wert von 8,2. Eine maximale Enzymstabilität wurde hingegen bei einer Temperatur von 25 °C und einem pH von 7,0 erreicht. Somit befinden sich die mittels des DOE ermittelten Bedingungen für eine maximale Aktivität bzw. Stabilität der SH in guter Übereinstimmung mit den anhand

der klassischen Methode erhaltenen Ergebnissen, da diese ebenfalls ein Aktivitätsoptimum bei 35 °C und pH 8,0 und ein Stabilitätsoptimum bei pH 7,0 sowie bei niedrigen Temperaturen ergaben (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2).

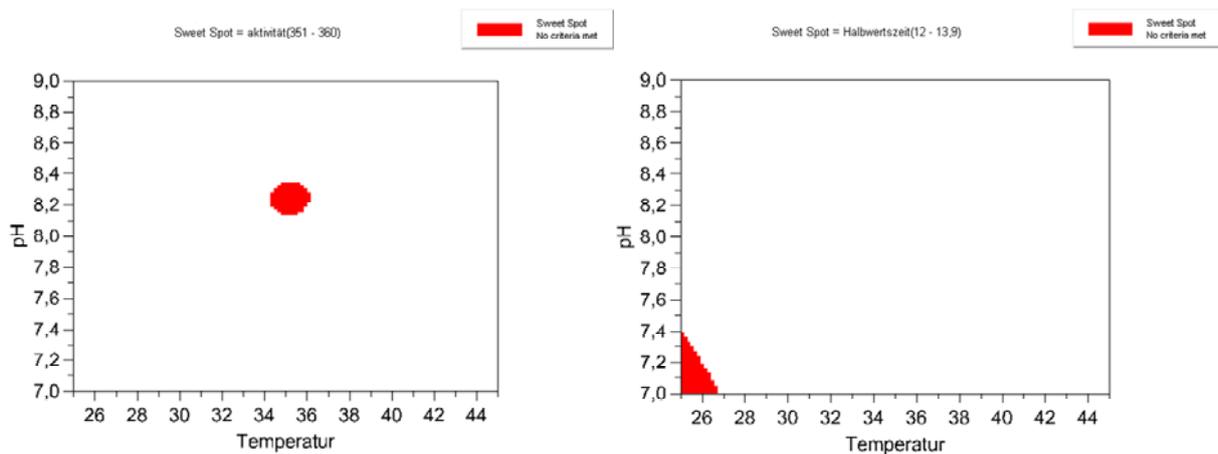


Abbildung 3.23 Die *sweet spot*-Analyse für die Aktivität (links) und Halbwertszeit (rechts) der SH in Abhängigkeit vom pH-Wert [-] und der Temperatur [in °C].

Zur Ermittlung einer Faktoreneinstellung, die zu einer hohen Enzymaktivität bei einer gleichzeitig hohen Stabilität der SH führt, wurde sich ebenfalls der *sweet spot*-Analyse bedient. Die dabei erhaltene Darstellung ist in Abbildung 3.24 zu sehen.

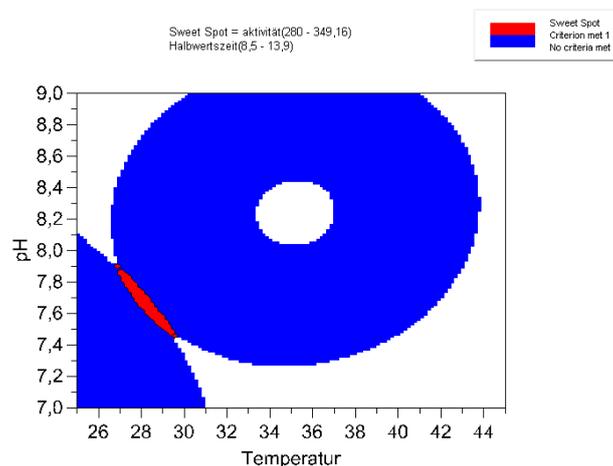


Abbildung 3.24 Die *sweet spot* Analyse für die Aktivität und Halbwertszeit der SH in Abhängigkeit vom pH-Wert [-] und der Temperatur [in °C] bei einer geforderten maximalen Enzymaktivität und -stabilität.

Bei einer geforderten Enzymaktivität zwischen 280 und 349,2 U mL⁻¹ und einer Halbwertszeit zwischen 8,5 und 13,9 h ergab sich der in Abbildung 3.24 rot unterlegte Arbeitsbereich, welcher sich bei einer Temperatur zwischen 27 und 30 °C und einem pH-Wert zwischen 7,4 und 7,9 befindet. Auch die ermittelten Temperatur- und pH-Bereiche für eine geforderte maximale Aktivität und Stabilität der SH befinden sich in Übereinstimmung mit den in Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 erhaltenen Resultaten, die ebenfalls die Vermeidung von zu hohen Temperaturen ergaben und nach denen pH-Werte unter 7,0 und über 8,0 vermieden werden sollten. Für technische Anwendungen der SH sollten demnach Reaktionstemperaturen von 30 °C nicht überschritten werden und pH-Werte in dem ermittelten Bereich zwischen 7,4 und 7,9 gewählt werden.

3.1.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend besitzt die SH eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber einer Vielzahl der untersuchten, technisch relevanten Einflussgrößen. In diesem Zusammenhang wurde eine rapide Deaktivierung der SH bei Temperaturen oberhalb ihres Optimums bei 35 °C sowie bei pH-Werten über 8,0 beobachtet. Des Weiteren zeigte die SH eine ausgeprägte Inaktivierung in Gegenwart von Natriumionen, wohingegen Phosphationen zu einer Verringerung der Enzymstabilität führten. Die Anwesenheit von Sulfatsalzen lieferte hingegen eine geringfügige Erhöhung der SH-Stabilität. Ein besonders drastischer Aktivitäts- und Stabilitätsverlust der Hydrogenase wurde in Gegenwart der untersuchten organischen Lösungsmittel DMF, DMSO und Isopropanol, sowie beim Zusatz der untersuchten ionischen Flüssigkeiten bestimmt. [MTEOA][MeSO₄] bildete dabei eine Ausnahme, da die SH bei Zugabe dieser ionischen Flüssigkeit bedingt stabilisiert werden konnte. Wurde die SH einer mechanischen Beanspruchung ausgesetzt, zeigte das Enzym dagegen abermals eine rapide Deaktivierung.

Aufgrund der erhaltenen Messresultate für die Untersuchung der SH-Aktivität und -Stabilität unter den verschiedenen Reaktions- und Inkubationsbedingungen sollte dies in technischen Anwendungen der SH entsprechend berücksichtigt werden. In diesem Zusammenhang sollte die Reaktionstemperatur nicht oberhalb von 30 °C und der pH zwischen 7,4 und 7,9 liegen, da in diesem Bereich eine maximal mögliche Enzymaktivität bei einer gleichzeitig maximalen Enzymstabilität mittels DOE bestimmt wurde. Zudem sollte bei der Verwendung von Salzen auf die Zugabe von natrium- und phosphathaltigen Salzen verzichtet werden und diese durch

kalium- oder sulphatenthaltende Salze ersetzt werden. Da insbesondere die Zugabe von organischen Lösungsmitteln sowie von einer Vielzahl der untersuchten ILs zu einer drastischen Deaktivierung der SH führte, viele technische Anwendungen die Gegenwart dieser Medien jedoch erfordern, werden im weiteren Verlauf verschiedene Strategien zur Stabilisierung der SH untersucht.

3.2 Stabilisierung der SH mittels der chemischen Modifizierung mit Methoxypolyethylenglykol (mPEG)

Polyethylenglykol (PEG) und Derivate wie Methoxypolyethylenglykol (mPEG) zählen zu den am häufigsten eingesetzten Polymeren für die chemische Modifizierung von Enzymen, da sie aufgrund ihres amphiphilen Charakters in der Lage sind, sowohl die Löslichkeit von Proteinen als auch deren Stabilität in wässrigen und organischen Lösungen zu erhöhen [Ogino und Ishikawa, 2001, DeSantis und Jones, 1999, Jene *et al.*, 1997]. Die Enzymstabilisierung ist dabei auf die Interaktion der PEG-Moleküle mit den Aminosäureresten an der Enzymoberfläche zurückzuführen. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der Flexibilität der Proteinstruktur und somit zu einer Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur des Enzyms [Rodriguez-Martinez *et al.*, 2008]. Zudem handelt es sich bei der chemischen Modifizierung der Proteinoberfläche um eine wenig zeitintensive Methode, bei der es keiner Kenntnis der Enzymstruktur bedarf [Ó` Fágáin, 2003].

Die chemische Modifizierung mit mPEG sollte der Stabilisierung der SH dienen, insbesondere gegenüber den in Kapitel 3.1 ermittelten Einflussgrößen, die zu einer ausgeprägten Deaktivierung der SH führten und eine große technische Relevanz besitzen. Dazu zählten die Gegenwart der untersuchten wassermischbaren organischen Lösungsmittel und zwei der ionischen Flüssigkeiten sowie die mechanische Beanspruchung des Enzyms in Form von Rühren in rein wässrigen Medien. Die Wahl des Modifizierungsreagenzes mPEG ist dabei mit dem stabilisierenden Einfluss von PEG zu begründen, der bereits ohne eine Modifizierung der SH eingeleitet werden konnte (Kapitel 3.1.2). Zudem wurde die chemische Modifizierung der SH mit mPEG in der Literatur bislang noch nicht beschrieben. Die mPEGylierung der SH erfolgte anhand der Verwendung von monofunktionalem mPEG, da somit eine unerwünschte Quervernetzung der SH vermieden werden konnte. Bei dem eingesetzten mPEG handelte es sich

um mPEG₂₀₀₀ mit einer Molekularmasse von 2166 g mol⁻¹ und mPEG₅₀₀₀ mit einer Molekularmasse von 5166 g mol⁻¹.

3.2.1 Modifizierung der SH mit verschiedenen aktivierten Methoxypolyethylen-glykolen (mPEGs)

Um eine kovalente Bindung des mPEGs mit den Aminogruppen des Proteins hervorzurufen, ist eine Aktivierung des mPEGs notwendig. Die Aktivierung beruht dabei auf der Bildung einer reaktiven Carbonatbindung durch die Reaktion von *p*-Nitrophenylchloroformat mit der Hydroxygruppe des mPEGs (Abbildung 3.25).

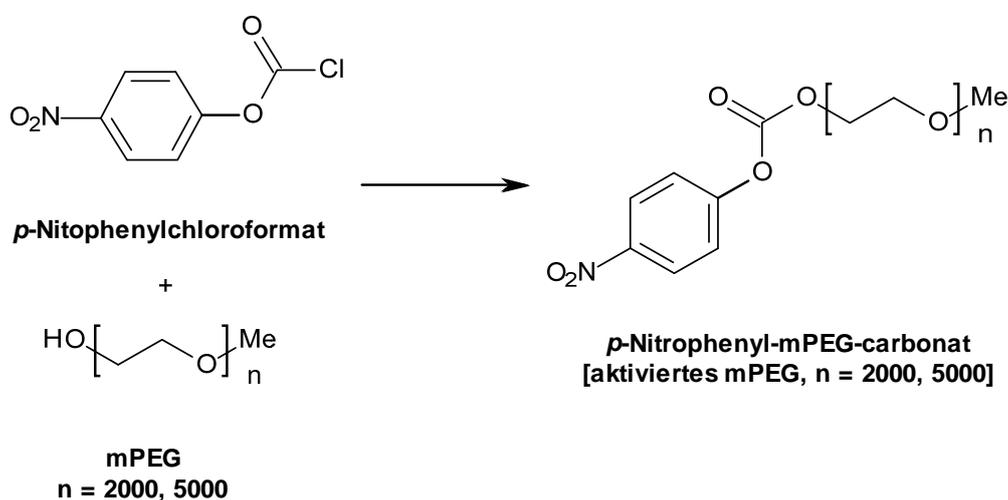


Abbildung 3.25 Aktivierung von mPEG mit *p*-Nitrophenylchloroformat.

Für die Aktivierungsgrade des eingesetzten mPEG₂₀₀₀ bzw. mPEG₅₀₀₀ wurden 70 bzw. 55 % bestimmt. Das bedeutet, dass eine vollständige Aktivierung der mPEG-Moleküle nicht erreicht werden konnte. Der erreichte Aktivierungsgrad sollte jedoch für die Modifizierung der SH ausreichen.

Der aktivierte *p*-Nitrophenyl-mPEG-carbonat-Komplex bildet mit Nukleophilen wie den unprotonierten ε-Aminofunktionen des Lysins stabile Carbamat-Komplexe unter Abspaltung von *p*-Nitrophenol, wie in Abbildung 3.26 dargestellt ist. Als Nebenreaktion findet ebenso die Hydrolyse der Carbonatbindung statt. Hierbei wird neben dem *p*-Nitrophenol das eingesetzte Polymer frei.

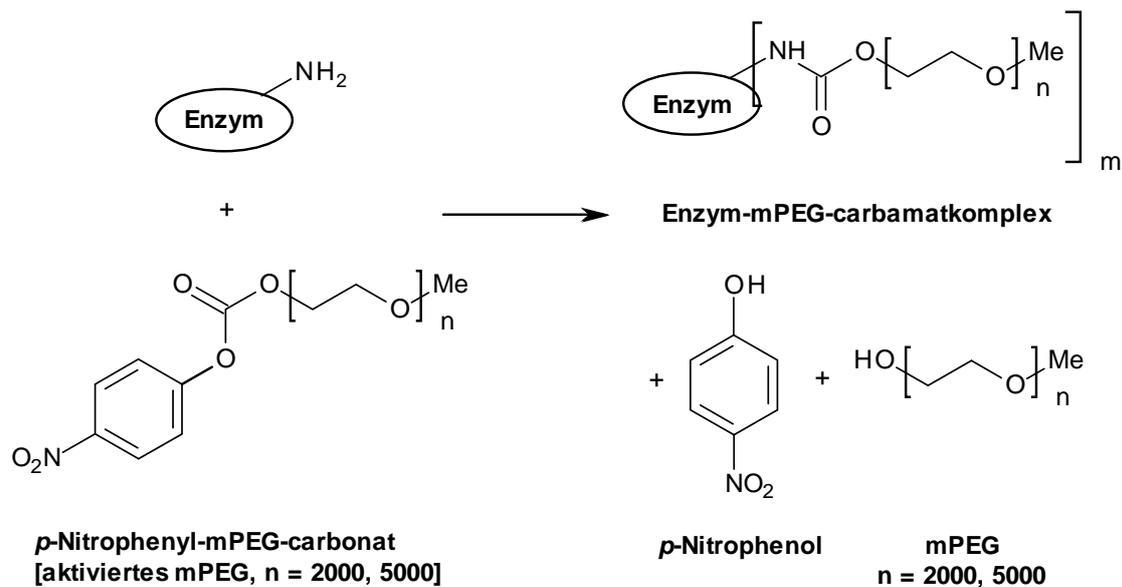


Abbildung 3.26 Modifizierung primärer Aminogruppen mit aktiviertem mPEG.

Der Modifizierungsgrad sowie die verbleibende katalytische Aktivität des modifizierten Enzyms hängen stark vom Verhältnis zwischen dem Modifizierungsreagenz und dem Enzym ab. Da es stetig zur Hydrolyse der Carbonatbindung des aktivierten mPEGs kommt, sollte das Modifizierungsreagenz immer im Überschuss eingesetzt werden [Means und Feeney, 1990]. Aus diesem Grund wurde die Modifizierung der SH bei zwei verschiedenen Enzym-mPEG-Verhältnissen, 1:500 und 1:1000, getestet. Die Konzentration der SH betrug stets $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Zur Vermeidung einer unmittelbaren Inaktivierung der SH während der Modifizierung erfolgte diese bei einem pH-Wert von 8,0 in 0,05 M Tris/HCl-Puffer und einer Modifizierungstemperatur von $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Modifizierung wurde über eine Zeitdauer von einer Stunde unter mäßigem Rühren durchgeführt. Da die Bindung der mPEG-Moleküle an das Enzym zur Erhöhung des Molekulargewichts des Proteins führt, ließ sich der Erfolg der Modifizierung mittels SDS-PAGE analysieren (Abbildung 3.27). Das dabei erhaltene SDS-Gel zeigte, dass sowohl mPEG₂₀₀₀ als auch mPEG₅₀₀₀ an verfügbare Lysinreste an der Oberfläche der SH gebunden werden konnte. Die Anzahl der kovalent gebundenen mPEG-Moleküle war dabei nicht bestimmbar. Wie anhand des SDS-Gels jedoch zu sehen ist, scheinen die niedermolekularen Untereinheiten der SH, HoxU (26 kDa), HoxY (23 kDa) und HoxI (18,6 kDa), größtenteils unmodifiziert vorzuliegen, während an die höhermolekularen Untereinheiten, HoxF (67 kDa) und HoxH (55 kDa), mPEG-Moleküle kovalent gebunden wurden. Dies

deutet darauf hin, dass die zahlreichen Lysinreste der drei niedermolekularen Untereinheiten der SH einer kovalenten Bindung des Modifizierungsreagenzes nicht zur Verfügung stehen, da sie möglicherweise in einer tieferen Proteinregion verdeckt liegen. Zudem lässt sich anhand der Banden im SDS-Gel erkennen, dass mittels mPEG₅₀₀₀ ein stärkerer Modifizierungsgrad erreicht werden konnte.

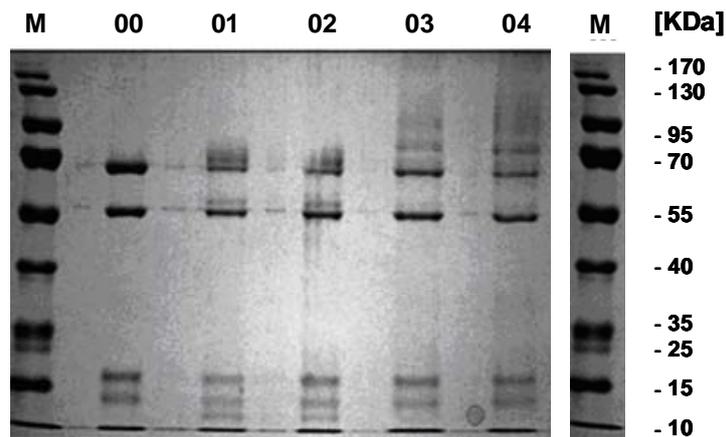


Abbildung 3.27 SDS-Gel der SH nach der Modifizierung mit mPEG₂₀₀₀ und mPEG₅₀₀₀ bei einem Enzym-mPEG-Verhältnis von 1:500 und 1:1000. [00-native, unmodifizierte SH, 01-modifizierte SH (mPEG₂₀₀₀, 1:500), 02-modifizierte SH (mPEG₂₀₀₀, 1:1000), 03-modifizierte SH (mPEG₅₀₀₀, 1:500), 04-modifizierte SH (mPEG₅₀₀₀, 1:1000); 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 4 °C]

Die Untersuchung der Enzymaktivität mittels des Standardaktivitätstests zeigte, dass nach der Modifizierung mit mPEG₂₀₀₀ bei einem Enzym-mPEG-Verhältnis von 1:500 und 1:1000 noch 86,7 (\pm 4,6) bzw. 84,0 (\pm 4,0) % der ursprünglichen Aktivität der SH erhalten blieben (Abbildung 3.28). Im Vergleich dazu zeigte die SH nach der Modifizierung mit mPEG₅₀₀₀ bei einem Enzym-mPEG-Verhältnis von 1:500 und 1:1000 noch 91,0 (\pm 13,4) bzw. 87,1 (\pm 2,5) % ihrer Ausgangsaktivität. Somit scheint die Verwendung von mPEG₅₀₀₀ mit einem geringeren Aktivitätsverlust während der Modifizierung einherzugehen. Aufgrund dieses Ergebnisses und des scheinbar höheren Modifizierungsgrades bei dem Einsatz von mPEG₅₀₀₀ erfolgten die Untersuchungen der Enzymaktivität und -stabilität der modifizierten SH unter Verwendung von mPEG₅₀₀₀ bei einem Enzym-mPEG-Verhältnis von 1:500.

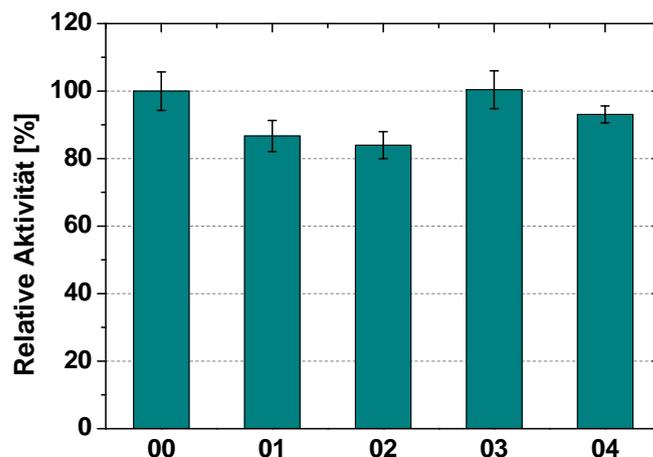


Abbildung 3.28 Aktivität der SH nach der Modifizierung mit mPEG₂₀₀₀ und mPEG₅₀₀₀ bei einem Enzym-mPEG-Verhältnis von 1:500 und 1:1000. [00- native, unmodifizierte SH, 01- modifizierte SH (mPEG₂₀₀₀, 1:500), 02- modifizierte SH (mPEG₂₀₀₀, 1:1000), 03- modifizierte SH (mPEG₅₀₀₀, 1:500), 04- modifizierte SH (mPEG₅₀₀₀, 1:1000)]

Neben der Bestimmung der Aktivität der modifizierten SH in rein wässrigen Medien (Kapitel 3.2.1) wurde die Enzymaktivität nach der Modifizierung mit mPEG in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen sowie in IL-Wasser-Gemischen untersucht. Bei den eingesetzten wassermischbaren Lösungsmitteln handelte es sich um DMF, DMSO und Isopropanol, bei den IL-Wasser-Gemischen um [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄], da diese beiden ILs die native SH am wenigsten deaktivierten, wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt wurde. Die Aktivitätsmessungen erfolgten stets bei optimalen Reaktionsbedingungen von 35 °C und pH 8,0 unter Verwendung eines 0,05 M Tris/HCl-Puffer. Die Lösungsmittelkonzentrationen und die Konzentrationen der ILs betragen dabei 10 bzw. 2,5 und 5 % (v/v). Somit konnten die Ergebnisse für die modifizierte SH direkt mit den Resultaten des nativen, unmodifizierten Enzym aus Kapitel 3.1.1 verglichen und hinsichtlich einer Aktivitätserhöhung oder -abnahme bewertet werden.

Aktivität in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen

Die Ergebnisse für die Aktivität der modifizierten SH sowie die in Kapitel 3.1.1 ermittelten Aktivitäten für die native, unmodifizierte SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol sind in Abbildung 3.29 dargestellt.

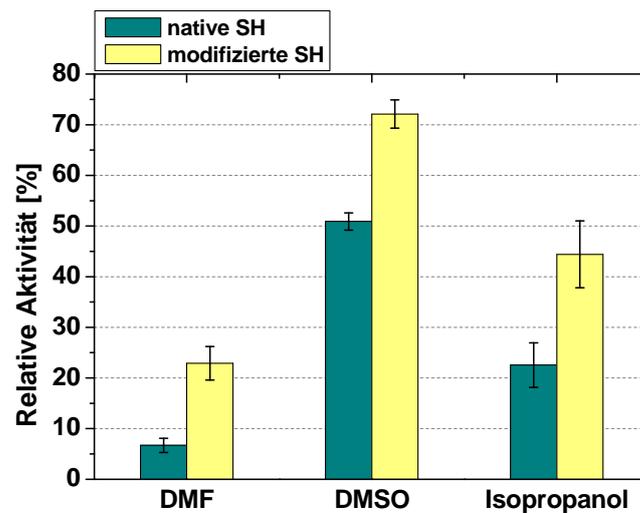


Abbildung 3.29 Aktivität der modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol und Vergleich mit der nativen SH. [Lösungsmittelkonzentration wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 µM FMN]

Wie zu sehen ist, zeigte die modifizierte SH deutlich höhere relative Aktivitäten in den untersuchten Lösungsmitteln als das native, unmodifizierte Enzym. Demnach betrug die Aktivität der modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF noch 22,9 (± 3,3) %. Verglichen mit der nativen SH, die unter den gleichen Bedingungen nur noch 6,7 (± 1,4) % ihrer Aktivität ohne den Zusatz von Lösungsmitteln zeigte, konnte somit eine 3,4-fache Aktivitätserhöhung erzielt werden. In 10 % (v/v) DMSO führte die mPEGylierung der SH immerhin noch zu einer 1,4-fachen Aktivitätserhöhung, da die gemessene Aktivität des modifizierten Enzyms 72,1 (± 2,8) % betrug. In Isopropanol ließ sich die relative Aktivität der SH durch die Modifizierung mit mPEG von 22,5 (± 4,4) % auf 44,4 (± 6,6) % erhöhen, was einer Verdopplung der Aktivität entspricht. Folglich scheint die kovalente Bindung des Modifizierungsreagenzes mPEG an die Proteinoberfläche der SH diese vor einer Denaturierung durch die Gegenwart von organischen Lösungsmitteln zu schützen. In Übereinstimmung mit diesen Resultaten wurden vergleichbare Effekte in früheren Untersuchungen mit anderen Enzymen beobachtet. Hierbei ließ sich die Lösungsmittelaktivität ebenfalls durch die Modifizierung mit PEG-Derivaten erhöhen [Wu *et al.*, 2001, Basri *et al.*, 1995]. In diesem Zusammenhang wurde die Erhöhung der Enzymaktivität darauf zurückgeführt, dass infolge der Proteinmodifizierung die

Entfernung von katalytisch essentiellm Wasser in der Enzymumgebung durch die anwesenden organischen Lösungsmittel verhindert wird [Basri *et al.*, 1995].

Aktivität in IL-Wasser-Gemischen

Die Ergebnisse für die Aktivitäten der modifizierten und nativen, unmodifizierten SH zeigen, dass auch in 2,5 und 5 % (v/v) von [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄] eine Erhöhung der Enzymaktivität durch die Modifizierung mit mPEG erreicht werden konnte (Abbildung 3.30).

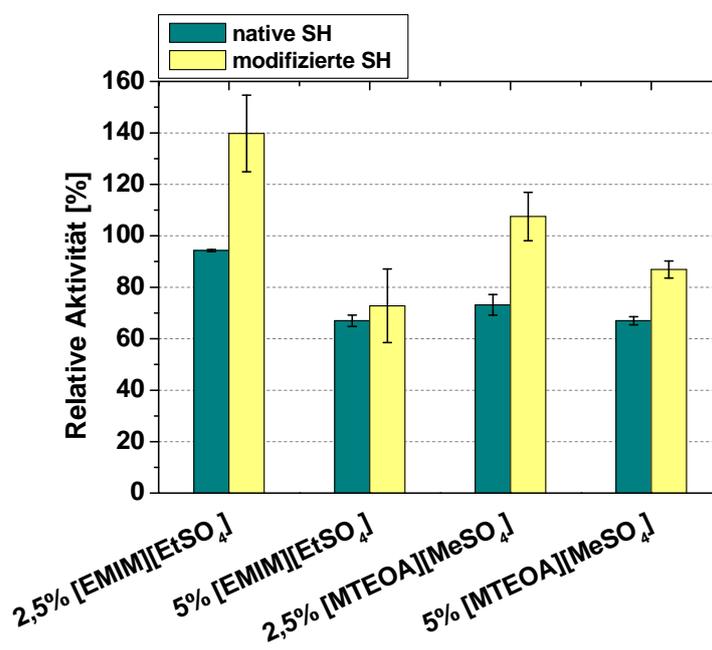


Abbildung 3.30 Aktivität der modifizierten SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄] und Vergleich mit der nativen SH. [IL-Konzentrationen wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 μM FMN]

Nach der Modifizierung mit mPEG betrug die Aktivität der SH 139,8 (± 14,9) % und 107,5 (± 9,4) % in 2,5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] bzw. [MTEOA][MeSO₄]. Verglichen mit den Aktivitäten des nativen, unmodifizierten Enzyms konnte somit eine Aktivitätserhöhung um 46 bzw. 34 % in 2,5 % (v/v) der untersuchten ILs erzielt werden. In 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] bzw. [MTEOA][MeSO₄] wurde dagegen eine deutlich geringere Aktivitätssteigerung durch die mPEGylierung des Enzyms erhalten. So besaß die modifizierte SH eine innerhalb der

Standardabweichung des unmodifizierten Enzyms liegende Aktivität in Gegenwart von 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄]. In 5 % (v/v) [MTEOA][MeSO₄] wurde hingegen eine deutlichere Erhöhung der Enzymaktivität um 20 % ermittelt.

Die durch die chemische Modifizierung hervorgerufene Aktivitätserhöhung der SH lässt sich mit Literaturdaten belegen. Dabei führte die chemische Modifizierung eines Enzyms mit PEG ebenfalls zu einer Steigerung der Enzymaktivität in verschiedenen ILs [Nakashima *et al.*, 2006].

3.2.2 Stabilität der modifizierten SH

Analog zu den Messungen der Aktivität der chemisch modifizierten SH wurde die Stabilität des mPEGylierten Enzyms in rein wässrigen Medien unter mechanischer Beanspruchung des Enzyms sowie ohne und in Lösungsmittel- und IL-Wasser-Gemischen untersucht. Hierbei betrug die Konzentration der wassermischbaren organischen Lösungsmittel DMF, DMSO und Isopropanol immer 10 % (v/v). Die ILs [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄] wurden dagegen in Konzentrationen von 2,5 und 5 % (v/v) eingesetzt. Auch diese Messungen erfolgten stets bei einer Inkubationstemperatur von 35 °C und einem pH von 8,0 unter Verwendung eines 0,05 M Tris/HCl-Puffer. Somit ließen sich die Ergebnisse für die modifizierte SH ebenfalls direkt mit den Resultaten für das native, unmodifizierte Enzym aus Kapitel 3.1.2 vergleichen und hinsichtlich einer Enzymstabilisierung durch die chemische Modifizierung mit mPEG bewerten.

Stabilität in rein wässrigen Medien

Im Zuge der chemischen Modifizierung mit mPEG konnte die Halbwertszeit der nativen SH (5,3 (± 0,7) h) nur geringfügig um 11 % auf 5,9 (± 0,1) h erhöht werden (Abbildung 3.31). Wurde der Inkubationsansatz zusätzlich bei 400 Upm mittels eines Magnetrührers gerührt und somit das Enzym in Form von Scherkräften zusätzlich beansprucht, betrug die Halbwertszeit der mPEGylierten SH 3,2 (± 0,3) h. Im Gegensatz dazu besaß die native SH unter vergleichbaren Inkubationsbedingungen eine Halbwertszeit von nur 1,9 (± 0,1) h. Somit führte die chemische Modifizierung der SH zu einer deutlichen Erhöhung ihrer mechanischen Stabilität. Hierbei betrug die Steigerung der Enzymstabilität 68 %.

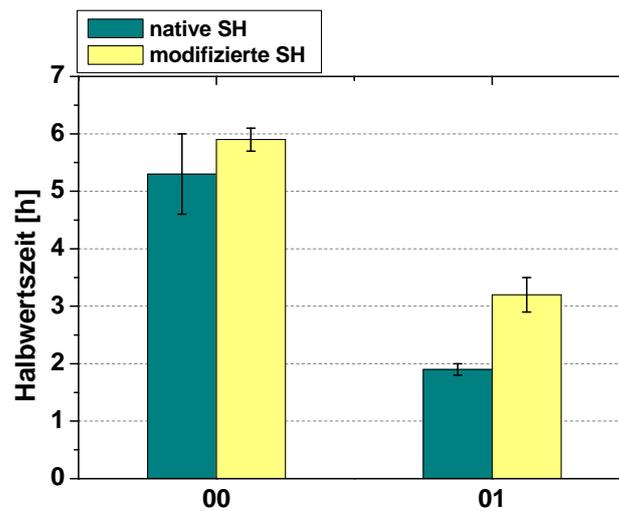


Abbildung 3.31 Stabilität der modifizierten SH in rein wässrigen Medien unter mechanischer Beanspruchung und ohne und Vergleich mit der nativen SH. [00- ohne Rühren, 01- Magnetrührer (400 Upm); 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

Stabilität in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen

Die Ergebnisse für die Stabilität der chemisch modifizierten SH und der Vergleich mit dem nativen, unmodifizierten Enzym zeigen, dass in allen untersuchten Lösungsmitteln eine Erhöhung der Halbwertszeit im Zuge der mPEGylierung erzielt werden konnte (Abbildung 3.32). In 10 % DMF (v/v) nahm die Halbwertszeit von 0,1 (\pm 0,0) h auf 0,3 (\pm 0,0) h zu, was einer 3-fachen Enzymstabilisierung entspricht. In 10 % DMSO betrug die Halbwertszeit der mPEGylierten SH 2,0 (\pm 0,4) h, was verglichen mit der Halbwertszeit für das native Enzym (1,0 (\pm 0,0) h) einer Verdopplung der Enzymstabilität entspricht. In 10 % (v/v) Isopropanol zeigte sich der deutlichste stabilisierende Effekt, der von der chemischen Modifizierung mit mPEG ausgeht. Hierbei ließ sich die Halbwertszeit des nativen Enzyms von 0,1 (\pm 0,0) h auf 0,5 (\pm 0,2) h erhöhen, was einer 5-fachen Stabilisierung entspricht. Folglich führt die chemische Modifizierung mit mPEG neben einer Steigerung der Enzymaktivität zudem zu einer Stabilisierung der SH in den betrachteten Lösungsmittel-Wasser-Gemischen. Auch für andere modifizierte Enzyme wurden bislang vergleichbare Effekte in verschiedenen organischen Lösemitteln beschrieben [Basri *et al.*, 1995].

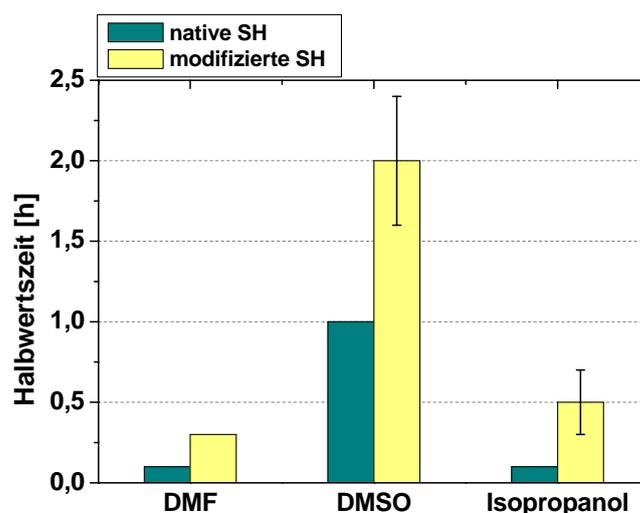


Abbildung 3.32 Stabilität der modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol und Vergleich mit der nativen SH. [Lösungsmittelkonzentration wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

Stabilität in IL-Wasser-Gemischen

Die chemische Modifizierung der SH mit mPEG zeigte keinen Einfluss auf die Stabilität der SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄], da die modifizierte SH vergleichbare Halbwertszeiten wie das native, unmodifizierte Enzym besaß (Abbildung 3.33). Somit gingen keine stabilisierenden Effekte von der Enzymmodifizierung mit mPEG in den untersuchten IL-Wasser-Gemischen aus. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der enzymdeaktivierende bzw. aktivierende Einfluss dieser Lösemittel einem anderen Mechanismus als dem der untersuchten polaren organischen Lösungsmittel folgt. Vielmehr scheinen die erhaltenen Ergebnisse im Zusammenhang mit den in Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 beobachteten Auswirkungen von gelösten Salzen auf die Aktivität und Stabilität der SH zu stehen. Dabei zeigten Salze, die beispielsweise Sulfationen enthielten, enzymstabilisierende, phosphathaltige Salze hingegen destabilisierende Effekte. Genauere Aussagen sind aufgrund der fehlenden Strukturinformation zur SH jedoch nicht zu treffen.

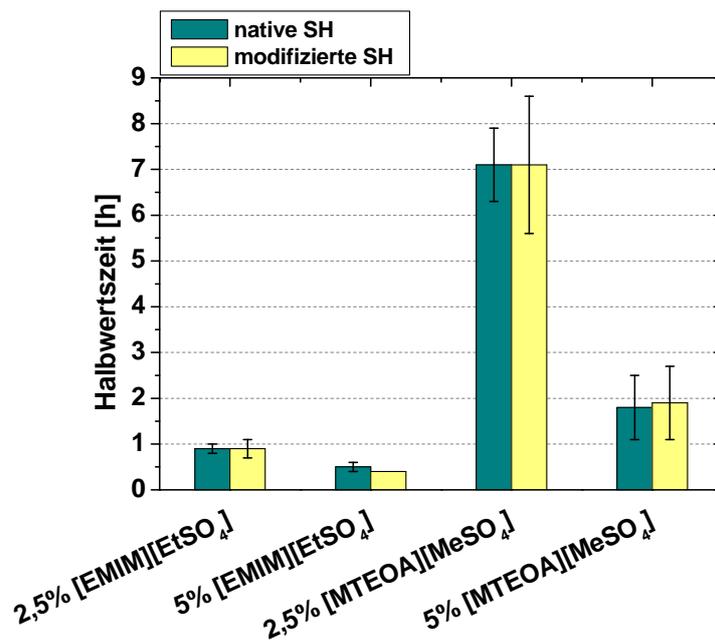


Abbildung 3.33 Stabilität der modifizierten SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄] und Vergleich mit der nativen SH. [IL-Konzentrationen wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

Für gewöhnlich wird der stabilisierende Effekt von mPEG durch den Grad der Hydratisierung der Proteinoberfläche, basierend auf den hydrophilen Eigenschaften des PEGs, bestimmt. Dabei kommt es zu einer Reduzierung der Enzymflexibilität aufgrund der gleichzeitigen Wechselwirkung von hydrophoben Bereichen des PEGs mit hydrophoben Teilen an der Oberfläche des Proteins [Van den Wittenboer *et al.*, 2010, Quintanilla-Guerrero *et al.*, 2008, Rodriguez-Martinez *et al.*, 2008, Svergun *et al.*, 2008, Lopez-Cruz *et al.*, 2006, Garcia-Arellano *et al.*, 2002]. Infolge dessen kommt es zur Ausbildung eines rigiden Käfigs um das Enzym herum. Dieser reduziert Anfälligkeiten des Enzyms gegenüber Einflüssen, die zu einer Entfaltung der dreidimensionalen Proteinstruktur führen. Die Größe und Kraft dieses Käfigs hängt dabei von der Anzahl von kovalent gebundenen PEG-Molekülen pro Enzymmolekül ab. Demnach kann der Schutz vor denaturierenden Einflüssen durch die Enzymmodifizierung mit PEG so lang aufrecht erhalten werden, wie ein intakter Käfig um das Protein herum existiert. Die Ergebnisse für die modifizierte SH deuten somit daraufhin, dass bis zu einer bestimmten Konzentration an polaren Molekülen, wie den untersuchten organischen Lösungsmitteln,

mPEG eine hinreichende Schutzfunktion besitzt. In Gegenwart von Molekülen, die eine starke Wechselwirkung mit Wasser eingehen, kann die Hydratisierung durch mPEG dagegen nicht mehr aufrechterhalten werden, auch bei niedrigen Konzentrationen dieser Substanzen. Vermutlich ist ein dem entsprechendes Verhalten bei der modifizierten SH in Gegenwart der untersuchten ILs zu beobachten.

3.2.3 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die chemische Modifizierung der Oberfläche der SH mit mPEG eine geeignete Methode zur Stabilisierung der SH ist, insbesondere gegenüber inaktivierenden Interaktionen mit Lösungsmitteln. Die Modifizierung der SH mit mPEG₅₀₀₀ führte bei einem Enzym-mPEG-Verhältnis von 1:500 zu hohen Restaktivitäten von 91 %. Zudem konnte die zuvor beobachtete ausgeprägte Sensitivität des Enzyms gegenüber polaren organischen Lösungsmitteln deutlich verringert werden. Dabei konnte die Lösungsmittelaktivität der SH um ein bis zu 3,4-faches und die Lösungsmittelstabilität um ein bis zu 5-faches erhöht werden. Darüber hinaus konnte eine prägnante Aktivitätssteigerung um bis zu 46 % in IL-Wasser-Gemischen erzielt werden. Hinsichtlich der Halbwertszeit der SH in den untersuchten IL-Wasser-Gemischen war dagegen keine Veränderung zu beobachten, was auf einen alternativen Mechanismus der Deaktivierung der SH durch die Zugabe von ILs verglichen mit dem in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen hindeutet. In rein wässrigen Medien war ebenfalls nur die Erhöhung der Enzymstabilität unter Rühren zu beobachten.

3.3 Stabilisierung der SH durch adsorptive Immobilisierung

Die adsorptive Bindung von Proteinen an feste Träger zählt zu den ältesten Methoden innerhalb der Enzymimmobilisierung, da sich auf diesem Weg die Proteinstabilität in wässrigen sowie in organischen Lösungen erhöhen lässt [Mateo *et al.*, 2007, Mateo *et al.*, 2000, Pan-Soo *et al.*, 2000]. Die Enzymstabilisierung ist dabei im Wesentlichen auf die signifikante Veränderung der Mikroumgebung des Enzyms durch seine adsorptive Bindung an einen Träger zurückzuführen. Das stark solvatisierte, von Wasser umgebene Enzym wird dabei desolvatisiert. Dadurch können natürliche Kräfte, die die solvatisierte Struktur aufrecht erhalten, gestört werden, weshalb eine Anpassung der Enzymkonformation erfolgt, die häufig mit einer Veränderung der Enzymaktivität, -stabilität und -selektivität einhergeht [Cao, 2005]. Zusätz-

lich erhält man bei der adsorptiven Immobilisierung von Enzymen die Möglichkeit, den Biokatalysator durch einfache Filtration wiederholt einsetzen zu können. Darüber hinaus ist häufig eine hohe Retention der Enzymaktivität zu beobachten, da das Protein selbst während der adsorptiven Immobilisierung nicht modifiziert wird, wie es bei der kovalenten Immobilisierung der Fall ist [Albayrak und Yang, 2002, Sharma und Yamazaki, 1984].

Die Adsorption der SH an einen geeigneten Träger sollte in erster Linie der Enzymstabilisierung dienen, da diesbezüglich bislang keine Literaturdaten für die SH existieren. Wie schon in Kapitel 3.2, galt es auch bei diesen Untersuchungen, die Stabilität der SH insbesondere gegenüber den in Kapitel 3.1.2 beobachteten inaktivierenden Einflussparametern zu erhöhen. Dies umfasste abermals die Stabilisierung gegenüber den Lösungsmitteln DMF, DMSO und Isopropanol und den ILs [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄]. Zudem sollte im Zuge der Immobilisierung die mechanische Stabilität der SH in rein wässrigen Medien erhöht werden. Hierzu wurden die Aktivität und die Halbwertszeit der erhaltenen Immobilisate unter den entsprechenden Bedingungen analysiert und durch einen direkten Vergleich mit dem nativen Enzym hinsichtlich einer Stabilisierung bewertet. Des Weiteren wurde die Rezyklierbarkeit der hergestellten Immobilisate sowie die mögliche Enzymdesorption von den Partikeln, die bei der adsorptiven Immobilisierung häufig zu beobachten ist, untersucht [Mateo *et al.*, 2007, Cao, 2005]. Die Bestimmung der Aktivität und Stabilität erfolgte zum einen für die Immobilisate der nativen SH und zum anderen für die Immobilisate der zuvor chemisch modifizierten SH. Dies sollte der Erfassung möglicher additiver Effekte der beiden Stabilisierungsmethoden dienen.

3.3.1 Optimierung des Immobilisierungsverfahrens

Zu Beginn der Untersuchungen erfolgte eine Optimierung des Immobilisierungsverfahrens unter Verwendung der nativen, unmodifizierten SH. Da das Trägermaterial, der pH-Wert während der Immobilisierung, die Inkubationszeit sowie das Enzym-Träger-Verhältnis einen maßgeblichen Einfluss auf die Aktivität der Immobilisate und die Proteinbeladung der Träger besitzen, erfolgte die Optimierung in Abhängigkeit von diesen Parametern [Mateo *et al.*, 2007, Cao, 2005]. Dazu wurde für jede dieser Einflussgrößen die verbleibende Enzymaktivität und die Menge des trägergebundenen Proteins bestimmt. Die Immobilisierung der SH erfolgte dabei zu Beginn bei pH 8,0, dem pH-Optimum der nativen SH, und einem

Enzym-Träger-Verhältnis von 1:2000. Die Temperatur betrug stets 4 °C, um eine maximale Adsorption der SH zu erhalten, die bei niedrigen Temperaturen begünstigt ist. Bei dem verwendeten Puffer handelte es sich um 0,05 M Tris/HCl-Puffer.

Zunächst wurde eine Auswahl verschiedener Immobilisierungsmatrizes getroffen, bei denen es sich unter anderem um makroporöse Harze unterschiedlicher Ladung handelte (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 Auswahl verschiedener Träger für die adsorptive Immobilisierung der SH.

Hersteller	Name	Matrix	Partikelgröße
Rohm und Haas	Amberlite™ XAD761	Divinylbenzol	0,56 – 0,76 mm
	Amberlite™ XAD7HP	Acryl	0,56 – 0,71 mm
	Amberlite™ FPA54	Formophenol	-
	Amberlite™ FPC3500	Methacryl/Divinylbenzol	0,45 – 0,65 mm
Chiralvision	IB-A161	Polystyren	0,35 – 0,7 mm
	IB-C435	Polyacryl	0,35 – 0,7 mm
Resindion S.R.L	Sepabeads® EC-EP	Polymethacryl	-

Die Ergebnisse für die gemessene Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Enzymimmobilisierung auf den verschiedenen Trägern sind in Abbildung 3.34 dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die adsorptive Bindung der SH an jeden dieser Träger zu einem deutlichen Aktivitätsverlust führte. Die Aktivitätsabnahme ist hierbei auf die eintretende Konformationsänderung des Enzyms durch seine ionische Interaktion mit dem Trägermaterial zurückzuführen [Cao, 2005]. In der Folge kommt es zudem häufig zu einer Diffusionslimitierung der beteiligten Reaktanden aufgrund der schlechteren Zugänglichkeit des aktiven Zentrums des trägergebundenen Proteins. Wie ausgeprägt die Aktivitätsabnahme des Enzyms nach der Immobilisierung ist, hängt folglich stark von dem eingesetzten Trägermaterial ab, woraus die ermittelten Aktivitätsunterschiede für die verschiedenen Träger resultieren. Die erreichte maximale Restaktivität der SH betrug 48,9 (\pm 0,4) % nach der Immobilisierung auf dem anionischen Harz Amberlite™ FPA54. Die adsorptive Bindung der SH an den kationischen Träger Amberlite™ FPC3500 führte hingegen zu einem vollständigen Aktivitätsverlust, da nur 0,8 (\pm 0,4) % der ursprünglichen Aktivität der SH bestimmt werden konnten. Die Protein-

beladung betrug bei beiden Trägern 93,4 ($\pm 0,8$) % bzw. sogar 100 ($\pm 0,0$) %, was bedeutet, dass im Fall von Amberlite™ FPC3500 alle Proteinmoleküle adsorptiv gebunden werden konnten, die dadurch herbeigeführte Änderung der Enzymkonformation jedoch zu einer vollständigen Inaktivierung der SH führte, möglicherweise durch die kationische Funktionalität des Trägermaterials. Bei der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 konnte hingegen ein hoher Anteil der SH gebunden werden und dabei die Hälfte ihrer ursprünglichen Aktivität erhalten bleiben, weshalb dieser Träger für die weiteren Untersuchungen ausgewählt wurde.

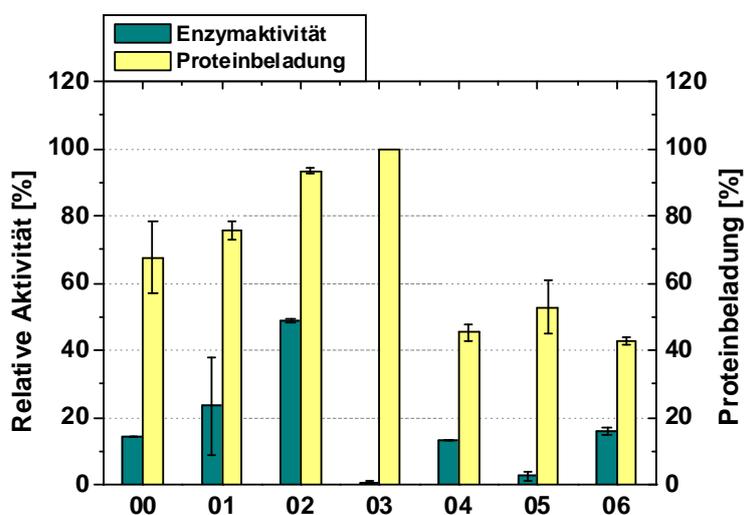


Abbildung 3.34 Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf verschiedenen Trägern. [00- Amberlite™ XAD761, 01- Amberlite™ XAD7HP, 02- Amberlite™ FPA54, 03- Amberlite™ FPC3500, 04- Chiralvision IB-A161, 05- Chiralvision IB-C435, 06- Resindion S.R.L. Sepabeads® EC-EP; 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 4 °C, Enzym-Träger-Verhältnis: 1:2000]

Die adsorptive Enzymimmobilisierung erfolgt unter anderem über ionische Interaktionen zwischen dem Protein und dem Trägermaterial. Diese werden wiederum durch die Protonierung der Aminosäureseitenketten des Enzyms sowie durch die Protonierung der Funktionalitäten am Träger bestimmt [Whitesides *et al.*, 2006, Cao, 2005]. Folglich übt der pH-Wert während der Immobilisierung einen starken Einfluss auf die Quantität der Protein-Träger-Bindung sowie auf die verbleibende Restaktivität des gebundenen Enzyms aus, weshalb eine Optimierung des Immobilisierungsverfahrens in Abhängigkeit vom pH-Wert

erfolgte. Dazu wurde die Aktivität und Proteinbeladung der Immobilisate nach der Immobilisierung zusätzlich bei einem pH-Wert von 7,0 bestimmt. Auf die Optimierung in einem weiteren pH-Bereich wurde dabei verzichtet, da in diesem Fall eine Inaktivierung der SH während der Immobilisierung zu erwarten war. Es zeigte sich, dass der pH-Wert während der Immobilisierung in dem betrachteten Bereich keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Immobilisate sowie auf deren Proteinbeladung besitzt (Abbildung 3.35). So nahm sowohl die Enzymaktivität als auch die Menge des gebundenen Proteins bei einer Verringerung des pH-Wertes von 8,0 auf 7,0 nur geringfügig ab, da die ermittelte SH-Aktivität noch immer 44,4 ($\pm 0,3$) % und die Proteinbeladung 77,8 ($\pm 7,3$) % betrug. Somit erfolgte die weitere SH-Immobilisierung bei einem pH-Wert von 8,0.

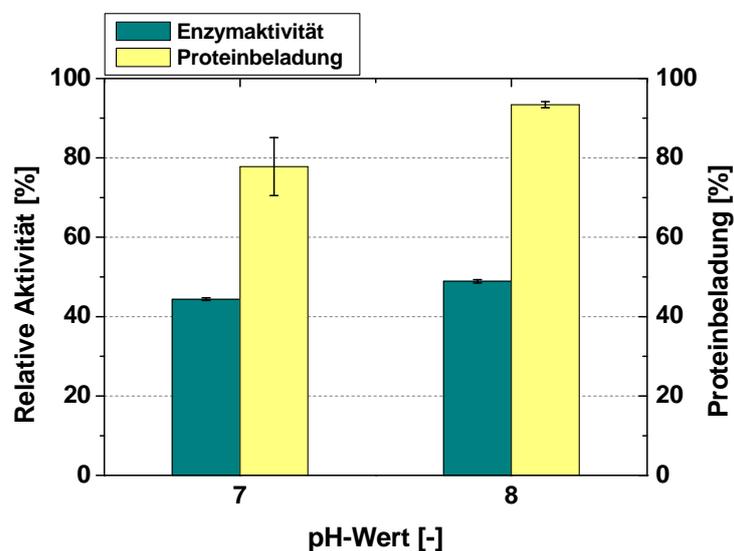


Abbildung 3.35 Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei pH 7,0 und 8,0. [pH-Werte wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer, 4 °C, Enzym-Träger-Verhältnis: 1:2000]

Die Variation des Enzym-Träger-Verhältnisses zeigte einen nur geringen Einfluss auf die Proteinbeladung der Träger (Abbildung 3.36). So wurden nach der Erhöhung der Enzymmenge von 0,1 mg auf 0,2 mg noch immer 77,8 ($\pm 7,3$) % des eingesetzten Proteins am Träger adsorbiert und bei einer Verringerung auf 0,05 mg SH ebenfalls noch 72,4 ($\pm 0,8$) % des Enzyms am Träger gebunden. Demnach erfolgte eine Erhöhung der trägergebundenen Enzymmenge, wenn die zur Immobilisierung eingesetzte Enzymmenge erhöht wurde. Im Gegensatz dazu zeigte die Veränderung des Enzym-Träger-Verhältnisses einen deutlichen

Einfluss auf die relative Enzymaktivität nach der Immobilisierung. Demnach konnten bei einem Enzym-Träger-Verhältnis von 1:500 nur noch 15,5 ($\pm 0,0$) % der Ausgangsaktivität bestimmt werden. Bei einer Verdopplung der Enzymmenge, die zu einem Enzym-Träger-Verhältnis von 1:1000 führte, verdoppelte sich gleichzeitig die Restaktivität der Immobilisate, was mit der absolut höheren Enzymbeladung korreliert. Nur die Erhöhung des Enzym-Träger-Verhältnisses von 1:2000 auf 1:4000 erzielte eine lediglich geringfügige Erhöhung der Restaktivität um 10 %, die zudem innerhalb der Standardabweichung lag und somit für eine Sättigung der Trägeroberfläche mit Enzym bei einem Enzym-Träger-Verhältnis von 1:2000 spricht. Zudem deuten die erhaltenen Resultate darauf hin, dass es bei hohen Proteinanteilen zu einer Ausbildung von Polyenzymsschichten kommt [Pareira *et al.*, 2001, Al-Duri und Yong, 2000]. Dabei werden die innergebundenen Enzymmoleküle für einen Substratzugang blockiert, was in der Folge zu einer Abnahme der Gesamtaktivität führt.

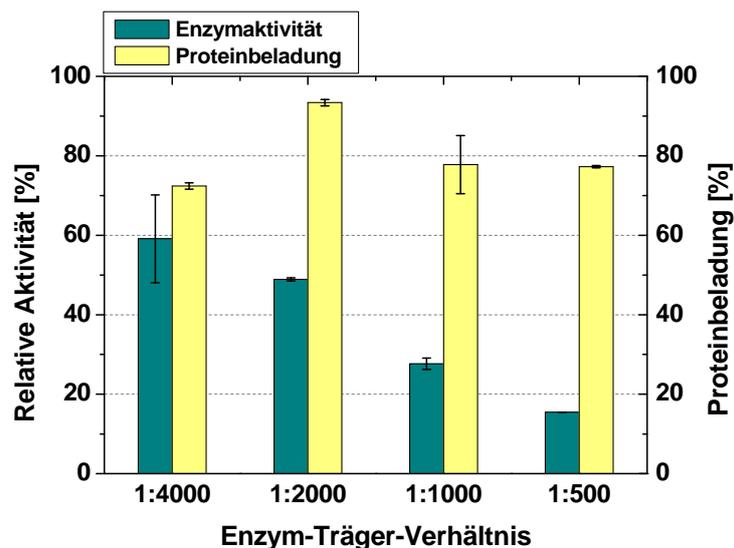


Abbildung 3.36 Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei verschiedenen Enzym-Träger-Verhältnissen. [Enzym-Träger-Verhältnisse wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 4 °C]

Aufgrund der ermittelten hohen Proteinbeladung und der gleichzeitig hohen Aktivität der SH-Immobilisate bei einem Enzym-Träger-Verhältnis von 1:2000 wurde die Immobilisierung weiterhin bei diesem Verhältnis durchgeführt. Hierbei betrug die Proteinbeladungsdichte $0,47 \cdot 10^{-3}$ mg SH pro mg Träger.

Die Erhöhung der Inkubationszeit während der Immobilisierung auf zwei Stunden übte keinen Einfluss auf die Aktivität und Proteinbeladung der Träger aus, weshalb eine Immobilisierungsdauer von einer Stunde beibehalten wurde. Die Untersuchung der Aktivität und Stabilität der SH-Immobilisate erfolgte somit weiterhin bei 4 °C, pH 8,0, einem Enzym-Träger-Verhältnis von 1:2000 und über eine Inkubationszeit von einer Stunde.

3.3.2 Aktivität der Immobilisate

Analog zu der Aktivitätsuntersuchung der mPEGylierten SH (Kapitel 3.2.2) erfolgte die Bestimmung der relativen Aktivität der SH-Immobilisate in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen und IL-Wasser-Gemischen. Wie schon bei der nativen und modifizierten SH erfolgte die Aktivitätsbestimmung der SH-Immobilisate ebenfalls stets bei 35 °C und pH 8,0 unter Verwendung eines 0,05 M Tris/HCl-Puffer. Hierbei wurden sowohl die Aktivität der immobilisierten nativen SH als auch die des immobilisierten und zuvor modifizierten Enzyms ermittelt und hinsichtlich einer Aktivitätserhöhung bewertet.

Aktivität in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen

Die adsorptive Immobilisierung auf AmberliteTM FPA54 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivität der SH in Gegenwart von polaren organischen Lösungsmitteln (Abbildung 3.37). So konnte eine Erhöhung der relativen Enzymaktivität um ein bis zu 13-faches beobachtet werden. Hierbei betrug die relative Aktivität der nativen SH nach ihrer Immobilisierung noch 98,7 (\pm 0,4) %, 84,9 (\pm 4,5) % und 74,8 (\pm 5,4) % in 10 % (v/v) DMF, DMSO bzw. Isopropanol. Die native, unimmobilisierte SH zeigte dem gegenüber eine deutlich geringere relative Aktivität unter vergleichbaren Bedingungen. Die Immobilisierung der zuvor mit mPEG modifizierten SH führte zu ähnlichen bzw. sogar zu teilweise niedrigeren Aktivitäten der Immobilisate in den untersuchten Lösungsmittel-Wasser-Gemischen. Somit konnten keine additiven Effekte der beiden Stabilisierungsmethoden auf die Aktivität der SH festgestellt werden.

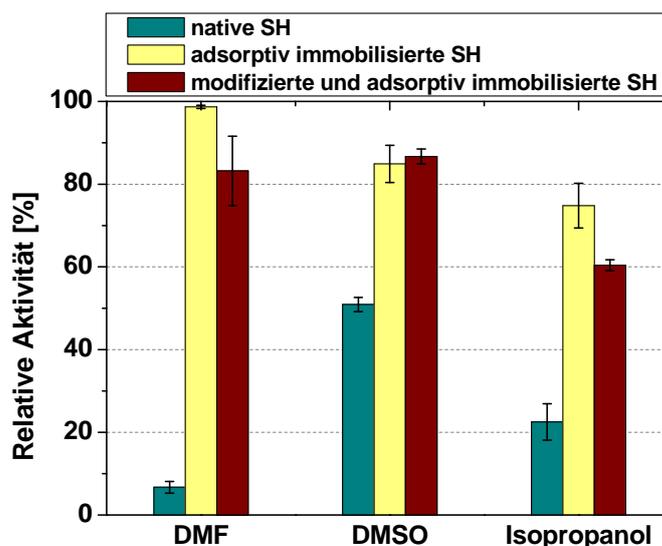


Abbildung 3.37 Aktivität der adsorptiv immobilisierten nativen und modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol und Vergleich mit der nativen SH. [Lösungsmittelkonzentration wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 µM FMN]

Die Ergebnisse für die Aktivität der SH-Immobilisate verdeutlichen, dass die adsorptive Immobilisierung der nativen sowie der chemisch modifizierten SH eine deutlich stabilere Enzymkonformation hervorruft. In der Folge besitzt die SH eine verringerte Sensitivität gegenüber den untersuchten organischen Lösungsmitteln, die zu einer geringeren Enzymdeaktivierung führt.

Aktivität in IL-Wasser-Gemischen

Auch in IL-Wasser-Gemischen ließ sich die Aktivität der SH durch die adsorptive Immobilisierung auf AmberliteTM FPA54 deutlich erhöhen (Abbildung 3.38). So führte die Immobilisierung der nativen SH insbesondere in 5 % (v/v) [MTEOA][MeSO₄] zu einer beachtlichen Aktivitätszunahme um 294 %, wohingegen sich die Aktivität des immobilisierten und zuvor chemisch modifizierten Enzyms nur um 127 % erhöhen ließ. Diese Beobachtung lässt auf eine außergewöhnliche ionische Interaktion zwischen [MTEOA][MeSO₄] und der adsorptiv gebundenen SH schließen, insbesondere bei der gewählten IL-Konzentration. Die Aktivitätszunahmen in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] und in 2,5 % (v/v) [MTEOA][MeSO₄] betru-

gen bis zu 60, 80 bzw. 75 %. Mit Ausnahme der Aktivität der Immobilisate in 5 % (v/v) [MTEOA][MeSO₄] waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der Aktivität der Immobilisate des nativen und des modifizierten Enzyms festzustellen. Somit konnten auch in den untersuchten IL-Systemen keine deutlichen additiven Effekte bei der chemischen Modifizierung der SH und ihrer zusätzlichen Immobilisierung beobachtet werden.

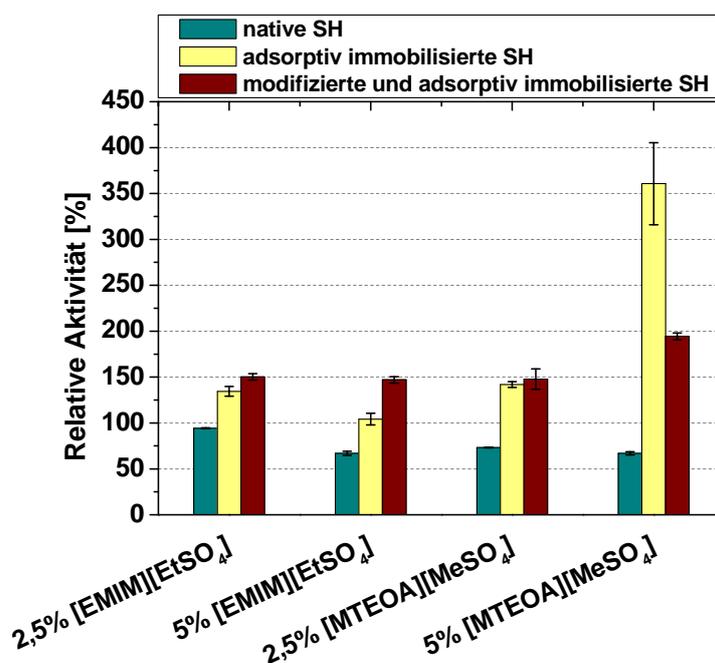


Abbildung 3.38 Aktivität der adsorptiv immobilisierten nativen und modifizierten SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄] und Vergleich mit der nativen SH. [IL-Konzentrationen wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 μM FMN]

3.3.3 Stabilität der Immobilisate

Wie bei der mPEGylierten SH in Kapitel 3.2.3 erfolgte die Untersuchung der Stabilität der SH-Immobilisate ebenfalls in rein wässrigen Medien, in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen und in IL-Wasser-Gemischen. Die Inkubationsbedingungen betragen wie auch schon bei der nativen und chemisch modifizierten SH stets 35 °C und pH 8,0 unter Verwendung eines 0,05 M Tris/HCl-Puffers. Die ermittelten Halbwertszeiten wurden sowohl für das immobilisierte native als auch für das immobilisierte und zuvor modifizierte Enzym hinsichtlich einer Stabilisierung in den verschiedenen Lösemittelsystemen bewertet.

Stabilität in rein wässrigen Medien

Die adsorptive Immobilisierung führte zu einer ausgeprägten Erhöhung der SH-Stabilität in rein wässrigen Systemen (Abbildung 3.39).

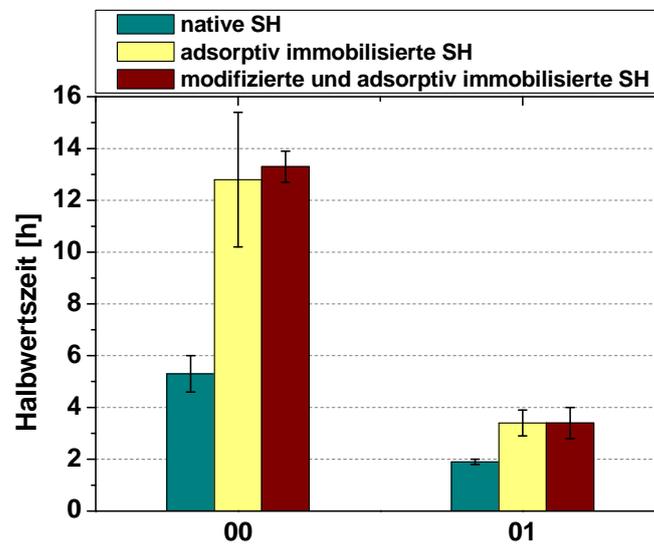


Abbildung 3.39 Stabilität der adsorptiv immobilisierten nativen und modifizierten SH in rein wässrigen Medien unter mechanischer Beanspruchung und ohne und Vergleich mit der nativen SH. [00-ohne Rühren, 01- Magnetprüher (400 Upm); 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

In reinem Puffer und ohne eine zusätzliche Durchmischung des Inkubationsansatzes betrug die Halbwertszeit der immobilisierten SH 12,8 ($\pm 2,6$) h, was einem Stabilisierungsfaktor von 2,4 entspricht. Die zusätzliche Modifizierung der SH mit mPEG führte zu einer ähnlich hohen, innerhalb der Standardabweichung liegenden Halbwertszeit von 13,3 ($\pm 0,6$) h. Wurde das rein wässrige Inkubationssystem zusätzlich gerührt, ergaben sich sowohl für die Immobilisate der nativen als auch der mPEGylierten SH Enzymstabilitäten von 3,4 h. Unter den gleichen Bedingungen betrug die Halbwertszeit der nativen SH nur 1,9 ($\pm 0,1$) h. Somit konnte auch unter diesen Bedingungen eine 1,8-fache Stabilisierung erzielt werden. Erwartungsgemäß ergaben sich für die chemische Modifizierung der SH mit mPEG und der zusätzlichen Immobilisierung keine additiven Effekte bezüglich einer Enzymstabilisierung, was mit den Ergebnissen für die Stabilität der chemisch modifizierten SH in rein wässrigen Medien (Kapitel 3.2.3), die keine Stabilisierung der SH ergaben, korreliert. Die gemessenen Halb-

wertszeiten für die SH-Immobilisate sind demzufolge allein auf die adsorptive Bindung an Amberlite™ FPA54 und der dadurch stabilisierten Enzymkonformation bzw. der erhöhten Rigidität des Proteins, die eine Entfaltung der dreidimensionalen Enzymstruktur verhindert, zurückzuführen. Die Ergebnisse stimmen zudem mit Literaturdaten überein, die die Erhöhung der Stabilität von verschiedenen Enzymen in rein wässrigen Medien durch deren adsorptive Interaktionen mit einem festen Trägermaterial beschrieben [Mateo *et al.*, 2007, Mateo *et al.*, 2000, Pan-Soo *et al.*, 2000].

Zusätzlich zu den Stabilitätsmessungen erfolgte die Bestimmung des Proteingehalts in jedem Inkubationssystem. Dabei war in beiden Fällen kein Protein nachweisbar. Somit kommt es selbst unter dem Einfluss von Scherkräften zu keinem messbaren *leaching* des Enzyms unter den betrachteten Bedingungen. Demzufolge wird kein Enzym von den Immobilisierungspartikeln ausgewaschen bzw. unter den gewählten Bedingungen tritt zunächst keine Desorption des Proteins ein. Das lässt darauf schließen, dass eine ausgeprägte Interaktion zwischen der SH und der Immobilisierungsmatrix stattfindet, was für technische Anwendungen von besonderem Interesse ist und nur selten bei der adsorptiven Bindung von Proteinen an ein Trägermaterial zu beobachten ist [Brady und Jordaan, 2009, Mateo *et al.*, 2007, Cao, 2005].

Stabilität in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen

Analog zu der Stabilität in rein wässrigen Medien ließ sich auch die Lösungsmittelstabilität der SH durch ihre adsorptive Immobilisierung signifikant erhöhen (Abbildung 3.40). So führte die Immobilisierung der nativen SH zu Halbwertszeiten von 0,6 ($\pm 0,1$) h, 2,8 ($\pm 0,4$) h und 0,7 ($\pm 0,1$) h in 10 % (v/v) DMF, DMSO bzw. Isopropanol. Verglichen mit der nativen SH konnten somit Stabilisierungsfaktoren von 6, 2,8, bzw. 7 erreicht werden. Vergleichbare Effekte wurden ebenfalls für verschiedene andere adsorptiv immobilisierte Enzyme und deren Stabilisierung gegenüber organischen Lösungsmitteln beschrieben [Mateo *et al.*, 2007]. Hierbei lässt sich der stabilisierende Effekt abermals auf die Erhöhung der Rigidität des Proteins durch dessen ionischer Interaktion mit einem festen Trägermaterial zurückführen. Wurde die SH vor ihrer Immobilisierung zudem mit mPEG chemisch modifiziert konnten die Halbwertszeiten nochmals deutlich erhöht werden. So betragen die Halbwertszeiten in diesem Fall 1,6 ($\pm 0,4$) h, 6,4 ($\pm 0,0$) h und 2,3 ($\pm 0,0$) h in Gegenwart von 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol, was signifikant höheren Stabilisierungsfaktoren von 16, 6,4 und 23

entspricht, wenn ein Vergleich mit den Immobilisaten der nativen SH erfolgt. Somit kommt es zu einer Addition der stabilisierenden Effekte, die durch beide Methoden, der chemischen Modifizierung und der adsorptiven Immobilisierung, eingeleitet werden können. Der beobachtete additive Effekt stützt sich zudem auf die Ergebnisse für die Stabilität der chemisch modifizierten SH (Kapitel 3.2.3), da auch schon die alleinige Modifizierung der SH mit mPEG zu einer ausgeprägten Stabilisierung gegenüber den untersuchten polaren organischen Lösemitteln führte.

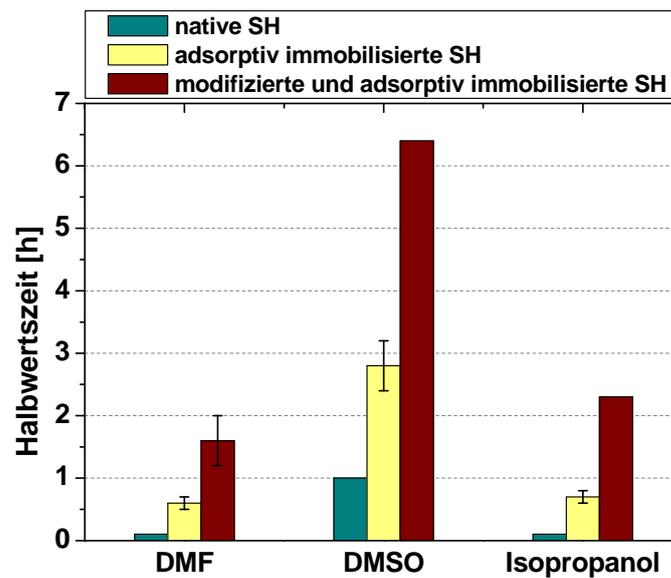


Abbildung 3.40 Stabilität der adsorptiv immobilisierten nativen und modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol und Vergleich mit der nativen SH. [Lösungsmittelkonzentration wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

Auch bei diesen Untersuchungen wurde für jedes Lösemittel der Proteingehalt in den Inkubationsansätzen bestimmt. Wie schon in den rein wässrigen Systemen zeigte sich, dass kein *leaching* des Enzyms während der Inkubation einsetzt. Somit kann auch in diesen Lösemittelsystemen auf eine ausgeprägte Interaktion zwischen der SH und dem Trägermaterial geschlossen werden, die ein Auswaschen des Proteins verhindert.

Stabilität in IL-Wasser-Gemischen

Die Untersuchung der Stabilität der SH-Immobilisate in den ILs [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄] lieferte diverse Ergebnisse (Abbildung 3.41).

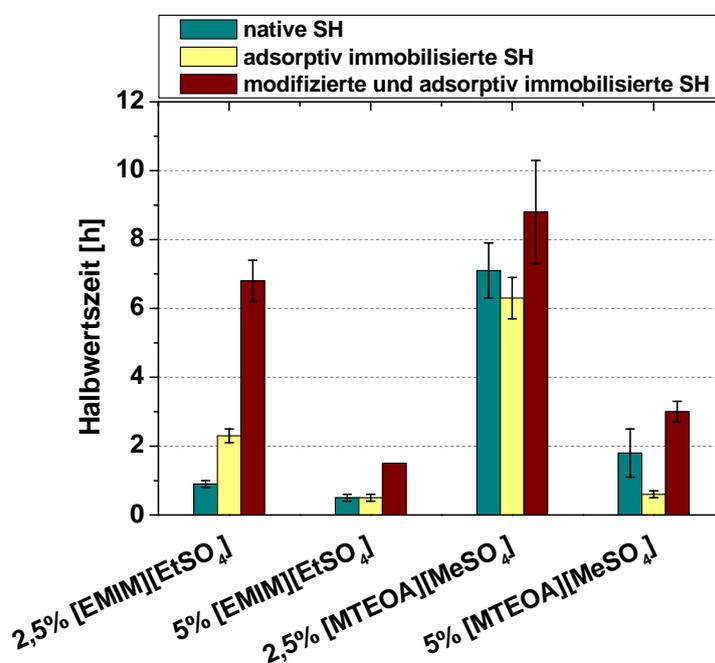


Abbildung 3.41 Stabilität der adsorptiv immobilisierten nativen und modifizierten SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄] und Vergleich mit der nativen SH. [IL-Konzentrationen wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

Die alleinige Immobilisierung der nativen SH führte zwar zu einer Verdopplung der Halbwertszeit in 2,5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄], bei einer weiteren Konzentrationserhöhung dieser IL auf 5 % (v/v) war dagegen keine Enzymstabilisierung mehr zu beobachten. Auch in 2,5 und 5 % (v/v) [MTEOA][MeSO₄] konnte keine erhöhte Halbwertszeit der adsorptiv immobilisierten SH bestimmt werden. Diese lag in 5 % (v/v) dieser IL sogar unter der des nativen Enzyms. Wurde die SH vor ihrer Immobilisierung jedoch zusätzlich modifiziert, betrug die Halbwertszeit der Immobilisate 6,8 (± 0,6) bzw. 1,5 (± 0,0) h in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] und 8,8 (± 1,5) bzw. 3 (± 0,3) h in 2,5 und 5 % (v/v) [MTEOA][MeSO₄]. Somit ließ sich SH-Stabilität in 2,5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] um einen Faktor von 7,6 und somit beachtlich erhöhen, wohingegen dieser Faktor in den anderen IL-Systemen wesentlich

kleiner ausfiel. Auch in den IL-Systemen konnte kein Protein bestimmt werden, weshalb es auch in diesen Medien zu keinem *leaching* der SH kommt.

Die gezeigten Ergebnisse deuten auf eine ungewöhnliche Interaktion zwischen dem kovalent gebundenen mPEG, der Immobilisierungsmatrix, den umgebenden ILs und dem Protein selbst hin, da keine eindeutigen Tendenzen bei Betrachtung der Halbwertszeiten der immobilisierten SH in den untersuchten IL-Systemen festgestellt werden konnten. Diese Wechselwirkungen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit vorrangig ionischer Natur. Zudem war der beobachtete Stabilisierungseffekt, der durch die chemische Modifizierung mit mPEG und der zusätzlichen Immobilisierung auf Amberlite™ FPA54 eingeleitet wurde, so nicht zu erwarten, da sowohl die alleinige chemische Modifizierung als auch ihre adsorptive Immobilisierung keinen stabilisierenden Einfluss auf die SH ausübten, eine Kombination aus beidem, wie gezeigt wurde, aber durchaus.

3.3.4 Rezyklierung der Immobilisate

Neben der Analyse der Aktivität und Stabilität der Immobilisate erfolgte darüber hinaus die Untersuchung der Rezyklierbarkeit der hergestellten SH-Immobilisate. Dazu wurden sowohl die immobilisierte native SH als auch die immobilisierte und zuvor chemisch modifizierte SH wiederholt bei der Reduktion von 1 mM NAD⁺ eingesetzt. Die jeweilige Reaktionsdauer betrug dabei drei Minuten, wobei die Immobilisate nach jeder Reaktion zunächst filtriert und gewaschen und dann bei einer erneuten Reaktion eingesetzt wurden. Zudem wurde der Reaktionsansatz kontinuierlich mittels Rühren bei 400 Upm durchmischt. Die ermittelten relativen Aktivitäten der immobilisierten SH nach jeder der insgesamt fünf durchgeführten Reaktionen sind in Abbildung 3.42 dargestellt. Dabei ließ sich zeigen, dass durch die adsorptive Immobilisierung der SH ein wiederholt einsetzbarer aktiver Katalysator bereitgestellt wird, es trotz dessen aber zu einer Deaktivierung des Enzyms unter Prozessbedingungen kommt. So verloren sowohl die Immobilisate der nativen SH als auch die Immobilisate der chemisch modifizierten SH nach jedem Reaktionsdurchlauf kontinuierlich ihre Aktivität. Die Aktivität der nativen immobilisierten SH bzw. des mPEGylierten immobilisierten Enzyms betrug nach der ersten Reaktion noch 97,7 (± 8,7) bzw. 98,5 (± 4,2) %, nach der zweiten Reaktion dann bereits nur noch 88,3 (± 3,5) bzw. 90,6 (± 3,3) %. Nach insgesamt vier Reaktionsdurchläufen besaßen beide Immobilisate dann nur noch 56,7 (± 8,5) % der ur-

sprünglichen Aktivität der nativen immobilisierten SH bzw. $62,7 (\pm 5,5) \%$ der ursprünglichen Aktivität der immobilisierten mPEGylierten SH.

Da eine zunehmende mechanische Instabilität der Partikel infolge der wirkenden Scherkräfte zu beobachten war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass daraus ein inaktivierender Einfluss auf die immobilisierte SH resultierte. Des Weiteren könnte der beobachtete Aktivitätsverlust durch das vorgenommene Waschen der Immobilisate zwischen den einzelnen Reaktionsdurchläufen und einem damit einhergehenden Enzymverlust hervorgerufen worden sein.

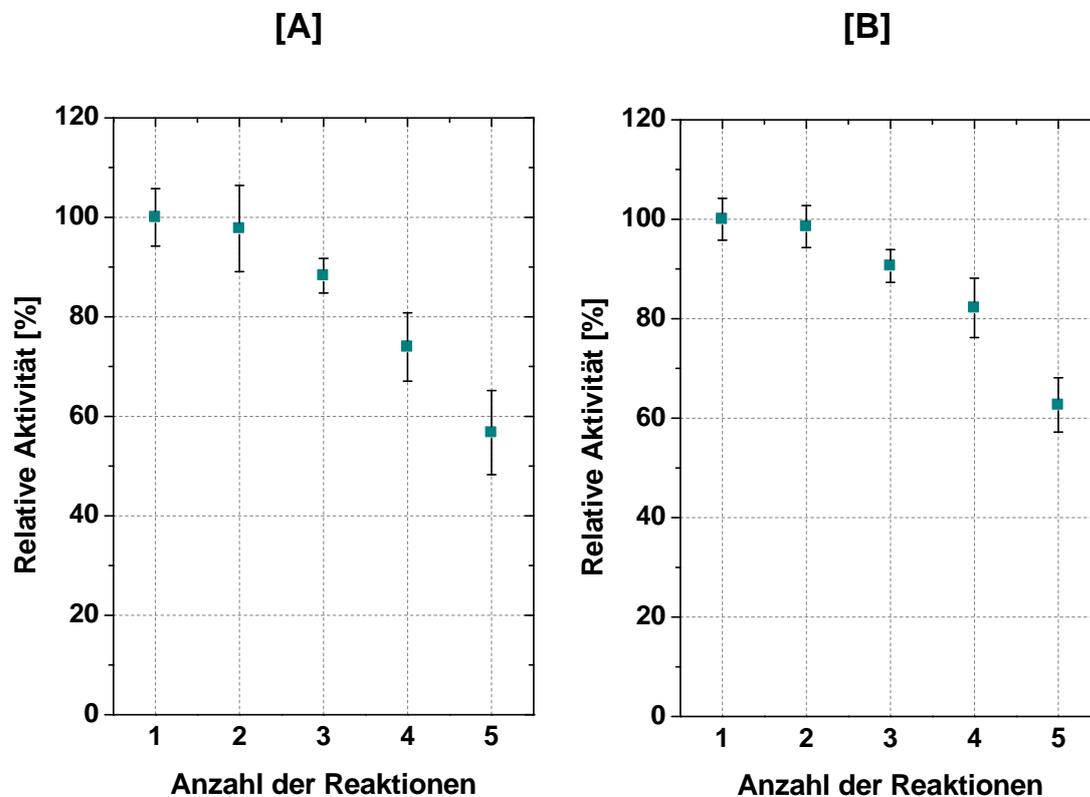


Abbildung 3.42 Aktivität der adsorptiv immobilisierten nativen [A] und modifizierten [B] SH während der Rezyklierung bei fünf Reaktionsdurchläufen. [0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 μM FMN]

3.3.5 Zusammenfassung

Anhand der adsorptiven Immobilisierung wurde die SH über verschiedene nicht-kovalente Wechselwirkungen, die unter anderem ionischer, hydrophiler oder hydrophober Natur sein

können, an einen geeigneten Träger (Amberlite™ FPA54) gebunden. Dadurch sollte die Proteinrigidität erhöht werden, um in der Folge eine Stabilisierung gegenüber deaktivierenden Einflüssen zu erreichen. Zugleich sollte auf diesem Weg ein rezyklierbares Enzympräparat bereitgestellt werden, welches eine ökonomischere Prozessführung bei möglichen technischen Anwendungen ermöglicht. Optimierungsuntersuchungen ergaben zunächst eine maximale Restaktivität von 48,9 % und eine Proteinbeladung von 93,4 % bei einem Enzym-Träger-Verhältnis von 1:2000 und einem pH-Wert von 8. Darüber hinaus kam es in keinem der untersuchten Medien zu einem leaching der SH, was in technischen Anwendungen von Vorteil ist. In rein wässrigen Medien und in jedem der untersuchten organischen Lösungsmittel zeigten die Immobilisate eine signifikant höhere Halbwertszeit als die native SH. Dabei wurden in rein wässrigen Medien Stabilisierungsfaktoren von bis zu 2,4 und in organischen Lösemitteln bis zu 7-fach erhöhte Halbwertszeiten bestimmt. Für die Immobilisierung der zuvor chemisch modifizierten SH ergaben sich vor allem in DMF, DMSO und Isopropanol additive Effekte, die zu einer weiteren Erhöhung der Enzymstabilität führten. In diesem Zusammenhang konnten beachtliche Stabilisierungsfaktoren von bis zu 23 erzielt werden. In den analysierten IL-Wasser-Gemischen konnten zwar verbesserte Enzymaktivitäten erhalten werden, jedoch lieferte die Untersuchung der Stabilität der SH-Immobilisate in diesen Medien diverse Resultate, die auf keine eindeutige Enzymstabilisierung schließen ließen. Im Vergleich zur reinen chemischen Modifizierung der SH mit mPEG (Kapitel 3.2) kann durch die zusätzliche adsorptive Immobilisierung des Enzyms eine wesentlich stärkere Stabilisierung der SH erzielt werden.

3.4 Stabilisierung der SH durch kovalente Immobilisierung

Die kovalente Bindung von Enzymen an geeignete Träger ist eine weitere bedeutende Methode innerhalb der Immobilisierung. Im Gegensatz zur adsorptiven Enzymimmobilisierung erfolgt hierbei die Ausbildung einer kovalenten und somit stabileren Bindung zwischen der Immobilisierungsmatrix und dem Protein, die zwar die direkte chemische Modifizierung des Enzyms zur Folge hat, dafür aber häufig ein *leaching* des Proteins verhindert und zudem zu einer stärkeren Enzymstabilisierung führt [Brady und Jordaan, 2009, Sheldon, 2007, Cao, 2005]. Der stabilisierende Effekt beruht dabei im Allgemeinen auf der Erhöhung der Enzymrigidität [Iyer und Ananthanarayan, 2008, Fernández-Lafuente *et al.*, 1999].

Auch die kovalente Immobilisierung der SH sollte in erster Linie ihrer Stabilisierung gegenüber deaktivierenden Einflüssen dienen. Diese Einflüsse umfassten, wie auch zuvor, die mechanische Beanspruchung in rein wässrigen Medien und die Zugabe der organischen Lösemittel DMF, DMSO und Isopropanol, sowie der ILs [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄]. Wie auch schon bei der adsorptiven Immobilisierung der SH erfolgte die Untersuchung der Aktivität und Stabilität der erhaltenen Immobilisate in den verschiedenen Reaktionsmedien, wobei es sich zum einen um die immobilisierte native SH handelte und zum anderen um das immobilisierte und zuvor chemisch modifizierte Enzym. Dies sollte, wie schon zuvor, der Erfassung möglicher additiver Effekte beider Stabilisierungsmethoden dienen. Zudem wurde ebenfalls die Rezyklierbarkeit der Immobilisate analysiert. Zwar wurde die native SH bereits auf verschiedenen Trägermaterialien kovalent immobilisiert, jedoch erfolgte bislang noch keine systematische Studie, in der eine Bewertung der Enzymstabilisierung unter den in dieser Arbeit untersuchten Inkubationsbedingungen vorgenommen wurde [Deloggio und Graves, 1988, Popov *et al.*, 1986, Payen *et al.*, 1983, Danielson *et al.*, 1982, Egerer und Simon, 1982].

Da die Eignung von Amberlite-Trägern zur kovalenten Immobilisierung bislang für eine Vielzahl verschiedener Proteine beschrieben wurde, erfolgte die kovalente Bindung der SH an das bereits bei der adsorptiven SH-Immobilisierung verwendete makroporöse Harz AmberliteTM FPA54 [Kumari und Kayastha, 2011, Dwevedi und Kayastha, 2009, Fazlena *et al.*, 2006, Anita *et al.*, 1997]. Dieses verfügt über aktivierbare Aminofunktionen an seiner Oberfläche.

Die kovalente Bindung der SH erfolgte in einer zweistufigen Reaktion, die mechanistisch wie in Abbildung 3.43 dargestellt abläuft. Hierbei werden zunächst die Funktionalitäten an der Trägeroberfläche aktiviert, wozu im Fall der Immobilisierung der SH das häufig eingesetzte hochreaktive Glutardialdehyd diente. Dabei kommt es zur Bildung eines Enamins zwischen den sekundären Aminogruppen des Trägers und einer der beiden Aldehydfunktionen des bifunktionalen Aktivierungsreagenzes. Im zweiten Schritt erfolgt dann die Iminbildung zwischen der zweiten Aldehydfunktion des Glutardialdehyds und den verfügbaren ϵ -Lysin-Aminosäuren des Proteins.

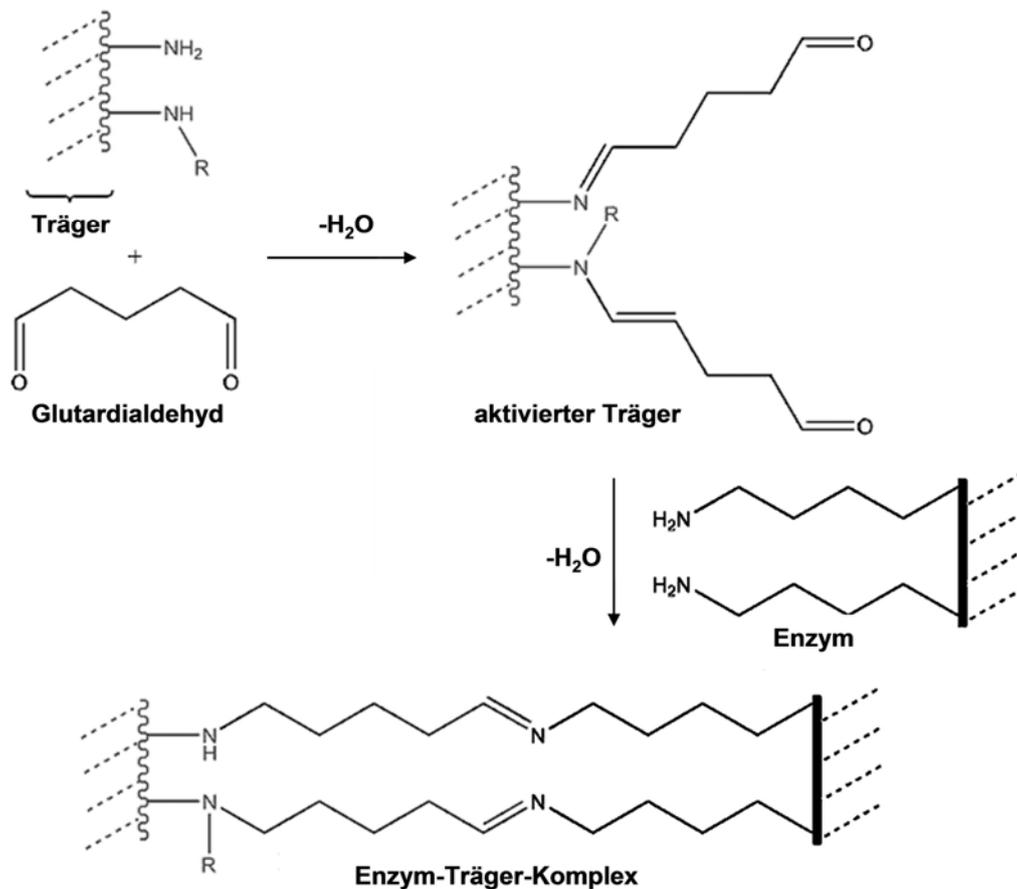


Abbildung 3.43 Reaktionsschema der kovalenten Bindung eines Enzyms an einen festen Träger.

3.4.1 Optimierung des Immobilisierungsverfahrens

Zunächst erfolgte eine Optimierung der kovalenten Immobilisierung der nativen SH in Abhängigkeit von den in Tabelle 3.3 aufgeführten Parametern, da diese einen maßgeblichen Einfluss auf die Aktivität und Proteinbeladung von Immobilisaten ausüben [Mateo *et al.*, 2007 Cao, 2005]. Dazu wurde jeder der Parameter in einem definierten Bereich, der ebenfalls in Tabelle 3.3 angegeben ist, variiert und die verbliebene Aktivität der SH sowie die Menge des kovalent gebundenen Proteins bestimmt. Die Immobilisierung erfolgte stets bei Raumtemperatur unter Verwendung eines 0,05 M Tris/HCl-Puffers. Der pH-Wert während der Immobilisierung betrug zu Beginn 8,0, die Glutardialdehydkonzentration 2,5 % (v/v), die Inkubationszeit für die Trägeraktivierung sowie die Inkubationszeit des Enzyms jeweils 1 Stunde und das Enzym-Träger-Verhältnis 1:2000. Zur Optimierung des Immobilisierungsverfahrens wurden dann die jeweiligen Parameter nacheinander variiert.

Tabelle 3.3 Parameter für die Optimierung der kovalenten Immobilisierung der SH.

Parameter	Variationsbereich
pH-Wert	7,0 und 8,0
Glutardialdehydkonzentration	0,5 - 5 % (v/v)
Aktivierungszeit der Träger	0,5 - 2 h
Inkubationszeit des Enzyms	0,25 - 2 h
Enzym-Träger-Verhältnis	1:500 - 1:4000

Da der während der Immobilisierung vorherrschende pH-Wert Einfluss auf die für eine kovalente Bindung notwendige Nucleophilie der Trägerfunktionalitäten und des Protonierungsgrades der Aminosäureseitenketten ausübt, wurde dieser Parameter zunächst variiert [Whitesides *et al.*, 2006, Cao, 2005]. Dazu wurden jeweils die Proteinbeladung und Aktivität der Immobilisate nach der Immobilisierung bei pH 7,0 und 8,0 bestimmt (Abbildung 3.44). Aufgrund der hohen Instabilität der SH bei pH-Werten über 8 wurde auf eine Untersuchung in diesem Bereich verzichtet.

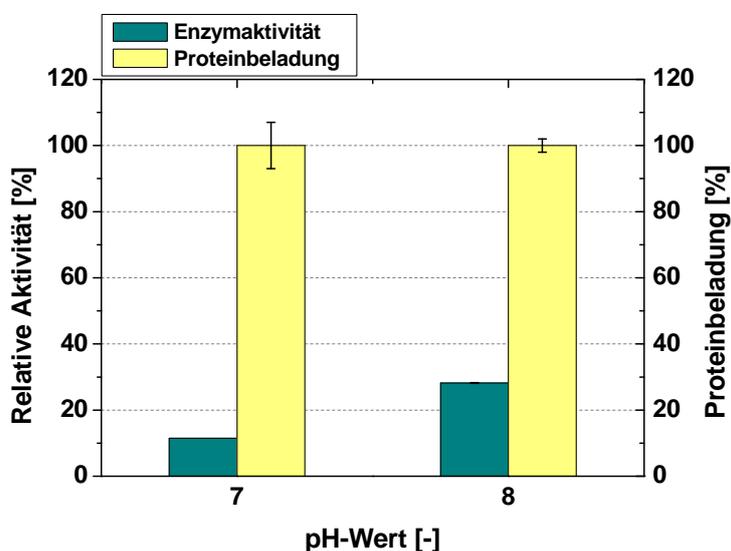


Abbildung 3.44 Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei pH 7,0 und 8,0. [pH-Werte wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer, RT, 2,5 % (v/v) Glutardialdehyd, Enzym-Träger-Verhältnis: 1:2000]

Es zeigte sich, dass die Menge der trägergebundenen SH bei beiden pH-Werten 100 % betrug. Im Gegensatz dazu, übte der pH-Wert während der Immobilisierung aber einen deutlichen Einfluss auf die Aktivität der SH aus, wobei die Immobilisate bei einem pH-Wert von 7,0 11,5 ($\pm 0,0$) % und bei einem pH-Wert von 8,0 28,2 ($\pm 0,1$) % der ursprünglichen Aktivität der nativen SH besaßen. Aufgrund der in Kapitel 3.1.2 ermittelten höheren Stabilität der SH bei einem pH von 7,0, ist auszuschließen, dass die geringere Aktivität der Immobilisate nach der Immobilisierung bei diesem pH-Wert durch eine Deaktivierung der SH verursacht wurde. Vielmehr scheint die Immobilisierung bei pH 8,0 zu einer aktivierten Konformation der trägergebundenen SH geführt zu haben, weshalb die Enzymimmobilisierung im Weiteren auch bei diesem pH-Wert durchgeführt wurde.

Da die Konzentration des Aktivierungsreagenzes Glutardialdehyd die Anzahl der verfügbaren Bindestellen für die Trägerbindung des Enzyms bestimmt, wurde dieser Einflussparameter im nächsten Schritt der Optimierungsanalyse untersucht [Singh *et al.*, 2011]. Die dabei erhaltenen Ergebnisse der Aktivität sowie der Proteinbeladung der Immobilisate sind in Abbildung 3.45 dargestellt.

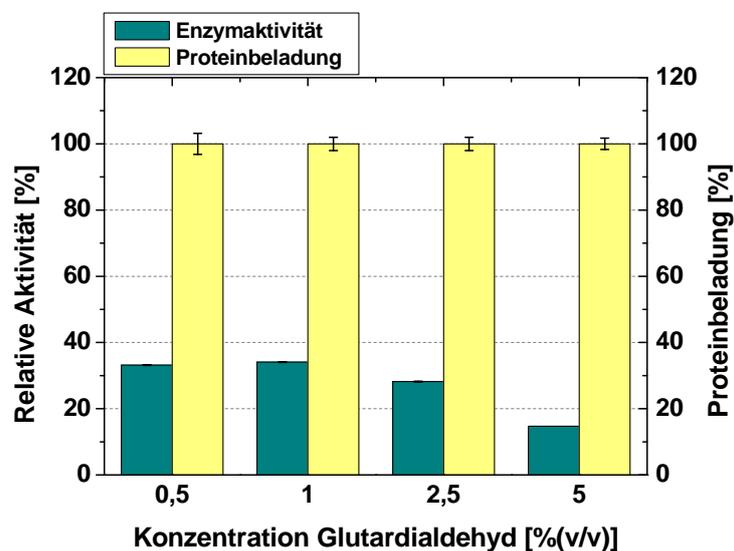


Abbildung 3.45 Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei verschiedenen Glutardialdehydkonzentrationen. [Glutardialdehydkonzentrationen wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), RT, Enzym-Träger-Verhältnis: 1:2000]

Die Variation der Glutardiadehydkonzentration zeigte keinen messbaren Einfluss auf die Proteinbeladung, da stets 100 % der eingesetzten SH kovalent am Träger gebunden wurden. Im Gegensatz dazu nahm die Aktivität der Immobilisate bei einer Verringerung der Glutardialdehydkonzentration von 2,5 auf 1 % (v/v) zunächst zu (34,1 (\pm 0,1) %), wobei ein weiteres Herabsetzen auf 0,5 % (v/v) dann zu einem langsamen Aktivitätsverlust führte. Die geringste Aktivität von nur 14,7 (\pm 0,0) % besaßen die SH-Immobilisate jedoch bei einer Glutardialdehydkonzentration von 5 % (v/v). Dieser Aktivitätsverlust kann auf die Bildung von Enzymagglomeraten und der daraus resultierenden Verzerrung der Enzymstruktur bei hohen Glutardialdehydkonzentrationen zurückgeführt werden [Dwevedi und Kayastha, 2009]. Die weitere Aktivierung der Träger erfolgte somit bei einer Glutardialdehydkonzentration 1 % (v/v).

Die Veränderung der Inkubationszeit für die Aktivierung des Trägers zeigte weder einen Einfluss auf die Proteinbeladung noch auf die Aktivität der SH-Immobilisate (Abbildung 3.46).

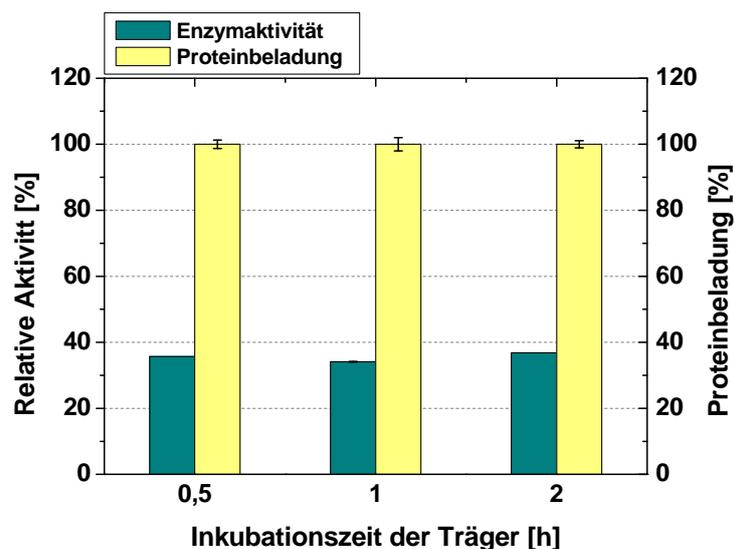


Abbildung 3.46 Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei verschiedenen Inkubationszeiten des Trägers. [Inkubationszeiten des Trägers wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), RT, 2,5 % (v/v) Glutardialdehyd, Enzym-Träger-Verhältnis: 1:2000]

So genügte bereits eine Aktivierungszeit von einer halben Stunde um eine vergleichbar hohe Aktivität der SH-Immobilisate von 35,7 (\pm 0,0) % sowie eine 100 %-ige Proteinbeladung wie

nach 1 oder 2 Stunden zu erzielen. Somit erfolgte die Trägeraktivierung weiterhin nur noch über eine Zeitdauer von 30 Minuten.

Ähnliche Tendenzen wie bei der Dauer der Trägeraktivierung ergaben sich für den Einfluss der Inkubationszeit des Enzyms auf die Proteinbeladung und die Aktivität der Immobilisate (Abbildung 3.47). So zeigte sowohl die Erhöhung auf 2 Stunden als auch die Verringerung der Inkubationszeit auf nur 15 Minuten keinen merklichen Effekt auf die beiden Größen. Infolgedessen kann eine kurze Inkubationszeit für den Enzymbindungsschritt abgeleitet werden, was eine zeiteffiziente Immobilisierung der SH ermöglicht. Darauf basierend wurde für die weiteren Untersuchungen die Inkubationszeit der SH auf 15 Minuten reduziert. Dabei besaßen die Immobilisate eine relative Aktivität von 39,3 ($\pm 0,0$) %.

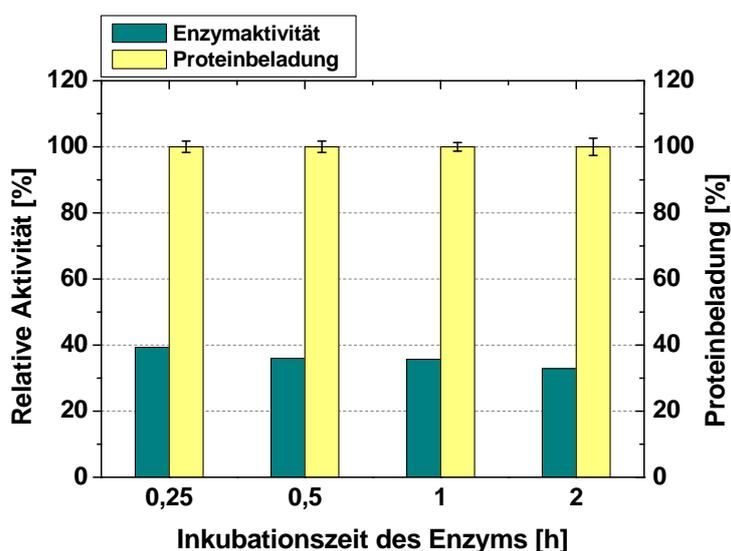


Abbildung 3.47 Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei verschiedenen Inkubationszeiten des Enzyms. [Inkubationszeiten des Enzyms wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), RT, 2,5 % (v/v) Glutardialdehyd, Enzym-Träger-Verhältnis: 1:2000]

Wie erwartet, beeinflusste die Variation des Enzym-Träger-Verhältnisses sowohl die Proteinbeladung als auch die Aktivität der SH-Immobilisate (Abbildung 3.48). Dabei sank die Enzymaktivität sowie die Menge gebundenen Proteins bei einer Erhöhung der Enzymmenge. Bei einem Enzym-Träger-Verhältnis von 1:500 konnten somit nur noch 47,7 ($\pm 1,4$) % der eingesetzten SH am Träger gebunden werden, wobei die relative Aktivität der Immobilisate

nur noch 9,6 ($\pm 0,0$) % betrug. Eine Verringerung der Enzymmenge von 0,1 auf 0,05 mg (Enzym-Träger-Verhältnis: 1:4000) führte hingegen zu einer geringfügigen Abnahme der Enzymaktivität von 39,3 ($\pm 0,0$) % auf 34,3 ($\pm 0,0$) %. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich daraus schließen, dass bei einem Enzym-Träger-Verhältnis von 1:2000 die gesamte Trägeroberfläche mit gebundener SH gesättigt ist. Somit kann bei einer weiteren Erhöhung der Enzymmenge dieses nicht mehr an der Matrix gebunden werden. Demnach ergibt sich ein optimales Enzym-Träger-Verhältnis von 1:2000, wobei die Proteinbeladungsdichte $0,5 \cdot 10^{-3}$ mg SH pro mg Amberlite™ FPA54 beträgt. Dieser Wert entspricht jenem, der bereits bei der adsorptiven Immobilisierung ermittelt wurde. Die erfolgreiche kovalente Immobilisierung lässt sich an dieser Stelle jedoch durch die Variation der Glutardialdehydkonzentration sicherstellen, da dieser Parameter einen deutlichen Einfluss auf die Aktivität der erhaltenen Immobilisate zeigte. Im Fall einer vorrangig adsorptiven Trägerbindung der SH hätte dieser Parameter anderenfalls zu keiner Veränderung der Aktivität der Immobilisate führen dürfen.

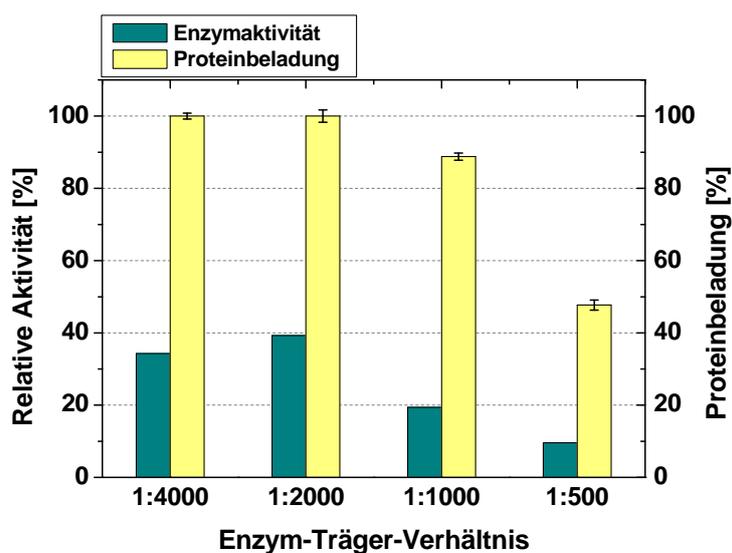


Abbildung 3.48 Enzymaktivität und Proteinbeladung nach der Immobilisierung der SH auf Amberlite™ FPA54 bei verschiedenen Enzym-Träger-Verhältnissen. [Enzym-Träger-Verhältnisse wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), RT, 2,5 % (v/v) Glutardialdehyd]

Letztlich betrug die maximale Aktivität der SH-Immobilisate 39,3 ($\pm 0,0$) %, wobei die Gesamtmenge der eingesetzten SH am Träger gebunden wurde. Der optimale pH-Wert während der Immobilisierung betrug dabei 8,0, die Glutardialdehydkonzentration 1 % (v/v)

und das Enzym-Träger-Verhältnis 1:2000. Zudem konnte gezeigt werden, dass es lediglich einer Inkubationszeit von 30 Minuten bedarf, um eine vollständige Aktivierung der Immobilisierungsmatrix zu erreichen. Die anschließende kovalente Bindung der SH an Amberlite™ FPA54 beanspruchte zudem nur 15 Minuten.

3.4.2 Aktivität der Immobilisate

In Analogie zu den Untersuchungen der Aktivität der chemisch modifizierten SH (Kapitel 3.2.2) sowie des adsorptiv immobilisierten Enzyms (Kapitel 3.3.2) erfolgte die Bestimmung der Aktivität der kovalent immobilisierten SH in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen und in IL-Wasser-Gemischen. Dabei wurde die relative Aktivität für das native kovalent immobilisierte Enzym sowie für die immobilisierte und zuvor chemisch modifizierte SH ebenfalls bei 35 °C und pH 8,0 unter Verwendung eines 0,05 M Tris/HCl-Puffers ermittelt und hinsichtlich einer Aktivitätserhöhung bewertet.

Aktivität in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen

Die kovalente Immobilisierung auf Amberlite™ FPA54 führte zu einer deutlichen Erhöhung der Aktivität der SH in Gegenwart von polaren organischen Lösungsmitteln (Abbildung 3.49). So betragen die relativen Aktivitäten der kovalent immobilisierten nativen SH 98,9 (\pm 2,2) %, 109,6 (\pm 5,0) % und 82,4 (\pm 3,0) % in 10 % (v/v) DMF, DMSO bzw. Isopropanol. Verglichen mit der nativen SH entspricht dies einer Aktivitätserhöhung um 92, 59 bzw. 60 %. Somit verursachten die drei betrachteten Lösemittel nur noch eine geringe Enzymdeaktivierung bzw. im Fall von DMSO sogar eine Aktivierung der SH, wenn diese kovalent immobilisiert im Reaktionsansatz vorlag. Diese verringerte Sensitivität der SH gegenüber polaren organischen Lösungsmitteln ist auf die erhöhte Enzymrigidität zurückzuführen, die aus der kovalenten Bindung des Proteins an einen festen Träger resultiert und auch schon für andere Enzyme beschrieben wurde [Wan *et al.*, 2010, Qigang *et al.*, 2004]. Der beobachtete aktivierende Einfluss von DMSO auf die trägergebundene SH kann im Zusammenhang mit Wechselwirkungen des polaren Lösemittels mit den geladenen Aminosäuren des Enzyms stehen, die in der Folge zu erhöhten Reaktivitäten führen [Azevedo *et al.*, 2001].

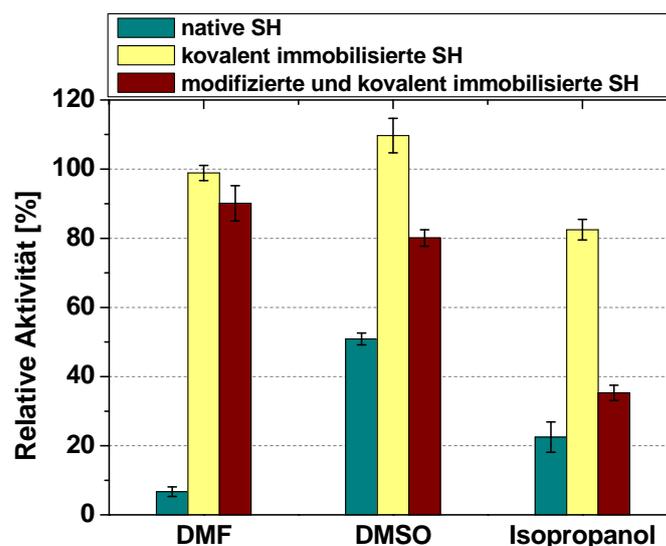


Abbildung 3.49 Aktivität der kovalent immobilisierten nativen und modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol und Vergleich mit der nativen SH. [Lösungsmittelkonzentration wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 µM FMN]

Wurde die native SH vor ihrer kovalenten Bindung an Amberlite™ FPA54 zusätzlich chemisch modifiziert, besaßen die dabei entstandenen Immobilisate geringere Aktivitäten von 90,1 (± 5,1) %, 80,1 (± 2,4) % und nur 35,3 (± 2,2) % in 10 % (v/v) DMF, DMSO bzw. Isopropanol. Die verringerte Aktivität der immobilisierten und zuvor modifizierten SH lässt sich auf eine Abnahme der Enzymrigidität und der daraus resultierenden erhöhten Sensitivität der SH-Immobilisate gegenüber deaktivierenden Einflüssen zurückführen. Als Ursache dafür kann die verringerte Anzahl der zur Verfügung stehenden Bindestellen für die Bildung des Enzym-Träger-Komplexes angenommen werden, da die dafür erforderlichen Aminofunktionen von Lysin durch bereits kovalent gebundene mPEG-Moleküle blockiert sind.

Aktivität in IL-Wasser-Gemischen

Mittels der kovalenten Bindung der SH an Amberlite™ FPA54 ließen sich auch in den untersuchten IL-Wasser-Gemischen wesentlich höhere Aktivitäten erzielen (Abbildung 3.50). Hierbei besaßen die Immobilisate der nativen SH Aktivitäten von 162,6 (± 5,8) %, 163,2 (± 5,6) %, 134,1 (± 0,4) % und 142,9 (± 5,7) % in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] bzw. 2,5

und 5 % (v/v) [MTEOA][MeSO₄]. Verglichen mit der Aktivität der nativen SH in den beiden ILs entspricht dies einer deutlichen Aktivitätszunahme. Somit führte die erhöhte Rigidität der SH infolge ihrer Immobilisierung auch in diesen Lösemittelsystemen zu einer Verringerung der Enzymsensitivität gegenüber der Gegenwart der untersuchten ILs und stimmt damit mit Resultaten anderer Enzyme überein [Persson und Bornscheuer, 2003]. Zudem zeigten die Immobilisate der zuvor chemisch modifizierten SH wiederholt geringere Aktivitäten als die Immobilisate des nativen Enzyms in den IL-Wasser-Gemischen. Auch in diesem Fall ist dieser Effekt auf die geringere Enzymrigidität infolge der Bindung von mPEG an der Proteinoberfläche und dem damit einhergehenden verringerten Anteil der Enzym-Träger-Bindungen zurückzuführen.

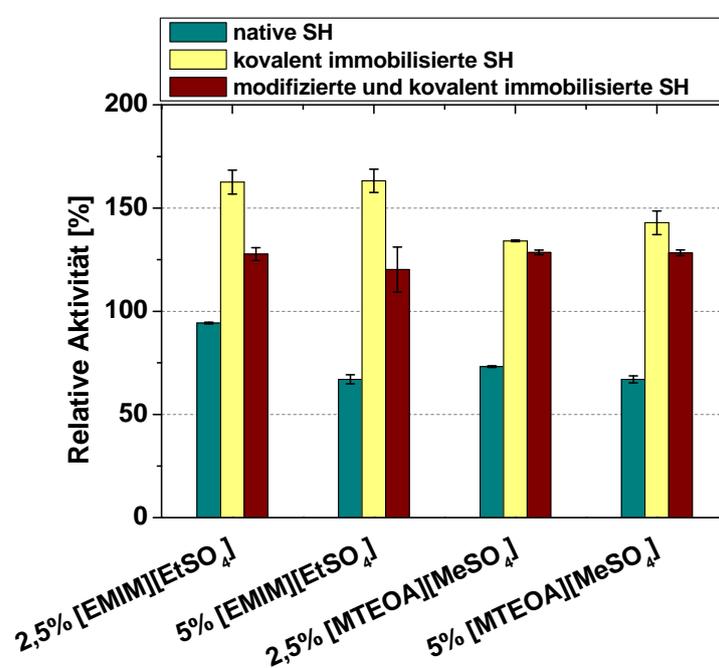


Abbildung 3.50 Aktivität der kovalent immobilisierten nativen und modifizierten SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄] und Vergleich mit der nativen SH. [IL-Konzentrationen wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 μM FMN]

3.4.3 Stabilität der Immobilisate

Die Untersuchung der Stabilität der SH-Immobilisate erfolgte ebenfalls in rein wässrigen Medien, in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen und in IL-Wasser-Gemischen. Die Inkubations-

bedingungen betragen wie auch schon bei der nativen, chemisch modifizierten und adsorptiv immobilisierten SH stets 35 °C und pH 8,0 unter Verwendung eines 0,05 M Tris/HCl-Puffers. Die ermittelten Halbwertszeiten wurden sowohl für das immobilisierte native als auch für das immobilisierte und zuvor modifizierte Enzym hinsichtlich einer Stabilisierung in den verschiedenen Lösemittelsystemen bewertet.

Stabilität in rein wässrigen Medien

Die kovalente Bindung an Amberlite™ FPA54 führte zu einer signifikanten Erhöhung der SH-Stabilität in rein wässrigen Systemen (Abbildung 3.51).

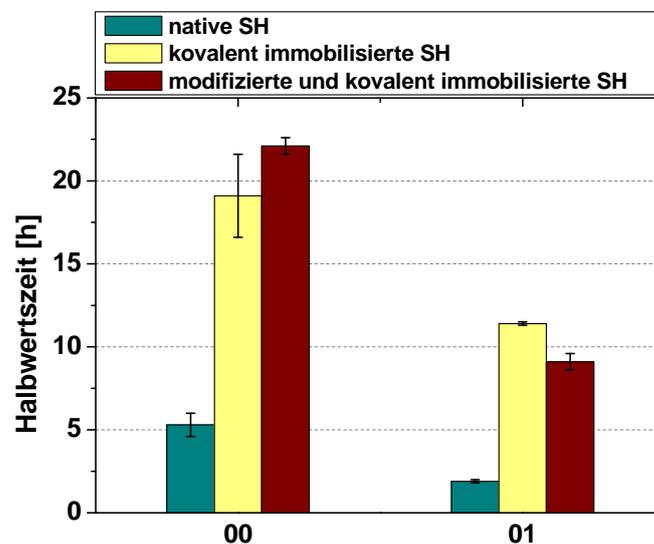


Abbildung 3.51 Stabilität der kovalent immobilisierten nativen und modifizierten SH in rein wässrigen Medien unter mechanischer Beanspruchung und ohne und Vergleich mit der nativen SH. [00-ohne Rühren, 01-Magnetrührer (400 Upm); 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

Die Halbwertszeit der immobilisierten nativen SH und die der immobilisierten und zuvor chemisch modifizierten SH betragen 19,1 ($\pm 2,5$) bzw. 22,1 ($\pm 4,2$) h in reinem Puffer, ohne dass die Immobilisate einer mechanischen Beanspruchung ausgesetzt wurden. Bei einem Vergleich der gemessenen Halbwertszeiten mit denen der nativen SH ergaben sich Stabilisierungsfaktoren von 3,6 bzw. 4,2 für die immobilisierte native bzw. die immobilisierte mPEGylierte SH. Wurde das Inkubationssystem zusätzlich gerührt und somit eine mechani-

sche Beanspruchung der Immobilisate herbeigeführt, ließen sich Stabilisierungsfaktoren von 6 bzw. 4,8 für die immobilisierte native bzw. die immobilisierte mPEGylierte SH erzielen. Somit konnte die mechanische Stabilität der SH im Zuge der kovalenten Immobilisierung bedeutend erhöht werden, wie es auch schon für andere Enzyme beschrieben wurde [Kumari und Kayastha, 2011, Bolivar *et al.*, 2006]. Der beobachtete stabilisierende Effekt lässt sich dabei ebenfalls auf die allgemeine Erhöhung der Enzymrigidität infolge der Immobilisierung zurückführen [Iyer und Ananthanarayan, 2008, Fernández-Lafuente *et al.*, 1999]. Des Weiteren zeigte die zusätzliche chemische Modifizierung keinen Einfluss auf die Stabilität der SH-Immobilisate. Ein Vergleich dieser Resultate mit früheren Ergebnissen für die Immobilisierung der SH gestaltet sich an dieser Stelle schwierig, da die damaligen Stabilitätsuntersuchungen unter abweichenden Bedingungen durchgeführt wurden und zudem keine Quantifizierung der Enzymstabilität über die Halbwertszeit erfolgte [Deloggio und Graves, 1988, Popov *et al.*, 1986, Payen *et al.*, 1983, Danielson *et al.*, 1982, Egerer und Simon, 1982].

Stabilität in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen

Die kovalente Immobilisierung führte zu einer beachtlichen Erhöhung der Lösungsmittelstabilität der SH (Abbildung 3.52). Die Halbwertszeiten der Immobilisate der nativen SH betrugen 13,9 (\pm 0,5) h, 28,7 (\pm 4,9) h und 15,9 (\pm 1,0) h in 10 % (v/v) DMF, DMSO bzw. Isopropanol, was verglichen mit dem nativen Enzym beachtlichen Stabilisierungsfaktoren von 139, 28,7, bzw. 159 entspricht. Ähnliche stabilisierende Effekte der kovalenten Immobilisierung wurden bislang auch für verschiedene andere Enzyme in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln beschrieben [Betancor *et al.*, 2006, Bolivar *et al.*, 2006, Hidalgo *et al.*, 2003, Sheffield *et al.*, 1994]. Wurde die SH vor ihrer kovalenten Immobilisierung zusätzlich mit mPEG modifiziert, besaßen die Immobilisate geringere Halbwertszeiten von 9,9 (\pm 0,1) h, 17,1 (\pm 0,3) h und 14,9 (\pm 1,4) h in 10 % (v/v) DMF, DMSO bzw. Isopropanol. Die in diesem Fall beobachtete verminderte Stabilität der SH-Immobilisate lässt sich wiederholt darauf zurückführen, dass das immobilisierte und zuvor chemisch modifizierte Enzym eine geringere Enzymrigidität aufweist als das immobilisierte native Enzym. Da in dem untersuchten Bereich der Lösungsmittelstabilität der SH bislang noch keine Studien durchgeführt wurden, ist ein Vergleich der gezeigten Ergebnisse mit entsprechenden Literaturdaten nicht möglich.

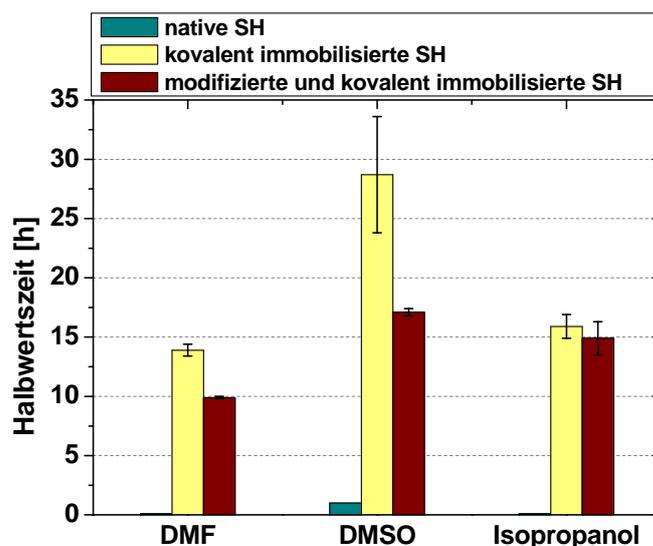


Abbildung 3.52 Stabilität der kovalent immobilisierten nativen und modifizierten SH in 10 % (v/v) DMF, DMSO und Isopropanol und Vergleich mit der nativen SH. [Lösungsmittelkonzentration wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

Stabilität in IL-Wasser-Gemischen

Auch in den gewählten IL-Wasser-Gemischen wies die kovalent immobilisierte SH bedeutend höhere Halbwertszeiten als das native Enzym auf (Abbildung 3.53). Hierbei konnten für das immobilisierte native Enzym beachtlich hohe Halbwertszeiten von 15,5 (\pm 0,9) h und 4,4 (\pm 0,5) h bzw. 17,5 (\pm 0,4) h und 16,9 (\pm 1,5) h ermittelt werden, wenn jeweils 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] bzw. 2,5 und 5 % (v/v) [MTEOA][MeSO₄] zum Inkubationsansatz gegeben wurden. Die dabei erhaltenen Stabilisierungsfaktoren betragen 17,2 und 8,8 bzw. 2,5 und 9,4. Die zusätzliche chemische Modifizierung der SH-Immobilisate führte wiederholt zu einer Abnahme der Halbwertszeiten der rein kovalent immobilisierten SH. Folglich betragen die Stabilisierungsfaktoren nur noch 13,2 und 11,8 bzw. 1,7 und 5,3 in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] bzw. 2,5 und 5 % (v/v) [MTEOA][MeSO₄]. Auch diese Ergebnisse lassen auf die Abnahme der Rigidität der immobilisierten SH infolge der zusätzlichen chemischen Modifizierung schließen.

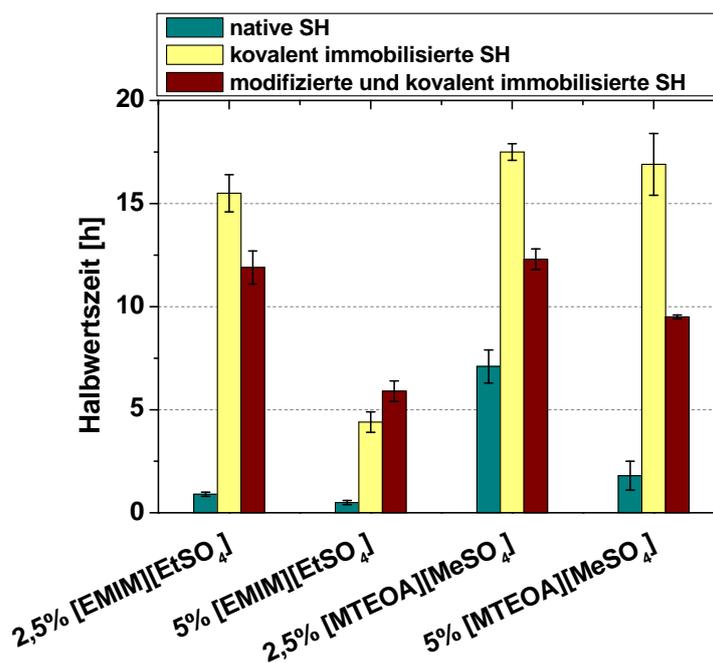


Abbildung 3.53 Stabilität der kovalent immobilisierten nativen und modifizierten SH in 2,5 und 5 % (v/v) [EMIM][EtSO₄] und [MTEOA][MeSO₄] und Vergleich mit der nativen SH. [IL-Konzentrationen wie angegeben, 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C]

3.4.4 Rezyklierung der Immobilisate

Im Anschluss an die Untersuchung der Aktivität und Stabilität der kovalent immobilisierten SH erfolgte die Bestimmung der Rezyklierbarkeit der Immobilisate. Dazu wurden sowohl die immobilisierte native SH als auch die immobilisierte und zuvor chemisch modifizierte SH wiederholt bei der Reduktion von 1 mM NAD⁺ eingesetzt. Die dabei ermittelten relativen Aktivitäten der immobilisierten SH nach jeder der insgesamt fünf durchgeführten Reaktionen sind in Abbildung 3.54 dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivität beider Immobilisate nach jedem Reaktionsdurchlauf kontinuierlich abnimmt. So betrug die relative Aktivität der immobilisierten nativen SH bzw. des immobilisierten und mPEGylierten Enzyms nach der ersten Reaktion zwar noch 100,3 (± 3,9) bzw. 99,3 (± 4,2) %. Während der fünften Reaktion betrug die relative Aktivität dann aber nur noch 60,2 (± 5,3) bzw. 63,7 (± 5,4) %. Somit kam es auch im Rahmen der Rezyklierung der kovalent immobilisierten SH zu einer Deaktivierung der Immobilisate. Da auch bei der Untersuchung der Rezyklierbarkeit der kovalent immobilisierten SH eine zunehmende mechanische Instabilität der AmberliteTM FPA54-

Partikel infolge der permanent wirkenden Scherkräfte zu beobachten war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass daraus ein inaktivierender Einfluss auf die immobilisierte SH resultierte. Des Weiteren könnte der beobachtete Aktivitätsverlust ebenfalls durch das vorgenommene Waschen der Immobilisate zwischen den einzelnen Reaktionsdurchläufen und einem damit einhergehenden Enzymverlust hervorgerufen worden sein.

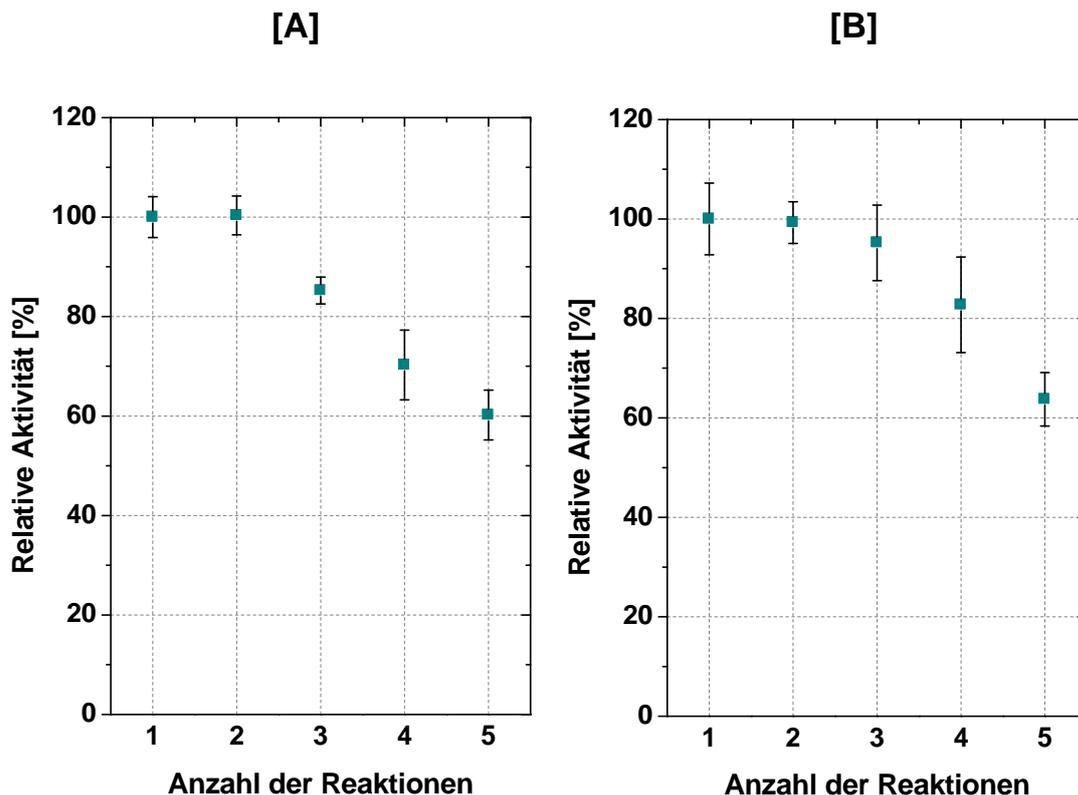


Abbildung 3.54 Aktivität der kovalent immobilisierten nativen [A] und modifizierten [B] SH während der Rezyklierung bei fünf Reaktionsdurchläufen. [0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0), 35 °C, 1 mM NAD⁺, 1 μM FMN]

3.4.5 Zusammenfassung

Durch die kovalente Immobilisierung der SH sollte eine weitere Erhöhung ihrer Stabilität gegenüber inaktivierenden Einflüssen erreicht werden, da die kovalente Bindung an einen geeigneten Träger (AmberliteTM FPA54) gewöhnlich zu einer weiteren Zunahme der Proteinrigidität führt. Optimierungsuntersuchungen ergaben eine maximale Restaktivität von 39,3 % und eine vollständige Proteinbeladung der Träger bei einem pH-Wert von 8, einer Glutaraldehydkonzentration von 1 % (v/v) und einem Enzym-Träger-Verhältnis von 1:2000.

Zudem genügte eine sehr kurze Inkubationszeit der Träger mit Glutardialdehyd (0,5 h) als auch des Enzyms (0,25 h) während seiner Immobilisierung um diese maximale Enzymaktivität und Proteinbeladung zu erzielen. Verglichen mit der chemischen Modifizierung mit mPEG (Kapitel 3.2) und der adsorptiven Immobilisierung (Kapitel 3.3) führte die kovalente Immobilisierung in allen betrachteten Lösemittelsystemen zu einer deutlich stärkeren Stabilisierung der SH. In diesem Zusammenhang konnten beachtliche Stabilisierungsfaktoren von bis zu 159 in 10 % (v/v) Isopropanol ermittelt werden. Die zusätzliche chemische Modifizierung der SH erzielte hingegen keine weitere Enzymstabilisierung, sondern bewirkte vielmehr eine Abnahme dieser infolge einer möglicherweise verringerten Enzymrigidität. Schlussendlich wurde durch die kovalente Immobilisierung der SH ein äußerst stabiles sowie rezyklierbares Enzympräparat bereitgestellt, das verglichen mit dem nativen Protein eine ökonomischere Reaktionsführung erlaubt, insbesondere wenn polare organische Lösemittel aber auch ILs eingesetzt werden.

3.5 Einsatz der SH bei der reduktiven Cofaktorregenerierung

Im Anschluss an die Charakterisierung und der daraufhin folgenden Stabilisierung der SH wurde diese als Regenerierungsenzym für den Cofaktor NADH in Kombination mit der CPCR eingesetzt. Als Modellreaktion diente die asymmetrische Reduktion von Acetophenon zu (*S*)-1-Phenylethanol, wobei die Kapazität der SH anhand des direkten Vergleichs mit dem derzeit bedeutendsten Cofaktorregenerierungssystem bewertet wurde, der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (FDH) [Patel, 2003, Shaked und Whitesides, 1980, Kula und Wandrey, 1987]. Zwar existieren gegenwärtig Studien, die die Anwendung der SH bei der Regenerierung von NADH beschreiben, jedoch erfolgte bislang nie eine Bewertung der Effizienz dieses Systems und ein Vergleich mit dem etablierten FDH-katalysierten Prozess [Andersson *et al.*, 1998, Hasumi *et al.*, 1992, Okura *et al.*, 1990, Otsuka *et al.*, 1987, Payen *et al.*, 1983].

Bei der Wahl der Reaktionsbedingungen der CPCR-katalysierten Reduktion von Acetophenon sollten die in Kapitel 3.1.3 ermittelten pH- und Temperaturverhältnisse, die zu einer möglichst hohen Aktivität bei einer gleichzeitig maximalen Stabilität der SH führten, Berücksichtigung finden, weshalb die Reaktion bei 30 °C und pH 7,5 erfolgte. Diese

Bedingungen gewährleisteten zudem eine hohe katalytische Aktivität der anderen beteiligten bzw. betrachteten Enzyme, der CPR und der FDH [Steinsiek, 2006, Bhattacharjee, 2005]. Alle weiteren Reaktionsbedingungen wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Steinsiek gewählt [Steinsiek, 2006], wobei die Reaktionsumsätze über eine Zeit von 4 Stunden bestimmt wurden. Neben der Untersuchung der NADH-Regenerierung mit der nativen SH erfolgte zudem der Einsatz der chemisch modifizierten, der adsorptiv immobilisierten sowie der kovalent immobilisierten SH unter analogen Reaktionsbedingungen.

3.5.1 Regenerierung von NADH mit nativer SH

Die Untersuchung der Reaktionsumsätze von Acetophenon erfolgte in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen Cofaktorregenerierungsenzyms, wobei je 1, 2 und 4 U mL⁻¹ der SH bzw. der FDH eingesetzt wurden (Abbildung 3.55).

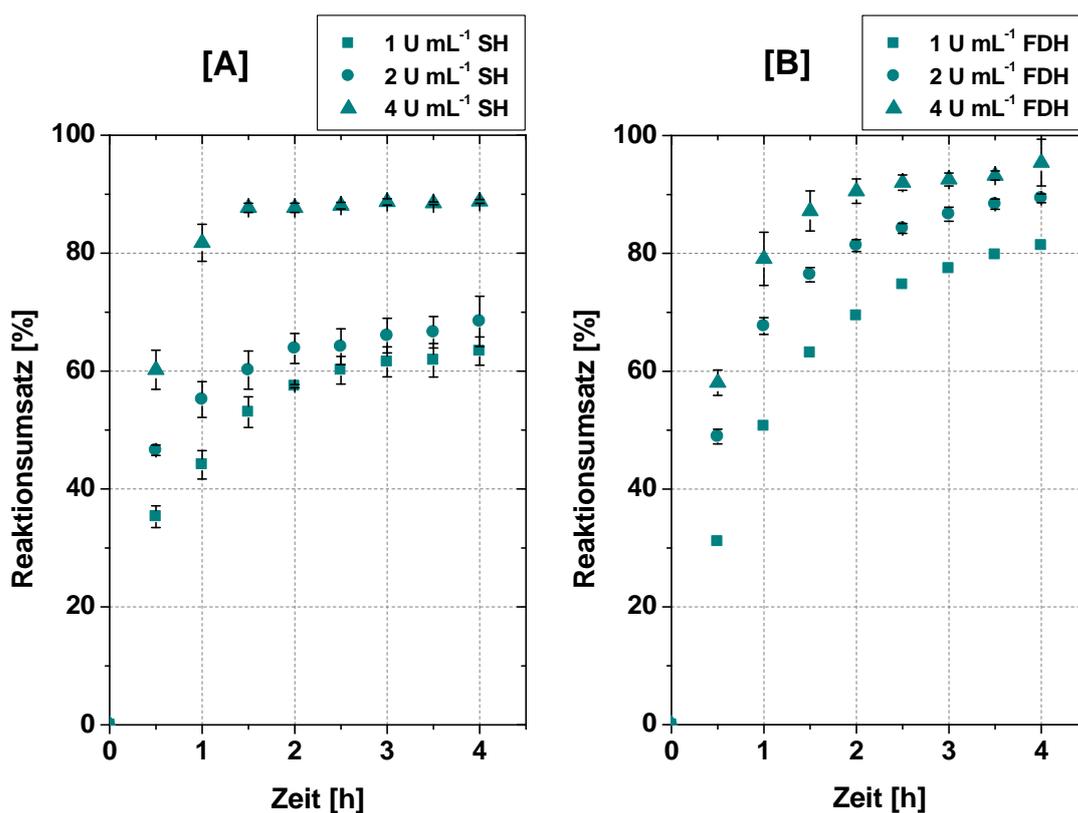


Abbildung 3.55 Reaktionsumsätze von Acetophenon bei variierenden SH- [A] und FDH-Konzentrationen [B]. [SH/FDH: 1, 2, 4 U mL⁻¹, 0,35 U mL⁻¹ CPR, 0,1 M TEA/HCl-Puffer (pH 7,5), 30 °C, 45 mM Acetophenon, 1 mM NADH, 1 mM DTT]

Wie erwartet, ergab sich für beide Cofaktorregenerierungsenzyme eine Abhängigkeit zwischen deren Konzentration und der Acetophenonumsätze in definierten Zeiträumen. So nahm die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit im Zuge der Erhöhung der SH- bzw. FDH-Konzentration ebenfalls zu. Für das FDH-katalysierte Cofaktorregenerierungssystem befinden sich diese Resultate in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Steinsiek [Steinsiek, 2006]. Nach einer Reaktionszeit von 0,5 Stunden betrug der Umsatz bei der höchsten Cofaktorregenerierungsenzymkonzentration von 4 U mL^{-1} $60,2 (\pm 3,3) \%$ für das CPCR/SH-System und $58 (\pm 2,2) \%$ für das CPCR/FDH-System. Das verdeutlicht, dass die Kapazität der SH zur Regenerierung von NADH vergleichbar hoch ist wie die der üblich eingesetzten FDH. Der Endumsatz der Reaktion erreichte in dem CPCR/SH-System $88,8 (\pm 0,3) \%$ und in dem CPCR/FDH-System $95,4 (\pm 4) \%$, was im Fall der FDH ebenfalls mit den Ergebnissen von Steinsiek korreliert [Steinsiek, 2006]. Innerhalb der ersten 1,5 Stunden waren bei beiden betrachteten Regenerierungssystemen vergleichbare Reaktionsumsätze zu beobachten. Diese stagnierten jedoch im Fall des CPCR/SH-Systems während des weiteren Reaktionsverlaufs, was sich auf die begrenzte Stabilität der SH unter den gewählten Bedingungen zurückführen lässt. Dabei kann angenommen werden, dass es insbesondere infolge der kontinuierlichen Durchmischung des Reaktionssystems durch den eingesetzten Magnetrührer zu einer Deaktivierung der SH kommt, so wie es beobachtet wurde.

Nach Beendigung der Reaktion nach einer Zeit von 4 Stunden wurden für beide Regenerierungssysteme die TTNs bei den verschiedenen Konzentrationen der SH und FDH berechnet (Abbildung 3.56). Hierbei zeigte sich, dass das SH-katalysierte Regenerierungssystem eine deutliche höhere TTN erzielt als das FDH-System. So betrug die TTN bei der geringsten Cofaktorregenerierungsenzymkonzentration von 1 U mL^{-1} $143666 (\pm 5450)$ im Fall der SH und nur $1685 (\pm 14)$, wenn die FDH zur Regenerierung von NADH eingesetzt wurde. Bei einer Cofaktorregenerierungsenzymkonzentration von 4 U mL^{-1} erreichte das SH-System eine TTN von $50199 (\pm 180)$, die 100-fach höher ist als die der FDH ($494 (\pm 21)$). Aufgrund dieser Ergebnisse, kann das SH-Regenerierungssystem als das deutlich effizientere ausgewiesen werden, was auf die deutlich höhere spezifische Aktivität der SH im Vergleich zur FDH zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang besaß die SH eine spezifische Aktivität von $24,2 \text{ U mg}^{-1}$, wohingegen die der FDH lediglich $0,4 \text{ U mg}^{-1}$ betrug. Für technische Anwen-

dungen stellt dieses Ergebnis einen beachtlichen Vorteil dar, da es im Fall der SH deutlich geringeren Enzymmengen bedarf, um vergleichbare Reaktionsumsätze zu erzielen.

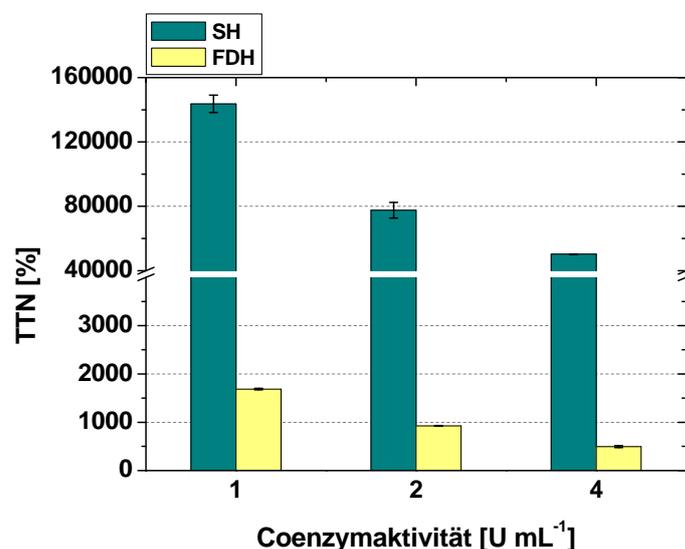


Abbildung 3.56 TTN [$n_{\text{Produkt}}/n_{\text{Enzym}}$] der SH und FDH nach Beendigung der Reaktion. [SH/FDH: 1, 2, 4 U mL⁻¹, 0,35 U mL⁻¹ CPR, 0,1 M TEA/HCl-Puffer (pH 7,5), 30 °C, 45 mM Acetophenon, 1 mM NADH, 1 mM DTT]

3.5.2 Regenerierung von NADH mit chemisch modifizierter SH

Die Reaktionsumsätze, die bei der Regenerierung von NADH mit der chemisch modifizierten SH bestimmt wurden, sind in Abbildung 3.57 dargestellt. Die Regenerierung erfolgte dabei unter Verwendung einer Cofaktorregenerierungsenzymkonzentration von 4 U mL⁻¹. Wie sich zeigte, wurden mit der chemisch modifizierten SH zu Beginn der Reaktion vergleichbare Reaktionsumsätze wie mit der äquivalenten Konzentration des nativen Enzyms erzielt. So betrug der Umsatz von Acetophenon nach einer Reaktionszeit von 0,5 Stunden 60,5 (± 8,4) % bei der Verwendung der mPEGylierten SH und im Vergleich dazu 60,2 (± 3,3) %, wenn die NADH-Regenerierung mit 4 U mL⁻¹ des nativen Enzyms erfolgte (Kapitel 3.5.1). Im Gegensatz dazu war der Endumsatz von Acetophenon bei der chemisch modifizierten SH mit 98,4 (± 1,4) % um 9,6 % höher als bei der nativen SH (88,8 (± 0,3) %). Diese Umsatzerhöhung kann auf die erhöhte Stabilität der chemisch modifizierten SH gegenüber Scherkräften in rein wässrigen Systemen zurückgeführt werden, wie in Kapitel 3.2.3 bestimmt wurde.

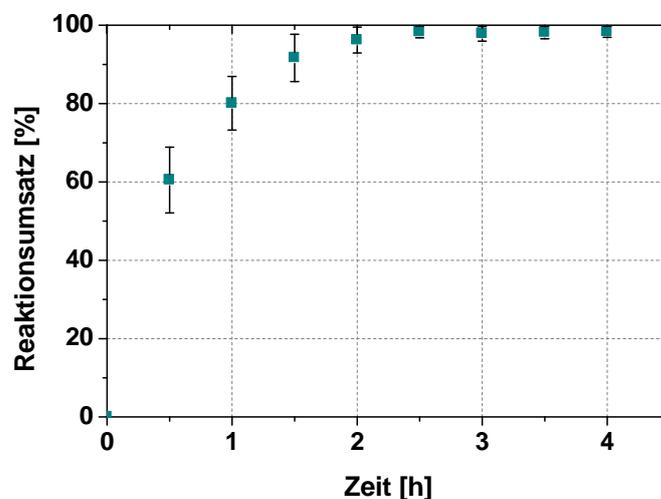


Abbildung 3.57 Reaktionsumsatz von Acetophenon unter Einsatz der chemisch modifizierten SH. [SH 4 U mL⁻¹, 0,35 U mL⁻¹ CPR, 0,1 M TEA/HCl-Puffer (pH 7,5), 30 °C, 45 mM Acetophenon, 1 mM NADH, 1 mM DTT]

3.5.3 Regenerierung von NADH mit adsorptiv immobilisierter SH

Für den Einsatz der adsorptiv immobilisierten SH bei der Reduktion von Acetophenon wurden die gleichen Reaktionsbedingungen gewählt wie bereits bei der Verwendung der nativen und auch chemisch modifizierten SH. Demnach wurde diejenige Menge an SH-Immobilisaten eingesetzt, die nach der Immobilisierung eine Restaktivität von 4 U mL⁻¹ aufwiesen. Zudem wurden die Immobilisate nach Beendigung der Reaktion nach 4 Stunden filtriert, gewaschen und bei einer erneuten Reduktion von Acetophenon eingesetzt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse für die Reaktionsumsätze sind in Abbildung 3.58 dargestellt. Anhand der ermittelten Reaktionsumsätze des ersten Reaktionsdurchlaufs zeigte sich, dass der Einsatz der immobilisierten SH im Vergleich zur nativen SH zu deutlich geringeren Acetophenonumsätzen führte. So betrug die Menge des umgesetzten Substrats nach einer Reaktionszeit von 0,5 Stunden nur 42,4 (± 3,9) %, was verglichen mit der nativen SH einem um etwa 20 % geringeren Umsatz entspricht. Auch nach 2 Stunden erreichte der Umsatz nur einen Wert von 62,2 (± 0,4) %. Beim Einsatz der nativen SH betrug der Reaktionsumsatz zu diesem Zeitpunkt dagegen schon 87,7 (± 0,8) % und somit ca. 25 % mehr als im Fall der SH-Immobilisate. Schlussendlich konnte bis zum Abbruch der Reaktion nach 4 Stunden ein Umsatz von 74,7 (±

1,0) % erreicht werden. Aufgrund der unerwarteten geringeren Umsätze beim Einsatz der immobilisierten SH wurden des Weiteren Messungen durchgeführt, die zeigen sollten, ob es während der Reduktion von Acetophenon zu Adsorptionserscheinungen der beteiligten Reaktanden an den eingesetzten Träger Amberlite™ FPA54 kommt. Hierbei ergab sich, dass sowohl Acetophenon als auch 1-Phenylethanol ungleichmäßig am Träger adsorbierten, wobei stetig etwa doppelt so hohe Konzentrationen des entstehenden Produktes adsorbierten im Vergleich zu Acetophenon. Somit können die ermittelten geringeren Umsätze auf Adsorptionsvorgänge während der Reaktion zurückgeführt werden. Bei der Durchführung der zweiten Reaktion mit den filtrierten und gewaschenen Immobilisaten wurde nach einer Reaktionszeit von 0,5 Stunden noch immer ein Umsatz von 36,7 ($\pm 2,3$) % erhalten. Auch zu den darauffolgenden Zeiten nahm der Reaktionsumsatz stetig zu und erreichte nach 4 Stunden einen Wert von 62,2 ($\pm 2,6$) %. Somit konnte gezeigt werden, dass das immobilisierte Enzym verglichen mit der nativen SH eine deutlich höhere Stabilität aufweist, um bei einer wiederholten Anwendung zu nur geringfügig verringerten Umsätzen zu führen. Aus ökonomischer Sicht stellt das einen bedeutenden Vorteil für technische Anwendungen der SH dar. Die ermittelten geringeren Umsätze während der Reduktion von Acetophenon wurden zuvor schon begründet.

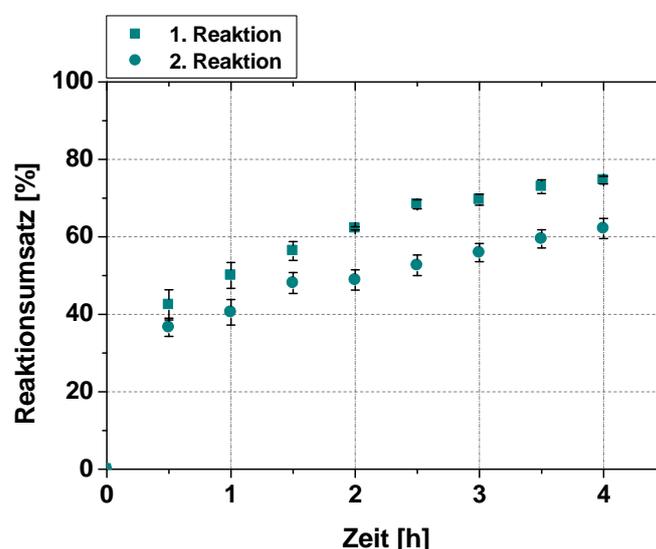


Abbildung 3.58 Reaktionsumsatz von Acetophenon beim Einsatz der adsorptiv immobilisierten SH bei zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen. [SH 4 U mL⁻¹, 0,35 U mL⁻¹ CPR, 0,1 M TEA/HCl-Puffer (pH 7,5), 30 °C, 45 mM Acetophenon, 1 mM NADH, 1 mM DTT]

3.5.4 Regenerierung von NADH mit kovalent immobilisierter SH

Analog zu den Untersuchungen des Einsatzes der adsorptiv immobilisierten SH bei der Regenerierung von NADH (Kapitel 3.5.3) erfolgte die Verwendung der kovalent immobilisierten SH bei der Reduktion von Acetophenon. Im Rahmen dessen zeigte sich, dass anhand der kovalent immobilisierten SH vergleichbare Umsätze erzielt werden können wie mit dem adsorptiv immobilisierten Enzym (Abbildung 3.59).

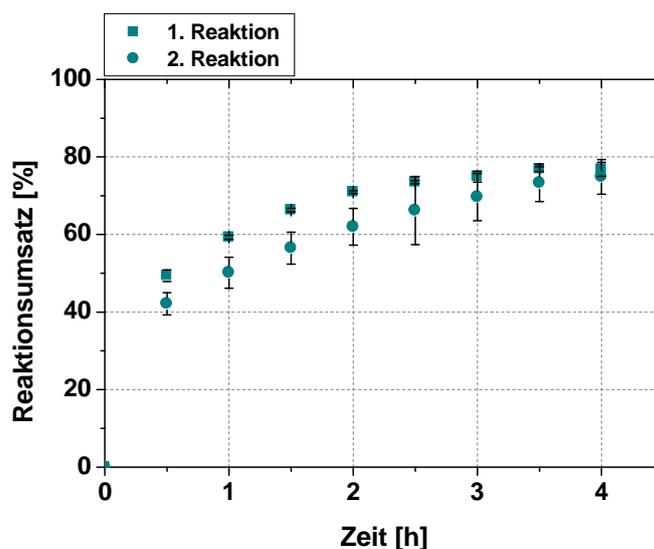


Abbildung 3.59 Reaktionsumsatz von Acetophenon beim Einsatz der kovalent immobilisierten SH bei zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen. [SH 4 U mL⁻¹, 0,35 U mL⁻¹ CPCPR, 0,1 M TEA/HCl-Puffer (pH 7,5), 30 °C, 45 mM Acetophenon, 1 mM NADH, 1 mM DTT]

Während des ersten Reaktionsdurchlaufs wurden Umsätze von 49,4 (± 1,5) %, 70,9 (± 0,3) % und 76,8 (± 1,8) % nach einer Reaktionszeit von 0,5, 2 bzw. 4 Stunden bestimmt. Im Vergleich dazu lieferte der Einsatz der SH-Immobilisate während des zweiten Durchlaufs etwas niedrigere Umsätze von 42,2 (± 2,8) %, 62 (± 4,7) % und 74,9 (± 4,5) % nach den entsprechenden Reaktionszeiten. Als Ursache für die beobachteten geringen Reaktionsumsätze, die im Vergleich zur nativen SH bestimmt wurden, sind ebenfalls die in Kapitel 3.5.3 beobachteten unsteten Adsorptionserscheinungen der beteiligten Reaktanden zu nennen. Schlussendlich konnte auch anhand dieser Resultate gezeigt werden, dass die eingesetzte kovalent immobilisierte SH ebenfalls eine deutlich erhöhte Stabilität aufweist. Im Zuge

dessen ließen sich bei einem wiederholten Einsatz der SH-Immobilisate erneut hohe Reaktionsumsätze erzielen, was aus ökonomischer Sicht einen beachtlichen Vorteil gegenüber des Einsatzes des gelösten nativen Enzyms darstellt, da dadurch eine wirtschaftlichere Prozessführung erlaubt wird.

3.5.5 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die native SH ein erfolgversprechender Biokatalysator zur Regeneration von NADH in asymmetrischen Reduktionen ist, da sie verglichen mit der konventionell eingesetzten FDH bei nur geringfügig niedrigeren Endumsätzen bedeutend höhere TTNs infolge ihrer höheren spezifischen Aktivität erreicht. Für technische Anwendungen stellt dieses Ergebnis einen bedeutenden Vorteil dar, da im Fall der SH geringere Proteinmengen nötig sind, um vergleichbar hohe Reaktionsumsätze zu erzielen. Wurde die SH in ihrer chemisch modifizierten Form eingesetzt, gelang es, die Endumsätze um weitere 10 % auf etwa 98 % zu erhöhen, was den mittels der FDH erzielten Reaktionsumsätzen entspricht. Die adsorptiv sowie die kovalent immobilisierte SH führte zwar aufgrund von unsteten Adsorptionsvorgängen der beteiligten Reaktanden am eingesetzten Immobilisierungsträger zu scheinbar geringeren Umsätzen, jedoch konnte bei deren wiederholtem Einsatz ein vergleichbar hoher Endumsatz erzielt werden, was nochmals die erhöhte Stabilität des immobilisierten Enzyms demonstriert. Es wurde somit ein den industriellen Anforderungen entsprechender Biokatalysator zur NADH-Regenerierung bereitgestellt, der eine effiziente und somit ökonomischere Prozessführung erlaubt. Basierend auf diesen Ergebnissen kann ein technischer Einsatz der SH in industriell bedeutenden Synthesen wie der Produktion von (*L*)-*tert*-Leucin angestrebt werden.

4 Zusammenfassung

Die lösliche Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16 (SH) ist aufgrund ihrer Bidirektionalität und ihrer Toleranz gegenüber Sauerstoff ein vielversprechender Biokatalysator zur Regenerierung des Cofaktors NADH. Dieser wird in zahlreichen asymmetrischen Synthesen zur Herstellung chiraler Hydroxysäuren, Aminosäuren oder Alkohole durch Oxidoreduktasen benötigt. Aufgrund des Bestrebens einer ökonomischen Prozessführung in industriellen Anwendungen bedarf es der Regenerierung von NADH im Reaktionsansatz. Da das gegenwärtig etablierte Verfahren, das die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (FDH) als Cofaktorregenerierungsenzym nutzt, noch immer eine geringe Effizienz besitzt, besteht das Bestreben ein alternatives Regenerierungssystem bereitzustellen. Ein hydrogenasegekoppeltes System, welches die SH nutzt, stellt in diesem Zusammenhang eine interessante Alternative dar. Für eine solche Anwendung wurde jedoch bislang noch keine umfassende Charakterisierung, Bewertung sowie eine gezielte Anpassung der SH an die geforderten Prozessbedingungen vorgenommen. Aus diesem Grund erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine systematische Analyse der SH unter prozessrelevanten Bedingungen sowie die Untersuchung verschiedener Stabilisierungsstrategien.

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener technisch relevanter Parameter auf die Aktivität und Stabilität der SH ermittelt. Dazu zählten die Temperatur, der pH-Wert, verschiedene Salzionen, organische Lösungsmittel, sowie ionische Flüssigkeiten und die mechanische Beanspruchung in Form von Scherkräften. Dabei zeigte sich, dass die SH eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber einer Vielzahl der untersuchten Einflussgrößen aufweist. So resultierte aus der Erhöhung der Temperatur über 35 °C sowie des pH-Wertes über 8,0 eine starke Inaktivierung der SH. Die Gegenwart von Natriumionen führte wiederum zu einer 70 %-igen Inhibierung des Enzyms, wohingegen Phosphationen eine Verringerung der Stabilität bewirkten. Dem gegenüber besaßen Sulfationen einen enzymstabilisierenden Einfluss. Ein besonders drastischer Aktivitäts- und Stabilitätsverlust der SH wurde in Gegenwart der verschiedenen organischen Lösungsmittel, bei denen es sich um DMF, DMSO und Isoopropanol handelte, sowie beim Zusatz verschiedener ionischen Flüssigkeiten (ILs) ermittelt. [MTEOA][MeSO₄] bildete dabei eine Ausnahme, da die SH bei Zugabe dieser ionischen Flüssigkeit bedingt stabilisiert werden konnte. Wurde die SH einer mechanischen Beanspru-

chung ausgesetzt, zeigte das Enzym dagegen abermals eine rapide Deaktivierung. Im Weiteren wurde anhand des *design of experiments* (DOE) die gegenseitige Beeinflussung der Temperatur und des pH-Wertes hinsichtlich derer Effekte auf die Aktivität und Stabilität der SH untersucht. Dies sollte vorrangig der Bestimmung geeigneter Tempartur- und pH-Bedingungen dienen, die zu einer möglichst maximalen Enzymaktivität bei einer gleichzeitig hohen Stabilität der SH führen. Hierbei zeigte sich, dass die Reaktionstemperatur nicht oberhalb von 30 °C und der pH zwischen 7,4 und 7,9 liegen sollte. Da die Zugabe von organischen Lösungsmitteln sowie von ILs zu einer drastischen Deaktivierung der SH führte, viele technische Anwendungen die Gegenwart dieser Medien jedoch erfordern, wurden im weiteren Verlauf verschiedene Strategien zur Stabilisierung des Enzyms untersucht.

Durch chemische Modifizierung der freien Aminogruppen der SH wurden zunächst die chemischen Funktionalitäten auf der Proteinoberfläche verändert, um diese gegenüber Interaktionen mit Lösungsmitteln abzuschirmen. Die Modifizierung der SH mit mPEG₅₀₀₀ führte bei einem Enzym-mPEG-Verhältnis von 1:500 zu hohen Restaktivitäten von 91 %. Zudem konnte die zuvor beobachtete ausgeprägte Sensitivität des Enzyms gegenüber polaren organischen Lösungsmitteln deutlich verringert werden. Dabei konnte die Aktivität der SH um ein bis zu 3,4-faches und die Enzymstabilität um ein bis zu 5-faches in den untersuchten LM-Wasser-Gemischen erhöht werden. Darüber hinaus konnte eine signifikante Aktivitätssteigerung um bis zu 46 % in IL-Wasser-Gemischen erzielt werden. Hinsichtlich der Halbwertszeit der SH in den untersuchten IL-Wasser-Gemischen war dagegen keine Veränderung zu beobachten, was auf einen alternativen Mechanismus der Deaktivierung der SH durch die Zugabe von ILs verglichen mit dem in Lösungsmittel-Wasser-Gemischen hindeutet. In rein wässrigen Medien war ebenfalls nur die Erhöhung der mechanischen Stabilität des Enzyms zu beobachten.

Anhand der adsorptiven Immobilisierung wurde die SH über verschiedene nicht-kovalente Wechselwirkungen an einen geeigneten Träger, bei dem es sich um das anionische Harz AmberliteTM FPA54 handelte, gebunden. Dadurch sollte die Proteinrigidität erhöht werden, um in der Folge eine Stabilisierung gegenüber deaktivierenden Einflüssen zu erreichen und zugleich ein rezyklierbares Enzympräparat bereitzustellen, was wiederum einer ökonomischeren Prozessführung bei möglichen technischen Anwendungen der SH dient. Optimierungs-

untersuchungen ergaben eine maximale Restaktivität von 48,9 % und eine Proteinbeladung von 93,4 % bei einem Enzym-Träger-Verhältnis von 1:2000 und einem pH-Wert von 8. Darüber hinaus kam es in keinem der untersuchten Medien zu einem leaching der SH, was in technischen Anwendungen von Vorteil ist. In rein wässrigen Medien und in jedem der untersuchten organischen Lösungsmittel zeigten die Immobilisate eine signifikant höhere Halbwertszeit als die native SH. Dabei wurden in rein wässrigen Medien Stabilisierungsfaktoren von bis zu 2,4 und in organischen Lösemitteln bis zu 7-fach erhöhte Halbwertszeiten bestimmt. Für die Immobilisierung der zuvor chemisch modifizierten SH ergaben sich vor allem in DMF, DMSO und Isopropanol additive Effekte, die zu einer weiteren Erhöhung der Enzymstabilität führten. In diesem Zusammenhang konnten beachtliche Stabilisierungsfaktoren von bis zu 23 erreicht werden. In den analysierten IL-Wasser-Gemischen konnten zwar verbesserte Enzymaktivitäten erreicht werden, jedoch lieferte die Untersuchung der Stabilität der SH-Immobilisate in diesen Medien diverse Resultate, die auf keine eindeutige Enzymstabilisierung schließen ließen.

Mittels kovalenter Immobilisierung der SH sollte eine weitere Erhöhung ihrer Stabilität gegenüber inaktivierenden Einflüssen erreicht werden, da die kovalente Bindung an einen geeigneten Träger (AmberliteTM FPA54) zu einer weiteren Zunahme der Proteinrigidität führt. Optimierungsuntersuchungen ergaben eine maximale Restaktivität von 39,3 % und eine vollständige Proteinbeladung der Immobilisate bei einem pH-Wert von 8, einer Glutardialdehydkonzentration von 1 % (v/v) und einem Enzym-Träger-Verhältnis von 1:2000. Die kovalente Immobilisierung der SH führte in jedem der untersuchten Medien zu einer beachtlichen Stabilisierung der SH. Dabei konnten Stabilisierungsfaktoren von bis zu 159 erreicht werden. Die zusätzliche chemische Modifizierung der SH erzielte hingegen keine weitere Enzymstabilisierung, sondern bewirkte vielmehr eine Abnahme dieser infolge einer verringerten Enzymrigidität.

Abschließend wurde die SH als Cofaktorregenerierungsenzym bei der durch die Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR) katalysierten Reduktion von Acetophenon eingesetzt, um die Regenerierung von NADH zu katalysieren. Die Effizienz des hydrogenasegekoppelten Regenerierungssystems wurde anhand des direkten Vergleichs mit der FDH ermittelt. Dabei zeigte sich, dass mittels der SH zwar geringfügig niedrige Endumsätze jedoch

bis zu 100-fach höhere TTNs erzielt werden. Für technische Anwendungen stellt das einen bedeutenden Vorteil dar, da im Fall der SH geringere Proteinmengen nötig sind, um vergleichbar hohe Reaktionsumsätze zu erzielen. Mithilfe der stabilisierten mPEGylierten SH gelang es, die Endumsätze um weitere 10 % auf etwa 98 % zu erhöhen. Die adsorptiv sowie die kovalent immobilisierte SH führte zwar aufgrund von Adsorptionsvorgängen der beteiligten Reaktanden am eingesetzten Immobilisierungsträger zu scheinbar geringeren Umsätzen, jedoch konnten bei deren wiederholtem Einsatz vergleichbar hohe Endumsätze erzielt werden. Somit wurde ein, den industriellen Anforderungen entsprechendes Enzympräparat bereitgestellt, dessen hohe Effizienz sowie Stabilität einen ökonomischeren Prozess der NADH-Regenerierung ermöglicht.

5 Literatur

- Abian, O., Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Stabilization of immobilized enzymes against water-soluble organic cosolvents and generation of hyperhydrophilic microenvironments surrounding enzyme molecules. *Biocatal. Biotransform.* **2001**, *19*, 489-503.
- Aehle, W., *Enzymes in Industry: production and Application*, 2007. Weinheim: VCH-Wiley.
- Albayrak, N. und Yang, S. T., Immobilisation of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase on tosylated cotton cloth. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 371-383.
- Al-Duri, B. und Yong, Y. P., Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. *Biochem. Eng. J.* **2000**, *4*, 207-215.
- Andersson, M., Holmberg, H., Adlercreutz, P. Evaluation of *Alcaligenes eutrophus* cells as an NADH regenerating catalyst in organic-aqueous two-phase system. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57*, 79-86.
- Anita, C. A., Sastry, M. A., Hashim, M. A., Immobilization of urease using Amberlite MB-1. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **1997**, *17*, 355-359.
- Aoun, S. und Baboulene, M., Regioselectivity bromohydroxylation of alkenes catalysed by chloroperoxidase: advantages of the immobilisation of enzyme on taic. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *4*, 101-109.
- Azerad, R., Application of biocatalysts in organic synthesis. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, 132, 17-51.
- Azevedo, A. M., Prazeres, D. M. F., Cabral, J. M. S., Fonseca, L. P. Stability of free and immobilised peroxidase in aqueous mixtures of organic solvents. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *15*, 147-153.
- Basri, M., Ampon, K., Yunus, W. M. Z., Razak, C. N. A., Salleh, A. B., Synthesis of fatty esters by polyethylene glycol-modified lipase. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1995**, *64*, 10-16.
- Basri, M., Ampon, K., Yunus, W. M. Z., Razak, C.N.A., Salleh, A. B., Amidination of lipase with hydrophobic imidoesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 579-583.

- Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernandez-Lafuente, R., Huguet, J., Guisan, J. M., A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 486-493.
- Bhattacharjee, M., Cloning, expression, characterization and immobilization of carbonyl reductase from *Candida parapsilosis*. **2005**, Dissertation RWTH Aachen.
- Bolivar, J. M., Mateo, C., Rocha-Martin, J., Cava, F., Berenguer, J., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., The adsorption of multimeric enzymes on very lowly activated supports involves more enzyme subunits: stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* by immobilization on heterofunctional supports. *Enzyme Microb. Technol.* **2009**, *44*, 139-144.
- Bommarius, A. S. und Riebel, B. R., *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*, 2004. Weinheim: VCH-Wiley.
- Bommarius, A. S., Schwarm, M., Drauz, K., Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals - examples and perspectives. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *5*, 1-11.
- Bornscheuer, U. T. und Pohl, M., Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137-143.
- Bradford, M. M., Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- Brady, D. und Jordaan, J., Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1639-1650.
- Burgdorf, T., Lenz, O., Buhrke, T., Van der Linden, E., Jones, A. K., Albracht, S. P. J., Friedrich, B., [NiFe]-Hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: Modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2005a**, *10*, 181-196.
- Burgdorf, T., Van der Linden, E., Bernhard, M., Yin, Q. Y., Back, J. W., Hartog, A. F., Muijsers, A. O., De Koster, C. G., Albracht, S. P. J., Friedrich, B., The soluble NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH. *J. Bacteriol.* **2005b**, *187*, 3122-3132.
- Burgdorf, T., Löscher, S., Liebisch, P., Van der Linden, E., Galander, M., Lenzian, F., Meyer-Klaucke, W., Albracht, S. P. J., Friedrich, B., Dau, H., Haumann, M., Structural and oxidation-state changes at its nonstandard Ni-Fe site during activation

- of the NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* detected by x-ray absorption, EPR, and FTIR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2005c**, *127*, 576-592.
- Cabrera, Z., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J. M., Guisan, J. M., Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *57*, 171-176.
- Cao, L., *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design*, 2005. Weinheim: VCH-Wiley.
- Carrea, G. und Riva, S., Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2226-2254.
- Castro, G. R. und Knubovets, T., Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2003**, *23*, 195-231.
- Chenault, H. K., Simon, E. S., Whitesides, G. M., Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis. *Biotechnol. Genetic Engineering Reviews* **1988**, *6*, 221-270.
- Chenault, H. K. und Whitesides, G. M., Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, *14*, 147-197.
- Cracknell, J. A., Vincent, K. A., Armstrong, F. A., Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2439-2461.
- Dalby, P. A., Engineering enzymes for biocatalysis. *Recent Pat. Biotechnol.* **2007**, *1*, 1-9.
- Danielsson, B., Winqvist, F., Malpote, J. Y., Mosbach, K., Regeneration of NADH with immobilized systems of alanine dehydrogenase and hydrogen dehydrogenase. *Biotechnol. Lett.* **1982**, *14*, 673-678.
- Davis, B. G., Chemical modification of biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 379-386.
- Deloggio, T. J. und Graves, D. J., An immobilized hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H-16. *Biotechnol. Bioeng.* **1988**, *32*, 295-300.
- DeSantis, G. und Jones, J. B., Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 324-330.
- Dwevedi, A. und Kayastha, A. M., Stabilization of β -galactosidase (from peas) by immobilization onto Amberlite MB-150 beads and its application in lactose hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 682-688.

- Egerer, P. und Simon, H., Immobilization and stability of the NAD-dependent hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* and of whole cells. *Biotechnol. Lett.* **1982**, *4*, 489-494.
- Eijssink, V. G. H., Bjork, A., Gaseidnes, S., Sirevag, R., Synstad, B., Van den Burg, B., Vriend, G., Rational engineering of enzyme stability. *J. Biotechnol.* **2004**, *113*, 105-120.
- Erbeldinger, M., Mesiano, A. J., Russell, A. J. Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 1129-1131.
- Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wikström, C., Wold, S., *Design of Experiments: Principles and Applications*, 2000 Umetrics Academy.
- Faber, K., *Biotransformations in organic chemistry*. 2004. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Fágán, C. O., Understanding and increasing protein stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1252*, 1-14.
- Fazlena, H., Kamaruddin, A. H., Zulkali, M. M. D., Dynamic kinetic resolution: alternative approach in optimizing S-ibuprofen production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2006**, *28*, 227-233.
- Fernández-Lafuente, R., Guisan, J. M., Ali, S., Cowan, D., Immobilization of functionally unstable catechol-2,3-dioxygenase greatly improves operational stability. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26*, 568-573.
- Fernández-Lafuente, R., Rodríguez, V., Mateo, C., Penzol, G., Hernández-Justiz, O., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista, F., Guisán, J. M., Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *7*, 181-189.
- Frey, M., Hydrogenases: hydrogen-activating enzymes. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 153-160.
- Gaertner, H. F., Puigserver, A. J., Increased activity and stability of poly (ethylene glycol)-modified trypsin. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 150-155.
- Garcia-Arellano, H., Valderrama, B., Saab-Rincon, G., Vazquez-Duhalt, R., High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome C. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 1336-1344.

- Garcia-Arellano, H., Valderrama, B., Saab-Rincón, G., Vazquez-Duhalt, R., High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome c. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 1336-1344.
- Goto, M., Hatanakaa, C., Masahiro, G., Immobilization of surfactant-lipase complexes and their high heat resistance in organic media. *Biochem. Eng. J.* **2005**, *24*, 91-94.
- Gröger, H., Hummel, W., Buchholz, S., Drauz, K., Nguyen, T. V., Rollmann, C., Husken, H., Abokitse, K., Practical Asymmetric Enzymatic Reduction through discovery of a dehydrogenase-compatible biphasic reaction media. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 173-176.
- Guagliardi, A., Manco, G., Rossi, M., Bartolucci, S. Stability and activity of a thermostable malic enzyme in denaturants and water-miscible organic solvents. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *183*, 25-30.
- Hahn-Hägerdal, B. Water activity: A possible external regulator in biotechnical processes. *Enzyme Microb. Technol.* **1986**, *8*, 322-327.
- Halling, P. J., High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1040*, 225-228.
- Hartmann, M. und Jung, D., Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 844-857.
- Hartmeier, W., *Immobilisierte Biokatalysatoren*. 1986. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Hasumi, F., Adachi, S., Fukuoka, K., Miyamoto, Y., Yamamoto, T., Nakada, N. Synthesis of leucine by a combination of hydrogenase and leucine dehydrogenase. *Numazu College of Technology Research Annual* **1992**, *26*, 103-105.
- Hernáiz, M. J., Sánchez-Montero, J. M. und Sinisterra, J. V., Influence of the nature of modifier in the enzymatic activity of chemical modified semipurified lipase from *Candida rugosa*. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55*, 252-260.
- Hilhorst, R., Laane, C., Veeger, C., Enzymatic conversion of apolar compounds in organic media using a NADH-regenerating system and dihydrogen as reductant. *FEBS Letters* **1983**, *159*, 225-228.
- Hilterhaus, L. und Liese, A., Building blocks. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2007**, *105*, 133-173.
- Horch, M., Lauterbach, L., Saggiu, M., Hildebrandt, P., Lenzian, F., Bittl, R., Lenz, O., Zebger, I., Probing the active site of an O₂-tolerant NAD⁺-reducing [NiFe]-

- hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 by in situ EPR and FTIR spectroscopy. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 8026-8029.
- Hsu, A. F., Foglia, T. A., Shen, S., Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase in a phyllosilicate sol-gel matrix. Effectiveness as a biocatalyst. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2000**, *31*, 179-183.
- Hummel, W. Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *Tibtech December* **1999**, *17*, 487-492.
- Hummel, W. und Kula, M. R., Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *184*, 1-13.
- Illanes, A., Stability of Biocatalyst. *Electr. J. Biotechnol.* (online) **1999**, *2*, 7-15.
- Itoh, N., Matsuda, M., Mabuchi, M., Dairi, T., Wang, J., Chiral alcohol production by NADH-dependent phenylacetaldehyde reductase coupled with in situ regeneration of NADH. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 2394-2402.
- Itoh, N., Mizuguchi, N., Mabuchi, M., Production of chiral alcohols by enantioselective reduction with NADH-dependent phenylacetaldehyde reductase from *Corynebacterium* strain, ST-10. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 41-50.
- Iyer, P. V. und Ananthanarayan, L., Enzyme stability and stabilization - aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.* **2008**, *43*, 1019-1032.
- Jene, Q., Pearson, J. C. und Lowe, C. R., Surfactant modified enzymes: solubility and activity of surfactant-modified catalase in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *20*, 69-74.
- Kazan, D., Ertan, H., Erarslan, A., Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *48*, 191-197.
- Keefe, R. G., Axley, M. J., Harabin, A. L., Kinetic mechanism studies of the soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *317*, 449-456.
- Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B., Moosavi-Movahedi, A., Nemat-Gorgani, M. Chemical modification of lysine residues in *Bacillus* α -amylase: effect on activity and stability. *Enzyme and Microb. Technol.* **2001**, *28*, 543-549.
- Klibanov, A. M. und Puglisi, A. V. The regeneration of coenzymes using immobilized hydrogenase. *Biotechnol. Lett.* **1980**, *2*, 445-50.

- Klibanov, A. M., Enzyme stabilization by immobilization. *Anal. Biochem.* **1979**, *93*, 1-25.
- Knubovets, T., Osterhout, J. J., Klibanov, A. M. Structure of lysozyme dissolved in neat organic solvents as assessed by NMR and CD spectroscopies. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *63*, 242-248.
- Kortlücke, C. und Friedrich, B., Maturation of membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 6290-6293.
- Kragl, U., Eckstein, M., Kaftzik, N. Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 565-571.
- Kruse, W., Kragl, U., Wandrey, C., Verfahren zur kontinuierlichen enzymkatalysierten Gewinnung hydrophober Produkte. Forschungszentrum Jülich GmbH, DE 4436149 A1 **1996**.
- Kula, M. R. und Wandrey, C. Continuous enzymatic transformation in an enzyme-membrane reactor with simultaneous NAD regeneration. *Method. Enzymol.* **1987**, *136*, 9-21.
- Kumari, A. und Kayastha, A. M., Immobilization of soybean (glycine max) α -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: optimization and characterization. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *69*, 8-14.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. und Veeger, C., Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 81-87.
- Lauterbach, L., Liu, J., Horch, M., Hummel, P., Schwarze, A., Haumann, M., Vincent, K. A., Lenz, O., Zebger, I., The hydrogenase subcomplex of the NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*: insights into catalysis and redox interconversions. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, *7*, 1067-1079.
- Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., Schwartz, E., Friedrich, B., The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *4*, 255-262.
- Liese, A., Seelbach, K. und Wandrey, C., *Industrial Biotransformations*, 2000. Weinheim: VCH-Wiley.
- Lopez-Cruz, J. I., Viniestra-Gonzalez, G., Hernandez-Arana, A., Thermostability of native and pegylated *Myceliophthora thermophila* laccase in aqueous and mixed solvents. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 1093-1098.
- Löscher, S., Burgdorf, T., Buhrke, T., Friedrich, B., Dau, H., Haumann, M., Non-standard structures of the Ni-Fe cofactor in the regulatory and the NAD-reducing hydrogenases from *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Society Transactions* **2005**, *33*, 25-27.

- Ludwig, M., Schwarze, A., Lenz, O., Knallgas unter Kontrolle: O₂-tolerante Hydrogenasen und ihre Anwendung. *BIOSpektrum* **2008**, *14*, 477-479.
- Massanz, C., Schmidt, S., Friedrich, B., Subforms and in vitro reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 1023-1029.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451-1463.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lorente, G., Pedroche, J., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 629-634.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68*, 98-105.
- Mattos, C. und Ringe, D., Proteins in organic solvents. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 761-764.
- McIninch, J. K. und Kantrowitz, E. R., Use of silicate sol-gels to trap the R and T quaternary conformational states of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1547*, 320-328.
- Means, G. E. und Feeney, R. E., Chemical modifications of proteins: history and applications. *Bioconjug. Chem.* **1990**, *1*, 2-12.
- Mertens, R., Greiner, L., Van den Ban, E. C. D., Haaker, H. B. C. M., Liese, A., Practical applications of hydrogenase I from *Pyrococcus furiosus* for NADPH generation and regeneration. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *24-25*, 39-52.
- Mozhaev, V. V., Khmelnsky, Y. L., Sergeeva, M. V., Belova, A. B., Klyachko, N. L., Levashov, A. V., Martinek, K. Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures: α -Chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide solvents. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *184*, 597-602.
- Nakashima, K., Maruyama, T., Kamiya, N., Goto, M. Homogeneous enzymatic reactions in ionic liquids with poly(ethylene glycol)-modified subtilisin. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3462-3467.
- Natarajan, K. R., Biocatalysis in organic solvents. *J. Chem. Educ.* **1991**, *68*, 13-16.

- Ó` Fágáin, C., Enzyme stabilization - recent experimental progress. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 137-149.
- Ogino, H. und Ishikawa, H., Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91*, 109-116.
- Okura, I., Otsuka, K., Nakada, N., Hasumi, F. Regeneration of NADH and ketone hydrogenation by hydrogen with the combination of hydrogenase and alcohol dehydrogenase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1990**, *24-25*, 425-30.
- Orlich, B., Biokatalyse an hydrophoben Substraten mit Tensiden und Membranen als reaktionstechnische Werkzeuge. **2000**, Dissertation TU-Berlin.
- Osterath, B., Rao, N., Luetz, S., Liese, A. Technische Anwendung von Enzymen. *Chemie in unserer Zeit* **2007**, *41*, 324-333.
- Otsuka, K., Aono, S., Okura, I. Regeneration of NADH and hydrogenation of ketones to alcohols with the combination of hydrogenase and alcohol dehydrogenase. *Chem. Lett.* **1987**, *10*, 2089-90.
- Pan-Soo, K., Hyun-Dong, S., Joong-Kon, P., Yong-Hyun, L., Immobilization of cyclodextrin glucanotransferase on Amberlite IRA-900 for biosynthesis of transglycosylated xylitol. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **2000**, *5*, 174-180.
- Palomo, J. M., Lipases enantioselectivity alteration by immobilization techniques. *Curr. Bioact. Compd.* **2008**, *4*, 126-138.
- Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 775-783.
- Pareira, E. B., De Castro, H. F., De Moraes, F. F., Zanin, G. M., Kinetic Studies of Lipase from *Candida rugosa*: A comparative study between free and immobilized enzyme onto porous chitosan beads. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2001**, *91-93*, 739-748.
- Patel, R. N., Microbial/enzymatic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **2003**, *6*, 902-920.
- Payen, B., Segui, M., Monsan, P., Schneider, K., Friedrich, C. G., Schlegel, H. G. Use of cytoplasmic hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* for NADH regeneration. *Biotechnol. Lett.* **1983**, *5*, 463-468.

- Pazhang, M., Khajeh, K., Ranjbar, B. und Hosseinkhani, S., Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. *J. Biotechnol.* **2006**, *127*, 45-53.
- Persson, M. und Bornscheuer, U. T., Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *22*, 21-27.
- Pfützner, J., Linke, H. A. B., Schlegel, H. G., Eigenschaften der NAD-spezifischen Hydrogenase aus *Hydrogenomonas* H16. *Arch. Mikrobiol.* **1970**, *71*, 67-78.
- Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, Liesegang, H., Cramm, R., Eitingner, T., Ewering, C., Pötter, Schwartz, E., Strittmatter, A., Voß, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B., Bowien, B., Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1-6.
- Popov, V. O., Oychinnikoy, A. N., Egoroy, A. M., Berezin, I. Y., NAD⁺-dependent hydrogenase from the hydrogen oxidizing bacterium *Alcaligenes eutrophus* Z1. Stabilization against temperature and urea induced inactivation. *Biochimie* **1986**, *68*, 63-68.
- Qigang, W., Gao, Q., Shi, J., Enhanced catalytic activity of hemoglobin in organic solvents by layered titanate immobilization. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14346-14347.
- Quintanilla-Guerrero, F., Duarte-Vázquez, M.A., Tinoco, R., Gómez-Suárez, M., García-Almendárez, B.E., Vázquez-Duhalt, R., Regalado, C., Chemical modification of turnip peroxidase with methoxypolyethylene glycol enhances activity and stability for phenol removal using the immobilized enzyme. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8058-8065.
- Rissom, S., Beliczey, J., Giffels, G., Kragl, U., Wandrey, C., Asymmetric reduction of acetophenone in membrane reactors: comparison of oxazaborolidine and alcohol dehydrogenase catalysed processes. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 923-928.
- Roig, M. G. und Kennedy, J. F., Perspectives for chemical modifications of enzymes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1992**, *12*, 391-412.
- Rodriguez-Martinez, J. A., Sola, R. J., Castillo, B., Cintron-Colon, H. R., Rivera-Rivera, I., Barletta, G. und Griebenow, K., Stabilization of alpha-chymotrypsin upon PEGylation

- correlates with reduced structural dynamics. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 1142-1149.
- Roosen, C., Müller, P., Greiner, L. Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 607-614.
- Rotticci, D., Norin, T., Hult, K., Mass transport limitations reduce the effective stereospecificity in enzyme-catalyzed kinetic resolution. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1373-1376.
- Rubin-Pitel, S. B. und Zhao, H., Recent advances in biocatalysis by directed enzyme evolution. *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2006**, *9*, 247-257.
- Ryan, O., Smyth, M. R. und Fagain, C. O., Thermostabilized chemical derivatives of horseradish peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 501-505.
- Salleh, A. B., Basri, M., Taib, M., Jasmani, H., Rahman, R. N. Z. A., Rahman M. B. A., Razak, C. n. A., Modified enzymes for reactions in organic solvents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2002**, *102-103*, 349-357.
- Schiffer C. A., Dötsh, V., The role of protein-solvent interactions in protein unfolding. *Curr. Op. Biotechnol.* **1996**, *7*, 428-432.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B., Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **2001**, *409*, 258-268.
- Schmid, R., Stabilized soluble enzymes. *Adv. Biochem. Eng.* **1979**, *12*, 41-118.
- Schneider, K. und Schlegel, H. G., Production of superoxide radicals by soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochem. J.* **1981**, *193*, 99-107.
- Schneider, K., Cammack, R., Schlegel, H. G., Hall, D. O., The ironsulphur centres of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *578*, 445-461.
- Schneider, K., Schlegel, H. G., Identification and quantitative determination of the flavin component of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *84*, 564-571.
- Schneider, K., Schlegel, H. G., Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *425*, 66-80.
- Schulze, B. und Wubbolts, M. G., Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 609-615.
- Shaked, Z. und Whitesides, G. M., Enzyme-catalyzed organic synthesis: NADH regeneration by using formate dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7104-7105.

- Sharma, S. und Yamazaki, H., Preparation of hydrophobic cotton cloth. *Biotechnol. Lett.* **1984**, *6*, 301-306.
- Sheldon, R. A., Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289-1307.
- Sheldon, R. A., Lau, R. M., Sorgedraeger, M. J., Van Rantwijk, F., Seddon, K. R. Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chem.* **2002**, *4*, 147-151.
- Siebertz, K., Van Bebber, D., Hochkirchen, T., *Statistische Versuchsplanung: Design of Experiments (DoE)*, 2010. Springer.
- Simon, E. S., Plante, R., Whitesides, G. M., D-lactate dehydrogenase: substrate specificity and use as a catalyst in the synthesis of homochiral 2-hydroxy acids. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1989**, *22*, 169-179.
- Singh, A. N., Singh, S., Suthar, N., Dubey, V. K., Glutaraldehyde-activated chitosan matrix for immobilization of a novel cysteine protease, Procerain B. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 6256-6262.
- Steinsiek, S., Charakterisierung und Optimierung gel-stabilisierter Zwei-Phasen-Systeme zur stereospezifischen Reduktion hydrophober Verbindungen mit der Carbonyl-Reduktase aus *Candida parapsilosis*. **2006**, Dissertation RWTH Aachen.
- Straathof, A. J., Panke, S. und Schmid, A., The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548-556.
- Suh, C. W., Choi, G. S., Lee, E. K., Enzymic cleavage of fusion protein using immobilized urokinase covalently conjugated to glyoxyl-agarose. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2003**, *37*, 149-155.
- Svergun, D. I., Ekstrom, F., Vandegriff, K. D., Malavalli, A., Baker, D. A., Nilsson, C., Winslow, R. M., Solution structure of poly(ethylene) glycol-conjugated hemoglobin revealed by small-angle X-ray scattering: implications for a new oxygen therapeutic. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 173-181.
- Szabo, A., Kotormán, M., Laczkó, I., Simon, L. M., Improved stability and catalytic activity of chemically modified papain in aqueous organic solvents. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 199-204.
- Turner, M. B., Spear, S. K., Huddleston, J. G., Holbrey, J. D., Rogers, R. D. Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. *Green Chem.* **2003**, *5*, 443-447.

- Tyler, J., Simurdiak, R. S., Zhao, H., Biocatalysis. *Encyclopedia of Chemical Processing* **2006**, DOI: 10.1081/ E-ECHP-120017565, 101-110.
- Van den Wittenboer, A., Niemeijer, B., Kumar Karmee, S., Ansorge-Schumacher, M. B., Systematic assessment of the stability of benzaldehyde lyase in aqueous-organic biphasic systems and its stabilization by modification with methoxy-poly(ethylene) glycol. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 208-213.
- Van der Linden, E., Burgdorf, T., Bernhard, M., Bleijlevens, B., Friedrich, B., Albracht, S. P. J., The soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* contains four cyanides in its active site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004a**, *9*, 616–626.
- Van der Linden, E., Bart, W., Faber, B., Bleijlevens, B., Burgdorf, T., Bernhard, M., Friedrich, B., Albracht, S. P. J., Selective release and function of one of the two FMN groups in the cytoplasmic NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *Eur. J. Biochem.* **2004b**, *271*, 801-808.
- Van Rantwijk, F. und Sheldon, R.A. Biocatalysis in ionic liquids. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2757-2785.
- Vasic-Racki, D., Jonas, M., Wandrey, C., Hummel, W., Kula, M. R., Continuous (R)-mandelic acid production in an enzyme membrane reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, *3*, 215-222.
- Vazquez-Duhalt, R., Semple, K. M., Westlake, D. W. S., Fedorak, P. M. Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of cytochrome *c*. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 936-943.
- Vermue, M. H. und Tramper, J., Biocatalysis in nonconventional media - medium engineering aspects. *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 345-373.
- Vinogradov, A. A., Kudryashova, E. V., Grinberg, V. Y., Grinberg, N. V., Burova, T. V., Levashov, A. V., The chemical modification of α -chymotrypsin with both hydrophobic and hydrophilic compounds stabilizes the enzyme against denaturation in water-organic media. *Protein Eng.* **2001**, *14*, 683-689.
- Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Clark, J. R., Ludwig, M., Lenz, O., Friedrich, B., Armstrong, F. A., Electricity from low-level H₂ in still air - an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase. *Chem. Commun.* **2006**, *48*, 5033-5035.

- Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Parkin, A., Armstrong, F. A., Hydrogen cycling by enzymes: electrocatalysis and implications for future energy technology. *Dalton Trans.* **2005a**, 3397-3404.
- Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Lenz, O., Zebger, I., Friedrich, B., Armstrong, F. A., Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005b**, *102*, 16951-16954.
- Wan, Y.-Y., Lu, R., Xiao, L., Du, Y.-M., Miyakoshi, T., Chen, C.-L., Knill, C. J., Kennedy, J. F., Effects of organic solvents on the activity of free and immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47*, 488-495.
- Wasserscheid, P. und Welton, T., *Ionic liquids in organic synthesis*, 2008, Weinheim: VCH-Wiley.
- Whitesides, G. M., Gitlin, I., Carbeck, J. D., Warum sind Proteine geladen? Netzwerke aus Ladungs-Ladungs-Wechselwirkungen in Proteinen, analysiert über Ladungsleitern und Kapillarelektrophorese. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3090-3131.
- Wichmann, R. und Vasic-Racki, D., Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2005**, *92*, 225-260.
- Wöltinger, J., Karau, A., Leuchtenberger, W., Drauz, K., Membrane reactors at Degussa. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2005**, *92*, 289-316.
- Wu, J. C., Zhang, G. F., He, Z. M., Enhanced activity of *Candida rugosa* lipase modified by polyethylene glycol derivatives. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 211-214.
- Yang, Z., Domach, M., Auger, R., Yang, F. X., Russell, A. J., Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin." *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *18*, 82-89.
- Zhao, H., Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids - a review. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **2010**, *85*, 891-907.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Juliane Ratzka
Anschrift: Rheinsberger Straße 62,
10115 Berlin
Geburtsdatum: 22.03.1984
Geburtsort: Hennigsdorf
Familienstand: ledig

Ausbildung und Berufstätigkeit

08/1990 – 06/1996 Grundschule Velten-Süd
08/1996 – 06/2003 A.S.-Puschkin-Gymnasium; Abschluss: Abitur
10/2003 – 09/2008 Studium der Chemie (Diplom) an der Universität Rostock
Hauptfach: Umweltchemie, Diplomarbeit am Institut für Technische
Chemie der Universität Rostock
Thema: Einflussgrößen auf die Aktivität der Lipase B aus *Candida
antarctica* in binären Systemen
10/2008 – 10/2011 Promotion an der TU Berlin im Rahmen des Exzellenzclusters
„Unifying Concepts in Catalysis“