

Entwicklung von Expressionssystemen für bakterielle Oxidasen und einer Analysetechnologie für die Optimierung industrieller, oxidativer enzymatischer Prozesse

Kurztitel: Oxidasen

Förderkennzeichen: 13094

Projektpartner	Institution
Dr. Tibor Anderlei	AC Biotec GmbH
Dr. Simon Curvers	Prof.-Rehm-Str. 1
Dipl.-Ing. Ingo Knabben	D-52428 Jülich
Prof. Dr. Werner Hummel	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU)
Dipl.-Biol. Mutlu Kuzu	Institut für Molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum Jülich Wilhelm-Johnen-Straße 52426 Jülich
Projektbeginn	August 2003



Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	13094	Referat	32	Fördersumme	164.010 €
Antragstitel	Förderschwerpunkt Biotechnologie: ICBio: Entwicklung von Expressionssystemen für bakterielle Oxidasen und einer Analysetechnologie für die Optimierung industrieller, oxidativer enzymatischer Prozesse				
Stichworte	Schwerpunkt-Biotechnologie , Analytik, Mikrobiologie , Umweltchemikalien , Verfahren				
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)		
2 Jahre	01.08.03	31.07.05	2		
Zwischenberichte	nach 18 Monaten				
Bewilligungsempfänger	AC Biotec GmbH Prof.-Rehm-Str.1 52428 Jülich	Tel	02461-980-119		
		Fax	02461-980-450		
		Projektleitung	Herr Dr. Anderlei		
		Bearbeiter			
Kooperationspartner	- Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Enzymtechnologie in der Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich				

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

In dem geplanten Projekt sollen für drei technisch interessante Oxidasen Expressionssysteme und parallel eine Analysetechnologie für die Optimierung industrieller, oxidativer enzymatischer Prozesse entwickelt werden. Mit diesen Enzymen (L-Aminosäureoxidase (L-AAO), D-Aminosäureoxidase (D-AAO) und NADH-Oxidase (NOX)) sollen neue Syntheserouten für die Herstellung eines breiten Spektrums an D- und L-Aminosäuren, Ketosäuren, Alkoholen und Ketoverbindungen eröffnet werden. Durch den Einsatz von Enzyme können gerade bei der Synthese chiraler Verbindungen schwermetallhaltige Katalysatoren und aufwändige Aufarbeitungsverfahren vermieden werden. Häufig eröffnen sich durch die Anwendung von Enzymen erst wirtschaftliche Synthesewege für die Herstellung chiraler Substanzen.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Feinchemikalien und chirale Vorläufermoleküle, die in der pharmazeutischen und chemischen Industrie eingesetzt werden, müssen meist von sehr hoher Enantiomerenreinheit sein. In den letzten Jahren wurden unterschiedliche biokatalytische Systeme zur Produktion chiraler Feinchemikalien auch im industriellen Maßstab etabliert, so dass Substanzen wie Alkohole, Amide und Aminosäuren auch im Tonnenmaßstab enantiomerenrein hergestellt werden können.

Der Einsatz von Oxidasen für die Herstellung enantiomerenreiner Feinchemikalien wurde bisher wenig untersucht, obwohl diese Enzyme hoch stereoselektiv sind. Außerdem ist der Cofaktor (FAD/FMN) fest gebunden, so dass eine externe Zugabe nicht erforderlich ist. Ebenso ist für Enzyme dieser Gruppe kein zusätzliches Coenzym-Regenerierungssystem erforderlich, da reduziertes FADH₂ oder FMNH₂ durch Sauerstoff reoxidiert wird.

Potenziell interessante Enzyme wie L-Aminosäureoxidasen und NADH-Oxidasen können noch nicht in ausreichender Menge hergestellt werden, um sie für präparative Zwecke einzusetzen. Über genetische Methoden (HHU) und durch

Optimierung der Fermentationsbedingungen (ACB) könnte die Verfügbarkeit dieser Oxidasen jedoch auch verbessert werden.

Bis heute sind zur Verfolgung enzymatischer Umsetzungen meist aufwändige Probennahmen mit anschließender Analytik (z.B. HPLC) notwendig, um das exakte Ende der Reaktion zu bestimmen. Als eine geeignete Lösung für eine Online-Verfolgung oxidasekatalysierter Enzymreaktionen könnte sich das Respiration Activity Monitoring System (RAMOS) etablieren (HHU und ACB).

Hauptziele des Projektes sind die Entwicklung effizienter Expressionssysteme für verschiedene technische interessante Oxidasen und die Erforschung und Etablierung der RAMOS-Technologie auf dem Einsatzgebiet der Enzymtechnologie.

Das Projekt soll innerhalb von 2 Jahren durchgeführt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Oxidasen:

Für alle Enzyme (NOX aus *L. brevis*, die D-AAO aus *T. variabilis*, die D-AAO aus *A. protophormiae* und die L-AAO aus *R. opacus*) konnten im Rahmen der Projektbearbeitung leistungsfähige Expressionssysteme entwickelt werden. Die größten Probleme gab es bei der Entwicklung eines geeigneten Expressionssystems für die L-spezifische AAO aus *R. opacus*, das hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass dieses Enzym mit einer TAT-Signalsequenz exprimiert wird. Nach Optimierung auf genetischer Ebene konnten aber zwei gute Expressionssysteme (in *Streptomyces lividans* und in *E. coli*) erreicht werden.

Die biochemischen Daten der jeweiligen Enzyme, möglichst einschließlich Inhibitorstudien und Strukturdaten stellen die wesentlichen Grundlagen für die Ausarbeitung von biokatalytischen Verfahren dar. Die biochemischen Daten wurden für alle Enzyme umfassend aufgenommen, zwei Enzyme konnten kristallisiert werden. Oxidase-katalysierte Anwendungen konnten für alle Enzyme in kleinem Maßstab umfassend bearbeitet werden. NOX wird für die NAD-Regenerierung bei der oxidativen Racemattrennung eingesetzt, diese Verwendung wurde in gekoppelten Ansätzen für die Synthese von verschiedenen *R*- und *S*-Alkoholen und für diverse D-Aminosäuren aufgezeigt. In aller Regel werden *ee*-Werte von 95 bis praktisch 100% erreicht. D- und L-Aminosäure-Oxidasen können insbesondere für die Darstellung von L- oder D-Aminosäuren eingesetzt werden; es werden immer enantiomerenreine Produkte erhalten. In dem geplanten Projekt sollten für vier technisch interessante Oxidasen Expressionssysteme entwickelt werden.

Fermentationsoptimierung:

Bei der Tv-DAAO wurde eine Produktionsfermentation (*E. coli*) durchgeführt, um Material (DAAO) für die RAMOS-Versuche herzustellen. Diese Fermentation wurde nicht optimiert und spiegelt die Schüttelkolbenergebnisse wieder (12U/mL).

Bei der Fermentationsoptimierung der Ap-DAAO (*E. coli*) hat sich herausgestellt, dass ein exponentielles Feed-Profil die höchste Aktivität (250U/mL) aufweist. Weiterhin wurde die Induktorkonzentration optimiert.

Bei der Fermentation von *Streptomyces lividans* wurde im ersten Schritt die Vorkultur optimiert, mit dem Erfolg, dass wir die gleiche Morphologie im Schüttelkolben wie im Fermenter erreicht haben. Sowohl in Kolben mit als auch ohne Schikanen. Dies ermöglicht es Medienoptimierung im Schüttelkolben durchzuführen. Fermentationen im 40L Maßstab spiegeln bei der spez. Aktivität die Ergebnisse des Schüttelkolbens wieder. Induktionszeitpunktversuche im Schüttelkolben haben gezeigt, dass eine dreifache Steigerung der spezifischen Aktivität (180mU/mg) möglich ist. Einen durchschlagender Erfolg stellt aber die Etablierung des Expressionssystems *E. coli* dar, das vor dem Projektbeginn als nicht realisierbar galt. Damit konnten die Ausbeuten um einen Faktor 170 gegenüber dem Wildtyp gesteigert werden.

Die Hochzelldichtefermentationen der NOX (*E. coli* System) wurden wie erwartet erfolgreich durchgeführt.

RAMOS:

Ein Ziel des Projektes war es die RAMOS-Technologie in der Enzymtechnologie zu etablieren. Dieses Ziel wurde mit diesem Projekt erreicht. Die Ergebnisse zeigen, dass die RAMOS-Technologie wertvolle online-Daten liefert, mit deren Hilfe die Enzymstabilität, -aktivität und -inhibierung gemessen werden können, ohne große Probenahme- und Offline-Analytik-Aufwand. In diesem Projekt wurde nicht nur die Stabilität von Enzymen (D-AAO) bestimmt, sondern auch der Einfluss von anderen Stoffen (wie Wasserstoffperoxid) auf die Enzymaktivität.

Weiterhin konnte mit parallelen Ansätzen der Unterschied zwischen löslichen und immobilisierten Enzym herausgearbeitet werden. Bei der L-AAO konnte mit Hilfe der Online-Technologie eine Substratinhibierung festgestellt werden.

Sogar das gekoppelte Systeme des NOX-Systems (Sauerstoffverbrauch / -produktion in der Enzymregenerierungsreaktion) konnte mit der RAMOS-Technologie vermessen werden. Dieses Ergebnis erweitert natürlich den Anwendungsbereich dieser Technologie.

Die Anwendung der RAMOS-Technologie war in diesem Projekt auf sauerstoffverbrauchende Enzymreaktionen beschränkt gewesen. Diese Beschränkung ist aber nicht zwingend notwendig, da fast jede gasentwickelnde/-verbrauchende Enzymreaktion (z.B. Kohlendioxid) mit dem RAMOS-System vermessen werden können.

Der Einsatz dieser Technologie verringert stark die Probenanzahl, die mit Hilfe einer HPLC vermessen werden müssen. Dadurch wird der Gebrauch von Einwegmaterialien und Lösemitteln reduziert.

Das Scale-Up der RAMOS-Technologie in den 7,5L Maßstab ist mit herkömmlichen Abgasanalytiksystemen problemlos realisierbar.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Die Ergebnisse des Projektes wurden auf folgenden Veranstaltungen veröffentlicht:

- 1) GVC Jahrestagung, München, 2001
- 2) Bioperspectives, Wiesbaden, 2004
- 3) CphI, Brüssel, 2004
- 4) Biocat, Hamburg, 2004
- 5) Bioforum, Lüttich, 2004
- 6) BioPerspectives 2005

Publikationen:

- W. Hummel, M. Kuzu, B. Geueke (2003) "An efficient and selective enzymatic oxidation system for the synthesis of enantiomerically pure D-tert-leucine." *Organic Letters* **5** (20): 3649-50.
- W. Hummel, M. Kuzu, B. Geueke (2004) "Oxidative resolution of racemic mixtures by the coupled use of dehydrogenases and NADH oxidase." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (*in press*).
- M. Kuzu, W. Hummel (2004) "Preparation of D-amino acids by enantioselective oxidation catalyzed by recombinant *Escherichia coli* cells expressing L-leucine dehydrogenase and NADH oxidase." *ChemBioChem* (*submitted*).
- M. Kuzu, K. Niefind, W. Hummel, D. Schomburg (2005) „Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a flavoprotein NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*." *Acta Crystallographica Section F* **61**: 528-30.
- M. Kuzu, W. Hummel (2005) "Influence of the expression conditions on the formation of apo- and holoenzyme from *Lactobacillus brevis* NADH oxidase." *Biochimica et Biophysica Acta* (*submitted*).
- Z. Findrik, D. Vasić-Rački, M. Kuzu, W. Hummel (2005) "Application of a new D-amino acid oxidase from *Arthrobacter protophormiae*" *Engineering in Life Sciences* (*submitted*).
- M. Kuzu, K. Niefind, W. Hummel, D. Schomburg (2005) "Structure of a water-forming NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* refined at 2.7 Å Resolution." *Biochemistry* (*submitted*).

Fazit

In dem geplanten Projekt sollten für vier technisch interessante Oxidasen Expressionssysteme entwickelt werden. Die NOX aus *L. brevis*, die D-AAO aus *T. variabilis*, die D-AAO aus *A. protophormiae* und die L-AAO aus *R. opacus* wurden erfolgreich kloniert und heterolog exprimiert. In allen Expressionsstämmen konnte eine hohe Proteinexpression erzielt werden.

Weiterhin konnte die RAMOS-Technologie erfolgreich in der Enzymtechnologie (Oxidasen) als Alternative zur HPLC-Analytik etabliert werden. Der Einsatz der RAMOS-Technologie reduziert den Einsatz von Lösungsmitteln und Einwegmaterialien, die bei der HPLC-Technologie benötigt werden.

Entwicklung von Expressionssystemen für bakterielle Oxidasen und einer
Analysetechnologie für die Optimierung
industrieller, oxidativer enzymatischer Prozesse

Kurztitel: Oxidasen

Förderkennzeichen: 13094

Projektpartner	Institution
Dr. Tibor Anderlei	AC Biotec GmbH
Dr. Simon Curvers	Prof.-Rehm-Str. 1
Dipl.-Ing. Ingo Knabben	D-52428 Jülich
Prof. Dr. Werner Hummel	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU)
Dipl.-Biol. Mutlu Kuzu	Institut für Molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum Jülich Wilhelm-Johnen-Straße 52426 Jülich

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen des Projekts wurden drei neue bakterielle Oxidasen, NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* (LbNOX), L-Aminosäureoxidase aus *Rhodococcus opacus* (RoLAAO) und D-Aminosäureoxidase aus *Arthrobacter protophormiae* (ApDAAO) sowie für Referenzzwecke die literaturbekannte D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) bearbeitet. Ziel ist es, die Verfügbarkeit dieser Enzyme und ihr technologisches Potential zu bearbeiten, um eine industrielle Anwendbarkeit dieser Oxidasen zu erreichen.

Da von allen Oxidasen die Gene verfügbar sind, wurden heterologe Expressionssysteme und fermentative Produktionsverfahren für die rekombinanten Enzyme ausgearbeitet. Für alle Enzyme konnten im Rahmen der Projektbearbeitung leistungsfähige Expressionssysteme entwickelt werden. Die größten Probleme gab es bei der Entwicklung eines geeigneten Expressionssystems für die L-spezifische AAO aus *R. opacus*, das hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass dieses Enzym mit einer TAT-Signalsequenz exprimiert wird. Nach Optimierung auf genetischer Ebene konnten aber zwei gute Expressionssysteme (in *Streptomyces lividans* und in *E. coli*) erreicht werden. Für alle Enzyme konnten zudem Hochzelldichte-Fermentationsverfahren ausgearbeitet werden.

Die biochemischen Daten der jeweiligen Enzyme, möglichst einschließlich Inhibitorstudien und Strukturdaten stellen die wesentlichen Grundlagen für die Ausarbeitung von biokatalytischen Verfahren dar. Die biochemischen Daten wurden für alle Enzyme umfassend aufgenommen, zwei Enzyme konnten kristallisiert werden. Oxidase-katalysierte Anwendungen konnten für alle Enzyme in kleinem Maßstab umfassend bearbeitet werden. NOX wird für die NAD-Regenerierung bei der oxidativen Racemattrennung eingesetzt, diese Verwendung wurde in gekoppelten Ansätzen für die Synthese von verschiedenen *R*- und *S*-Alkoholen und für diverse D-Aminosäuren aufgezeigt. In aller Regel werden *ee*-Werte von 95 bis praktisch 100% erreicht. D- und L-Aminosäure-Oxidasen können insbesondere für die Darstellung von L- oder D-Aminosäuren eingesetzt werden; es werden immer enantiomerenreine Produkte erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass Oxidase-katalysierte Reaktionen sehr einfach online durch Messung der Sauerstofftransferate mit Hilfe des „Respiration Activity Monitoring System“ (RAMOS) verfolgt werden können. Die bislang erzielten Ergebnisse wurden in 7 eingereichten Manuskripten zusammengestellt.

ANLASS UND ZIELSETZUNG DES PROJEKTES

Feinchemikalien und chirale Vorläufermoleküle, die in der pharmazeutischen und chemischen Industrie eingesetzt werden [1,2], müssen meist von sehr hoher Enantiomerenreinheit sein. Häufig existieren jedoch keine befriedigenden chemischen Syntheserouten, die den Anforderungen an die Reinheit des Produkts und an die Wirtschaftlichkeit des Prozesses gerecht werden.

Mit den in der Literatur beschriebenen Beispielen zur Herstellung von *L-tert*-Leucin [9] und Cephalosporinen [10] ist bereits gezeigt worden, dass Dehydrogenasen und Oxidasen erfolgreich in der Biokatalyse eingesetzt werden. Oft weisen sie erhebliche Vorteile im Vergleich zu rein chemischen Verfahren auf. So kann beim Einsatz von Enzymen auf die Verwendung schwermetallhaltiger Katalysatoren verzichtet werden, die oft in der chiralen Synthese eingesetzt werden.

Der Einsatz von Oxidasen für die Herstellung enantiomerenreiner Feinchemikalien wurde bisher wenig untersucht, obwohl diese Enzyme hoch stereoselektiv sind. Das hat mehrere Gründe: Zum einen sind bislang im Vergleich zu Enzymen anderer Gruppen nur sehr wenig Oxidasen bekannt, im wesentlichen einige Alkohol-Oxidasen, Glucose-Oxidase und D-Aminosäure-Oxidase. Zudem sind die Einsatzgebiete limitiert, da Chiralität oxidativ

zerstört wird und diese Enzyme eher für Racemattrennverfahren oder zur Gewinnung der Oxidationsprodukte eingesetzt werden. Hier gibt es allerdings einige interessante Anwendungsfelder wie beispielsweise die oxidative Verkürzung der Cephalosporin C-Seitenkette, der wesentliche Schlüsselschritt zur Gewinnung semisynthetischer Cephalosporin-Antibiotika [3]. Vorteilhaft ist, dass der Cofaktor (FAD/FMN) fest am Enzym gebunden ist, so dass eine externe Zugabe nicht erforderlich ist. Ebenso ist für Enzyme dieser Gruppe kein zusätzliches Coenzym-Regenerierungssystem erforderlich, da reduziertes FADH₂ oder FMNH₂ durch Sauerstoff reoxidiert wird.

Eine wesentliche Limitierung für die industrielle Anwendung von Oxidasen ist ihre Verfügbarkeit. In einigen wenigen Fällen konnte die Bereitstellung technisch relevanter Oxidasen wie Glucose-Oxidase oder D-Aminosäureoxidase durch rekombinante DNA-Techniken verbessert werden [4-6]. Andere potenziell interessante Enzyme wie L-Aminosäureoxidasen oder NADH-Oxidasen können noch nicht in ausreichender Menge hergestellt werden, um sie für präparative Zwecke einzusetzen. Im Rahmen dieses Projekts soll daher versucht werden, die Verfügbarkeit von ausgewählten Oxidasen mit genetischen Methoden und durch Optimierung der Fermentationsbedingungen zu verbessern.

Ein weiterer Aspekt betrifft die Analytik von Oxidase-katalysierten Prozessen: Bis heute sind zur Verfolgung enzymatischer Umsetzungen meist aufwändige Probeentnahmen mit anschließender Analytik (z.B. HPLC) notwendig, um das exakte Ende der Reaktion zu bestimmen. Bereits während der Ausarbeitung der enzymatischen Verfahren werden bislang oft toxische Farbstoffe (o-Dianisidin, ABTS) für photometrische Messungen der Oxidasen eingesetzt und für die Reaktionskontrolle in aller Regel noch begleitend HPLC- oder GC-Analysen. Bei der chiralen Aminosäureanalytik wird beispielsweise für eine einzige HPLC-Probe 45 ml acetonitrilhaltiger Laufpuffer verwendet, der anschließend entsorgt werden muss. Hinzu kommen Einwegmaterialien, die bei der Vorbereitung der Proben verwendet werden. Zudem liegt das vollständige Ergebnis einer Umsetzung erst beträchtliche Zeit nach Beendigung der Reaktion vor. Die Anwendung der OTR-Analytik ermöglicht es, einen sofortigen online-Einblick in die Reaktion zu erhalten ohne Einsatz von toxischen Reagenzien und Lösungsmitteln.

Als eine geeignete Lösung für eine Online-Verfolgung oxidasekatalysierter Enzymreaktionen hat sich bereits in Vorversuchen das „Respiration Activity Monitoring System“ (RAMOS) [7] erwiesen. RAMOS wurde als Meßsystem für die Online-Bestimmung der Atmungsaktivität

bakterieller Systeme in Schüttelkolben konzipiert [8]. Eigene Vorversuche haben gezeigt, dass sich das Messsignal der RAMOS-Anlage auch für die Online-Verfolgung einer oxidativen Enzymreaktion einsetzen lässt. Damit kann die Reaktion selbst bzw. das Ende der Reaktion detektiert werden, anwendbar ist diese Methode aber auch, um biochemische Daten der Reaktion zu erfassen.

Hauptziele des Projektes sind:

A) die Entwicklung effizienter Expressionssysteme für verschiedene technisch interessante Oxidasen:

- NADH Oxidase (LbNOX) aus *Lactobacillus brevis*,
- D-Aminosäureoxidase (TvDAAO) aus *Trigonopsis variabilis*,
- D-Aminosäureoxidase (ApDAAO) aus *Arthrobacter protophormiae* und
- L-Aminosäureoxidase (RoLAAO) aus *Rhodococcus opacus*
- sowie

B) die Etablierung der RAMOS-Technologie auf dem Gebiet der Enzymkatalyse.

Die Optimierung von Expression und Fermentationsbedingungen der o.a. Oxidasen soll es ermöglichen, diese Enzyme im technischen Maßstab zu produzieren und damit die Voraussetzungen für ein Scale-up der enzymatischen Reaktionen zu schaffen. In Verbindung mit der biochemischen Charakterisierung der neuen Oxidasen (LbNOX, ApDAAO und RoLAAO) und ersten Versuchen zur Anwendbarkeit dieser Enzyme sollen damit die Grundlagen für technische Anwendungen geschaffen werden.

Im folgenden sind die Ergebnisse zu den vier o.a. Oxidasen zusammengestellt, wobei jeweils die Fortschritte bei der Entwicklung von geeigneten Expressionssystemen aufgezeigt werden, die biochemische Charakterisierung der neuen Oxidasen, teilweise bis zur Kristallisation der Enzyme als Voraussetzung für die Gewinnung von Strukturdaten, Daten zur fermentativen Gewinnung der Enzyme und erste Daten zur Anwendung dieser Enzyme einschließlich Daten zum Monitoring von Oxidase-katalysierten Reaktionen mittels RAMOS.

METHODEN, ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. NADH Oxidase aus *Lactobacillus brevis* (LbNOX; NOX)

1.1. Klonierung, Coklonierung und Expression des *nox*-Gens in *E. coli*-Expressionsvektoren

Zur Expression der NOX wurde das Gen jeweils in die vier *E. coli*-Expressions-Vektoren pKK223-3, pET21a, pETDuet1 und pJOE4036 kloniert (Tab. 1). Der Vektor pKK223-3 enthält den IPTG-induzierbaren *tac*-Promotor und eine Ampicillin-Resistenz. Die Vektoren pET21a und pETDuet-1 enthalten den T7-Promotor und eine Ampicillin-Resistenz. Der Expressionsvektor pJOE4036 (entwickelt und zur Verfügung gestellt von Dr. J. Altenbuchner, Universität Stuttgart) enthält den *rhaPBAD*-Promotor, der durch Rhamnose induziert wird und eine Ampicillin-Resistenz.

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen für die NOX wurden umfassende Versuche in *E. coli*-Stämmen durchgeführt. Dabei wurden der Induktionszeitpunkt, die Induktorkonzentration, die Induktionstemperatur und -dauer variiert. Unterschiedliche *E. coli*-Stämme und Expressionsvektoren wurden eingesetzt. In allen zellfreien Rohextrakten wurde NOX-Aktivität gemessen. Eine Zusammenfassung der optimierten Bedingungen für die einzelnen Konstrukte ist in Tabelle 1 zu sehen.

Tab. 1. Heterologe Expression der NADH-Oxidase. Die Induktion wurde bei einer Optischen Dichte von $OD_{550} = 0,5$ durchgeführt. Die spez. Aktivitäten wurden in den zellfreien Rohextrakten gemessen. (n.m. = nicht messbar. Die LeuDH-Aktivität konnte in Gegenwart von NOX nicht photometrisch gemessen werden, da das NADH von der NOX oxidiert wird. Die NOX und die LeuDH konnten allerdings im SDS-Gel in der löslichen und unlöslichen Fraktion als deutliche Bande in allen Ansätzen sichtbar gemacht werden (Abb. 1B), * Methionin-auxotropher *E. coli*-Stamm zur Expression von Selenomethionin-NOX (Se-Met-NOX).

Plasmid	Insert	<i>E. coli</i> -Stamm	Induktor-Konzentration	Induktionsdauer (h)	spez. Aktivität ($U \cdot mg^{-1}$)
pKK223-3	Nox	JM109	50 μ M IPTG	3	87
pET21a	Nox	Tuner(DE3)	100 μ M IPTG	2	115
pETDuet1	Nox	BL21(DE3)	100 μ M IPTG	2.5	81
pETDuet1	Nox	Tuner(DE3)	100 μ M IPTG	5	67
pJOE4036	Nox	BL21(DE3)	0.2 % Rhamnose	4	39
pJOE4036	Nox	JM109	0.2 % Rhamnose	4	43

pETDuet1	Nox leudh	BL21(DE3)	100 μ M IPTG	3	38 n.m.
pET21a	Nox	B834(DE3)*	100 μ M IPTG	5	27

1.2. Aufreinigung und biochemische Charakterisierung der NOX

Die rekombinante NOX (Tuner(DE3)-Zellen mit pET21a/nox) wurde durch zwei verschiedene säulenchromatographische Trennverfahren gereinigt (Tab. 2). Die spez. Aktivität von 40 U/mg im Rohextrakt konnte nach zwei chromatographischen Schritten auf 233 U/mg gesteigert werden. Es wurde eine Gesamtaktivität von 2240 U aus 3 g Zellen (Nassgewicht) erzielt.

Die NOX wurde durch Gelfiltration zusätzlich gereinigt, wodurch homogenes Enzym mit einer spez. Aktivität von 350 U/mg erhalten wurde. Die Homogenität des Enzyms konnte über eine SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 1A). Für die beiden coexprimierten Enzyme LeuDh und NOX konnte ebenfalls eine deutliche Überexpression nachgewiesen werden (SDS-PAGE; Abb. 1B). Dieses Konstrukt wird als Ganzzellsystem für die oxidative Racemattrennung zur Gewinnung von D-Aminosäuren eingesetzt (s. Kap. 1.3).

Tab. 2. Reinigungsschema der NOX nach heterologer Expression in *E. coli*.

	Gesamt- aktivität (U)	Gesamt- protein (mg)	Volumen (mL)	spez. Aktivität (U·mg⁻¹)	Reinigungs- faktor (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	5080	125	10	40.7	1,0	100
Q-Sepharose	6052	77	8,6	78.4	1,9	119
Phenylsepharose	2238	9,6	40	233	5,7	44

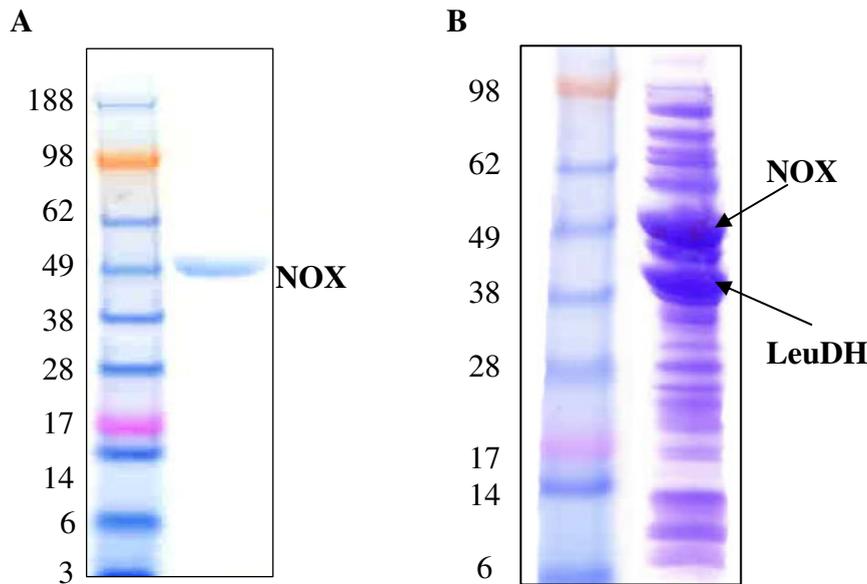
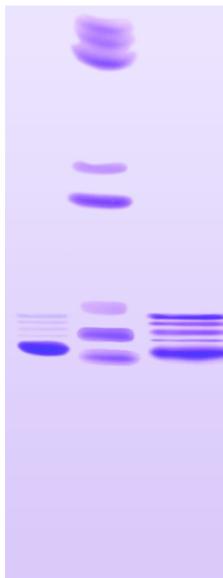


Abb. 1A und B. Coomassiegefärbte SDS/PAGE der A) homogenen NADH Oxidase nach den drei Aufreinigungsschritten und B) vom Rohextrakt aus *E. coli*-Zellen mit coexprimierter LeuDH und NOX, induziert bei $OD_{550} = 0,5$ mit $100\mu\text{M}$ IPTG für 3 Stunden bei 37°C und 120rpm (Linke Spur: Markerprotein).

Die biochemische Charakterisierung der NOX ergab folgende charakteristische Eigenschaften: Das pH-Optimum liegt pH 6,0 (dieser Wert ist wichtig, wenn die NOX zur Coenzym-Regenerierung gekoppelt mit anderen Enzymen eingesetzt wird); der pI wurde experimentell mit 4,7 bestimmt. Das Molekulargewicht liegt bei 196 kDa (Gelfiltration), das der Untereinheiten bei 49 kDa (SDS-PAGE). Mit MALDI/TOF-MS wurde die Masse zu 198.548 Da (Tetramer) und 49.637 Da (Monomer) bestimmt. Der K_M -Wert für NADH liegt bei $0,018 \pm 0,003$ mM, was für den gekoppelten Einsatz sehr vorteilhaft ist, da NADH dann effizient oxidiert wird.

1.2.1. IEF (Isoelektrische Fokussierung)

Mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung konnte die homogene rekombinante NOX (Abb.1A) (exprimiert bei 37°C und 25°C) in das Holoenzym bzw. Apoenzym aufgetrennt werden. Wie in Abb. 2 zu sehen ist, wurde bei einer Expressionstemperatur von 37°C hauptsächlich NOX-Holoenzym gebildet, während bei einer Expressionstemperatur von 25°C ein Gemisch aus NOX-Holo-/Apoenzym gebildet wurde. Aufgrund der unterschiedlichen Nettoladungen der NOX-Holo-/Apoenzyme, welche durch die Anzahl der gebundenen FAD-Moleküle zustande kommt, konnte die Auftrennung des homogenen NOX-Holo-Apoenzym-Gemisches in das einzelne NOX-Holoenzym bzw. -Apoenzym erfolgreich durchgeführt werden.



1. Bande: NOX-Apoenzym pI 5,15 gemessen*
2. Bande: NOX-Apoenzym mit einem FAD pI 5,08 gemessen*
3. Bande: NOX-Apoenzym mit zwei FAD pI 4,99 gemessen*
4. Bande: NOX-Apoenzym mit drei FAD pI 4,92 gemessen*
5. Bande: NOX-Holoenzym mit vier FAD pI 4,76 gemessen*,
pI 4,76 kalkuliert (EXPASY, http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html)

Abb. 2. IEF-Gelelektrophorese und Bestimmung des isoelektrischen Punkts der aufgereinigten NOX. Spur 1: homogene NOX exprimiert bei 37°C, Spur 2: Markerprotein, Spur 3: homogene NOX exprimiert bei 25°C. Die Zellen wurden mit 100 µM IPTG bei OD₅₅₀ = 0.5 induziert; *pI-Messung mittels Markerprotein.

1.2.2. Untersuchung zur Induktionstemperatur, der IPTG-Konzentration und der FAD-Abhängigkeit der NOX

Für die NOX wurde der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Expression sowohl des Holo- als auch des Apoenzym mit *E. coli* Tuner(DE3)/pET21a/nox untersucht. Während der Anzucht der Zellen wurde die IPTG-Konzentration zwischen 0-600 µM, die Induktionstemperatur zwischen 25-37°C variiert und der Induktionszeitpunkt wurde bei OD₅₅₀ 0,5 beibehalten. Anschließend wurde die Aktivität der NOX im Rohextrakt in Gegenwart von 0-15 µM FAD bestimmt. Abbildung 3 fasst einige dieser Ergebnisse zusammen: Zum einen ist hervorzuheben, dass insgesamt ein sehr hohes Expressionsniveau mit einer Aktivität von 120 bis 140 U/mg (s. Abb. 3) im Rohextrakt erreicht wurde. Bei einer spezifischen Aktivität des homogenen Enzyms von ca. 350 U/mg bedeutet dies, dass ca. 40% des löslichen intrazellulären Proteins als NOX-Enzym vorliegen.

Zum anderen zeigen die Versuche, dass die intrazelluläre Konzentration an FAD nicht mehr ausreicht, das Enzym vollständig mit dem Coenzym zu versorgen. Wird der Stamm während der Induktionsphase bei 25°C kultiviert, misst man eine Enzymaktivität von ca. 20 U/mg. Offensichtlich ist aber die Proteinexpression weitaus höher, allerdings wird dann inaktives Protein (Apo-Protein) gebildet. Interessanterweise lässt sich dieses Protein durch nachträglichen FAD-Zusatz *in vitro* dann auf das ca. 6-fache aktivieren, man erreicht dann ca. 120 U/mg (Abb. 3A). Bei einer Anzucht bei 37°C wird mehr FAD in das Enzymprotein eingebaut, man erreicht dann 80 statt 20 U/mg (Abb. 3B). Allerdings liegt auch hier noch ein

Teil des Enzyms als Apo-Protein vor, ein *in vitro*-Zusatz von FAD ergibt eine Steigerung auf ca. 140 U/mg.

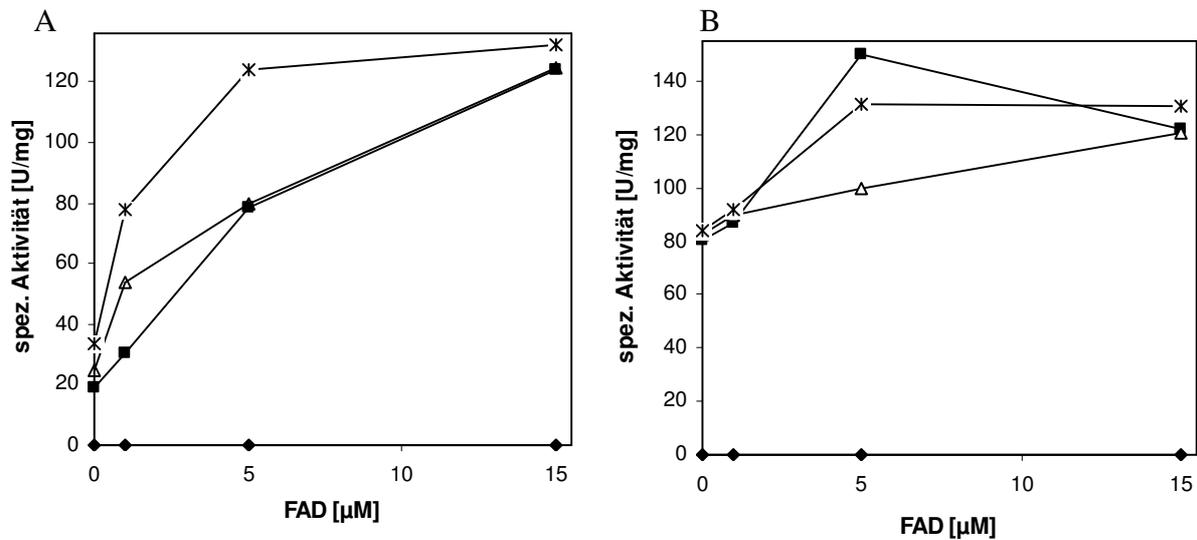


Abb. 3. FAD-Abhängigkeit der NOX aus Tuner(DE3)/pET21a/nox mit Variation der Induktor-konzentration A) bei 25°C Induktionstemperatur und B) bei 37°C Induktionstemperatur : (◆) 0 µM IPTG, (■) 100 µM IPTG, 300 µM IPTG (△), 600 µM IPTG (*).

Ein Zusatz von FAD zum Medium hat keinen Einfluss auf die Bildung von Holo- oder Apo-Enzym, während Riboflavin als Vorstufe der FAD-Biosynthese einen steigernden Einfluss zeigt (Erhöhung auf ca. 160%). Diese Unterschiede sagen momentan wenig über den Einfluss auf biosynthetische Schritte aus, da beispielsweise die Zellaufnahme der Coenzyme unterschiedlich sein kann.

1.2.3. Spektroskopische Eigenschaften

Durch die Anwesenheit von FAD im Enzym zeigen die Oxidasen allgemein ein typisches Absorptionsspektrum, das nur geringfügig durch die Proteinumgebung verändert wird. Die NOX in der Holoform zeigt ein charakteristisches Spektrum mit zwei Maxima bei $\lambda = 372$ nm und 446 nm (Abb. 4, Graph 1). Durch KBr-Behandlung wird das Coenzym herausgelöst, man erhält ein völlig verändertes Spektrum (Abb. 4, Graph 2).

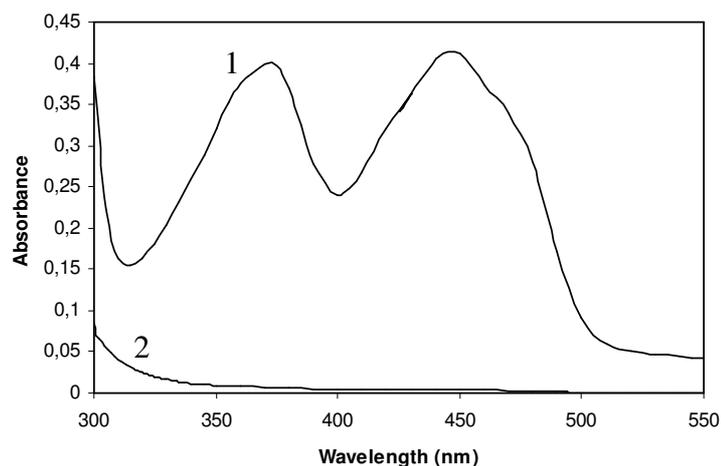


Abb. 4. Absorptionsspektrum des Holo- (1) und des Apoproteins (2) der NOX. Das Apoprotein wurde durch viertägige Lagerung in 2 M KBr erhalten.

Eine Reaktivierung des KBr-behandelten Enzymproteins führt nicht zu einem aktiven Enzym. Das entspricht dem in der Literatur beschriebenen Verhalten bei anderen FAD-abhängigen Enzymen, eine Reaktivierung ist nur in seltenen Fällen möglich.

Während der Enzymreinigung verhalten sich Apo- und Holoenzyme offensichtlich identisch, eine Auftrennung ist nicht möglich. Eine detaillierte Analyse von gereinigtem Enzym mittels MALDI-Massenspektrometrie (Abb. 5) bestätigt die Vorstellung von Apo- und Holoenzym. Zum einen kann man in Proteinpräparaten, die beide Enzymformen enthalten sollten, tatsächlich auch zwei Peaks nachweisen, wobei sich die zugehörigen Massen um die Masse des FAD unterscheiden (784 Da). Zum anderen verhalten sich auch die Peakflächen beim Vergleich der Enzymgewinnungen (Induktionstemperatur) bei 25 und 37°C genau so, wie es aus den Aktivitätsdaten zu erwarten ist.

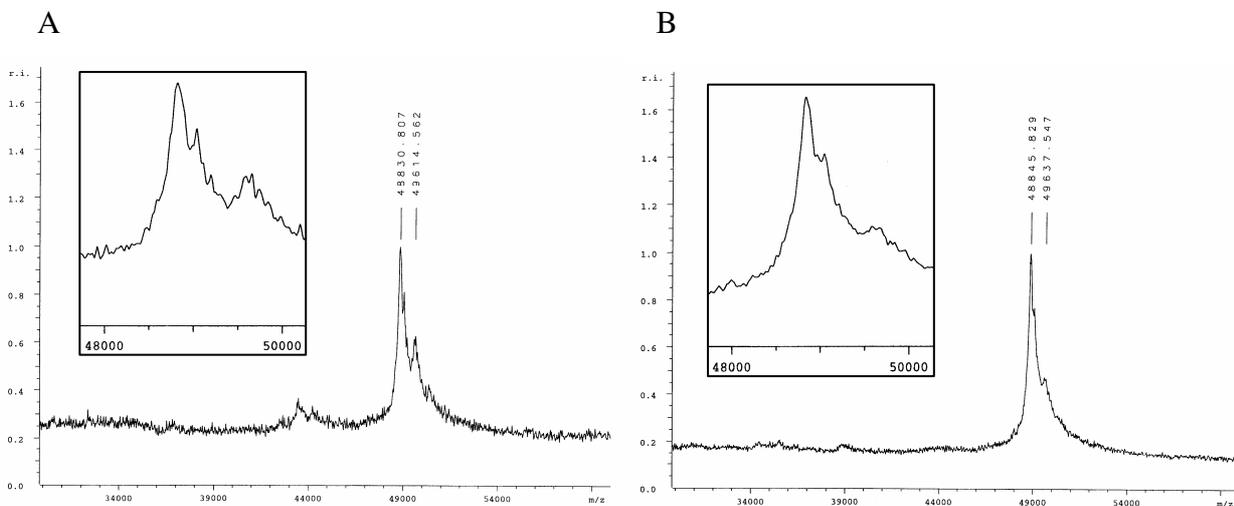


Abb. 5. MALDI/TOF-MS Untersuchungen: Homogene NOX exprimiert A) bei 37°C und B) bei 25°C.

1.2.4. Kristallisation

Die Kenntnis der Struktur bietet längerfristig eine gute Möglichkeit, gezielte Veränderungen am Enzymmolekül vornehmen zu können. Durch Zusammenarbeit mit der AG Prof. Schomburg (Inst. für Biochemie, Universität Köln) konnten Kristalle, die für eine Strukturaufklärung geeignet sind, gewonnen werden.

Alle Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzenden Tropfen in Kristallisationsplatten mit jeweils 24 Reservoirs durchgeführt. Erste Kristalle wurden bei Verwendung der drei Kits Crystal Screen, Crystal Screen 2 und Ammoniumsulfat Screen erhalten (Abb. 6, pH 5,1 – 5,4).

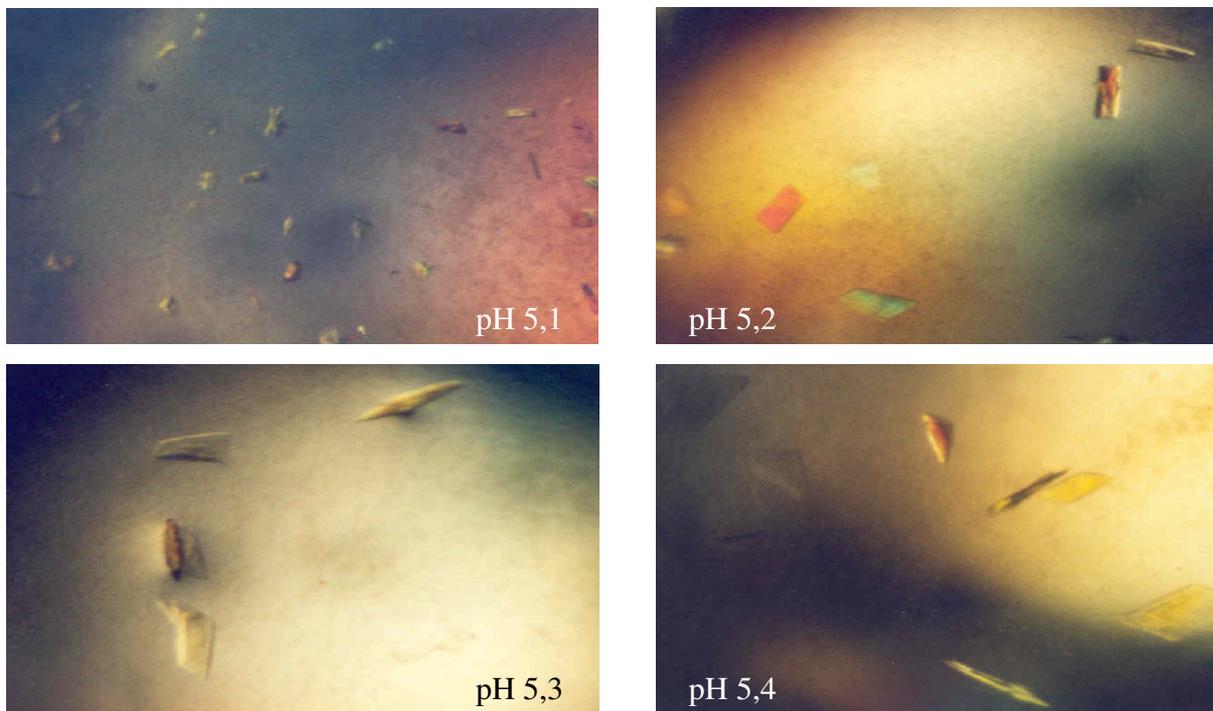


Abb. 6. Kristallisationsbedingungen – 28% PEG MME 2000, 0,1 M Na-acetat, 0,2 M Ammoniumsulfat pH 5,1 – 5,4; 18°C; Vergrößerung xx-fach.

Für die Diffraktionsmessungen gut geeignete Kristalle wurden dann durch Seeding gewonnen (Abb. 7A). Von diesen Kristallen wurde ein Röntgenbeugungsdatensatz bis zu einer Auflösung von unter 2,3 Å vermessen (Institut für Biochemie, Universität Köln) [11].



Abb. 7A. Kristallisationsbedingungen – 34% PEG MME 2000, 15 % Glycerin, 0,1 M Na-acetat, 0,2 M Ammoniumsulfat pH 5,4, 18°C, Kristallgröße: 0,1 mm x 0,1 mm x 0,45 mm.

Die Struktur der NOX wurde mit der Methode des molekularen Ersatzes gelöst und bis zu einer maximalen Auflösung von 2,7 Å verfeinert. Die asymmetrische Einheit enthält acht Monomere bzw. vier Dimere. Das NOX-Monomer besitzt eine konische Form mit Maßen von ca. $62 \times 60 \times 45 \text{ \AA}^3$. Die Tertiärstruktur besteht aus gemischten 29 Strängen β -Faltblättern

und 11 α -Helices (Abb. 7B). Diese Strukturelemente bilden im Zentrum des NOX-Proteins einen Tunnel, die die katalytischen Aminosäurereste und den FAD-Cofaktor enthält und in der das „Substrat“ NADH von der einen Seite sowie O₂ von der anderen Seite des Tunnels bindet.

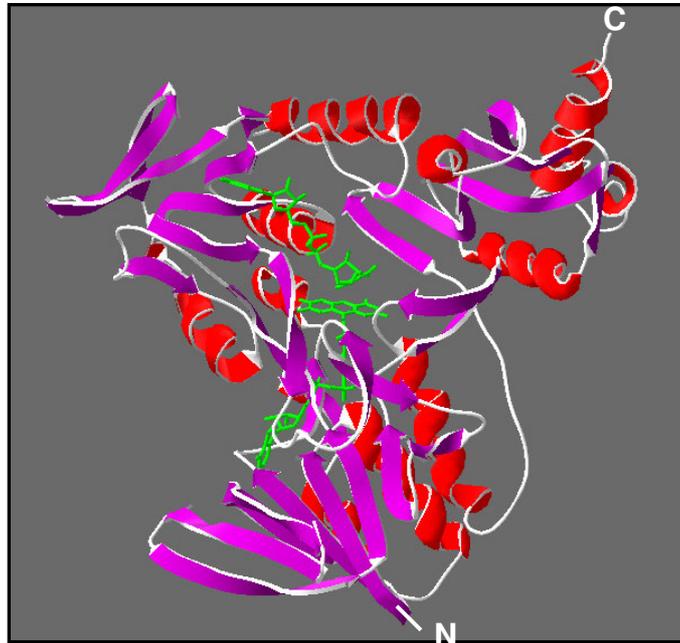


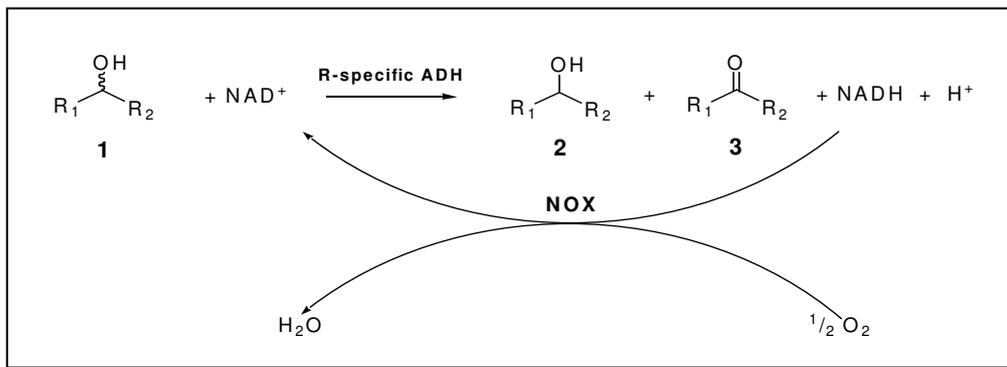
Abb. 7B: Monomer A der NOX nach der Endverfeinerung. Die α -Helices sind rot, die β -Faltblätter violett, das FAD und NAD grün dargestellt. N kennzeichnet den N-Terminus und C den C-Terminus des NOX-Proteins.

Innerhalb dieser Arbeit wurden erstmals die Struktur und der Reaktionsmechanismus einer H₂O-bildenden NADH-Oxidase gelöst. Außerdem konnten strukturelle und mechanistische Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen NADH-Peroxidasen, H₂O₂- und H₂O-bildenden NADH-Oxidasen beschrieben werden.

1.3. Biotechnologischer Einsatz der NOX

1.3.1 Kopplung der NOX mit Alkohol- und Aminosäure-Dehydrogenasen

Die oxidative Racemattrennung kann durch simultane Kopplung von NAD⁺-abhängigen Dehydrogenasen mit der NADH-Oxidase aus *L. brevis* durchgeführt werden. Formelschema 1 zeigt dies am Beispiel der Oxidation von Alkoholen; enantiomerenreine (*S*)-Alkohole können danach durch den gekoppelten Einsatz einer (*R*)-ADH und der NOX gewonnen werden.



Formelschema 1. Oxidative Gewinnung enantiomerenreiner Alkohole durch gekoppelten Einsatz einer (R)-Alkohol-Dehydrogenase und der NOX zur Regenerierung des Coenzym NAD⁺. 1 = Racemat eines Alkohols; 2 = enantiomerenreiner oder -angereicherter S-Alkohol; 3 = Ketosäure.

Für die erforderliche NAD-Regenerierung sollte die NOX gut geeignet sein. Das Enzym oxidiert NADH mit einem sehr niedrigen K_M-Wert (18 µM). Überdies besitzt die NADH-Oxidase noch den Vorteil, dass sie H₂O statt H₂O₂ als Produkt bildet [12,13]. Beide charakteristischen Merkmale sind wichtig für die präparative Anwendung, wenn dieses Enzym für die Regeneration von NADH verwendet wird. Für diese Anwendung wurde die Kopplung der NADH-Oxidase mit vier verschiedenen Aminosäure-Dehydrogenasen und zwei Alkohol-Dehydrogenasen untersucht [14-16]. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Kopplung der NOX mit ADH, in Tabelle 4 die mit der Aminosäure-DH (AADH) zusammengefasst.

Tab. 3. Übersicht über die Umsetzungen mit der (S)-ADH bzw. (R)-ADH und der NOX (n.b. = nicht bestimmt).

Enzyme	Substrat	100 % Umsetzung der		Inhibierung durch das Produkt	Inhibierung durch das andere Enantiomer
		(S)-Komponente	(R)-Komponente		
(S)-ADH aus <i>Rhodococcus erythropolis</i> und NOX	(R,S)-para-Cl-Phenylethanol	+	-	n. b.	n. b.
	(R,S)-1-Phenylethanol	+	-	n. b.	n. b.
	(S)-1-Phenylethanol	+	-	n. b.	Ja
	(R,S)-2-Octanol	+	-	Ja	Ja
	(R,S)-2-Hexanol	+	-	n. b.	n. b.
(R)-ADH aus <i>Lactobacillus kefir</i> und NOX	(R,S)-para-Cl-Phenylethanol	-	+	n. b.	n. b.
	(R,S)-1-Phenylethanol	-	+	n. b.	Nein

Tab. 4. Übersicht über die Umsetzungen mit den Aminosäure-Dehydrogenasen und der NOX (n.b. = nicht bestimmt).

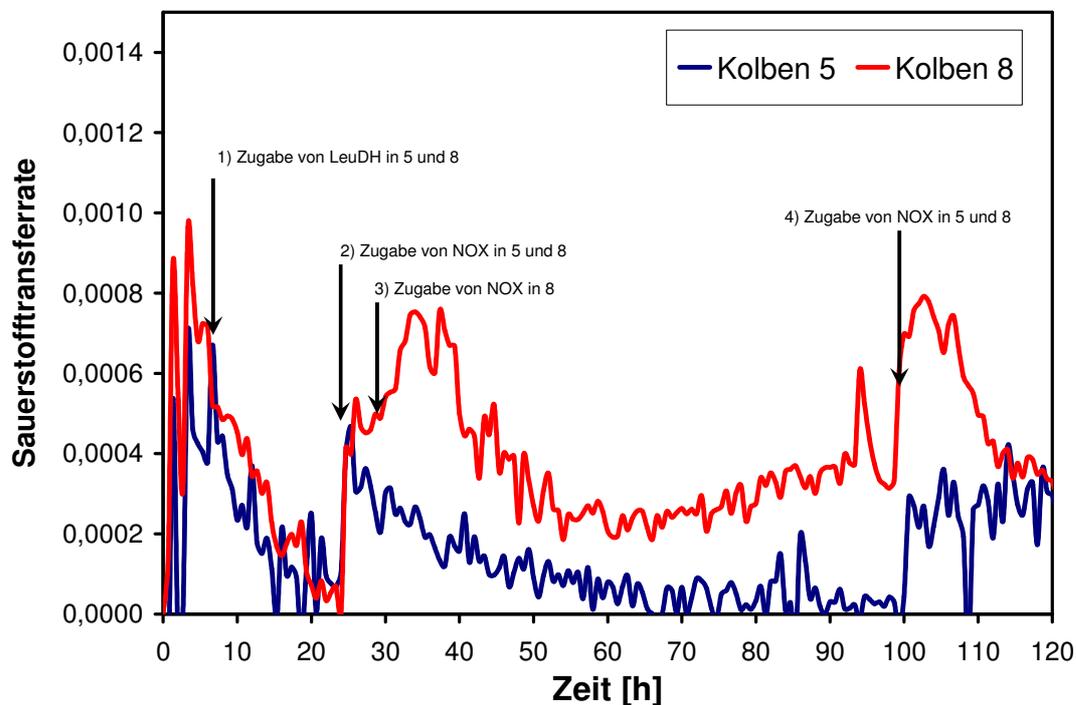
Enzyme	Substrat	Umsetzung der L-Aminosäure (%)	Inhibierung durch das Produkt	Inhibierung durch das andere Enantiomer
L-AlaDH aus <i>B. subtilis</i> und NOX aus <i>L. brevis</i>	10 mM DL-Alanin	92,6	Ja	Nein
L-PheDH aus <i>R. species</i> und NOX aus <i>L. brevis</i>	10 mM DL-Phenylalanin	0	Ja	Ja
L-GluDH aus Rinderleber und NOX aus <i>L. brevis</i>	10 mM DL-Glutaminsäure	~ 100	Ja	Ja
L-LeuDH aus <i>B. cereus</i> und NOX aus <i>L. brevis</i>	10 mM DL-Leucin	95,5	n. b.	Ja
	10 mM DL- <i>tert</i> -Leucin	99,3	n. b.	Ja
	66 mM DL- <i>tert</i> -Leucin	25,7	n. b.	Ja
Rohextrakt: L-LeuDH und NOX	10 mM DL-Leucin	91,9	n. b.	Ja
Ganzzellbiotransformation (L-LeuDH u. NOX)	10 mM DL-Leucin	96,6	n. b.	Ja

Die beiden Tabellen 3 und 4 zeigen, dass eine Anwendung der NOX für oxidative Racemat-trennungen für ein breites Anwendungsfeld gut möglich ist. In Kopplung mit Alkohol-Dehydrogenasen wurde ein Enantiomer immer vollständig oxidiert, das andere ist kein Substrat der Alkohol-Dehydrogenase, so dass man bei 100% *ee* zu einer Ausbeute von 50% kommt. In Kopplung mit Aminosäure-Dehydrogenasen ergibt sich ein etwas komplexeres Bild: Phenylalanin-DH wird durch das Produkt Phenylpyruvat und durch die D-Aminosäure gehemmt. Für Alanin-DH, Glutamat-DH und Leucin-DH wurden zwar auch Inhibierungen gemessen, trotzdem ist eine oxidative Anwendung möglich. Auch wenn in den o.a. aufgeführten Vorversuchen in der Regel noch keine vollständigen Trennungen erreicht wurden, sollte dies unter Berücksichtigung der kinetischen und Inhibitor-Eigenschaften erreichbar sein.

Auch Ganzzellsysteme mit klonierter Aminosäure-DH und NOX sind in der Lage, eine oxidative Racemattrennung zu katalysieren (Tab. 4). Auch hier ist eine weitere Verbesserung des Katalysators auf genetischer Ebene möglich.

1.3.2 Online Monitoring des gekoppelten System mit RAMOS

Bedingungen: Medium: 50mM DL-Leucin, 50mM Tris (pH=8), 1mM NAD, 0,35U LeuDH (Löslich) im Ansatz, 1U NOX im Ansatz, Füllvolumen 30mL (Kolben 5), 28mL Kolben 8, Temperatur 30°C, Schüttelbedingungen: 200RPM und 50mm Schütteldurchmesser



In diesem Versuch wurde das gekoppelte System LeuDH und NOX mit Hilfe der RAMOS-Technologie online verfolgt.

In den ersten 24 Stunden fällt die Sauerstofftransferate kontinuierlich von einem Wert 0,0006 mol/L/h auf fast Null ab. Trotz der sehr niedrigen Sauerstofftransferatenwerte (Vergleich OTR(Mikroorganismen) ca. 0,03 mol/L/h) können die Ansätze sehr gut mit der RAMOS-Technologie verfolgt werden.

Nach ca. 6 Std. wurde die gleiche Menge LeuDH (0,35U) in die beiden Ansätze hinzugeben. Diese Zugabe führt zu keinem Zuwachs der Sauerstofftransferate. Der Ausschlag der Sauerstofftransferatenkurve (Kolben 5) zu diesem Zeitpunkt ist auf

Temperaturschwankungen zurückzuführen. Daraus folgt, dass die LeuDh zu diesem Zeitpunkt nicht limitierend ist.

Nach 24 Std. wurde in beiden Ansätzen NOX in Höhe der Initialkonzentration hinzugeben. Das sofortige Ansteigen der Sauerstofftransferate zeigt, dass die NOX und damit die Zurückgewinnung von NAD⁺ in dieser gekoppelten Reaktion limitieren war. Eine weitere Zugabe der NOX in Höhe der Initialkonzentration zum Zeitpunkt 27. Stunde führt zu einer weiteren Steigerung des Sauerstoffverbrauches im Kolben 8.

Nach 100 Stunden wurde erneut NOX hinzugefügt und der Effekt von der 24. Stunde reproduziert.

Der Versuch zeigt, dass die RAMOS-Technologie sich eignet, dass gekoppelte System LeuDh und NOX online zu verfolgen.

2. D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO)

2.1. Klonierung, Coklonierung und Expression des *tvdaao*-Gens

Zur Expression der TvDAAO wurde das Gen in den *E. coli*-Expressionsvektoren pET21a kloniert bzw. cokloniert mit der Katalase (HPH) aus *E. coli* K12. Die besten Expressionsbedingungen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

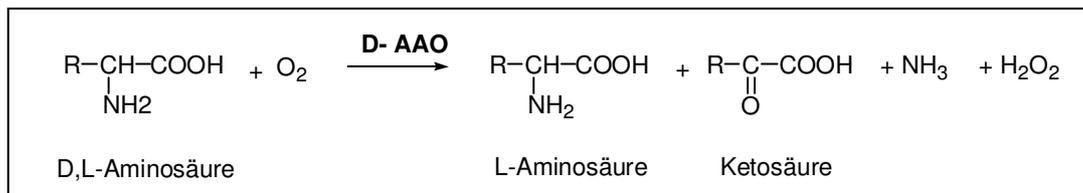
Tab. 5: Heterologe Expression der TvDAAO mit und ohne Katalase (HPH aus *E. coli* K12). Die Induktion wurde bei 30°C und einer Optischen Dichte von OD₅₅₀ = 0,5 durchgeführt. Die spez. Aktivitäten wurden in den zellfreien Rohextrakten gemessen.

Plasmid	Insert	<i>E. coli</i> - Stamm	Induktor- Konzentration	Induktions- dauer (h)	spez. Aktivität (U·mg ⁻¹)
pET21a	Tvdaao	BL21(DE3)	50 µM IPTG	6	11
pET21a	Tvdaao	BL21(DE3)	100 µM IPTG	4	10
	hpII				50

Wie bei der NOX konnte auch bei diesem Enzym beobachtet werden, dass unter bestimmten Anzucht- bzw. Expressionsbedingungen ein hoher Anteil an Apoenzym gebildet wird. Auch hier lässt sich die Aktivität durch *in vitro*-Zusatz von FAD beträchtlich steigern. Ein Zusatz von FAD bzw. Riboflavin zum Medium ergibt auch hier wieder wie bei der NOX nur geringfügige Einflüsse auf die Enzymaktivität.

2.2. Biotechnologische Anwendung der TvDAAO

D-Aminosäure-Oxidasen können zur Synthese ungewöhnlicher L-Aminosäuren aus dem Racemat eingesetzt werden; im Rahmen der Herstellung von semisynthetischen Cephalosporin-Derivate werden sie bereits eingesetzt.



Formelschema 2. Racemattrennung eines Aminosäure-Racemats mittels D-Aminosäure-Oxidase zur Gewinnung von L-Aminosäuren.

2.2.1. Ganzzellbiotransformation

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Racematspaltung mit ganzen Zellen dargestellt. Dabei wurden die Konstrukte BL21(DE3)/pET21a/TvDAAO und BL21(DE3)/pETDuet1/TvDAAO/HPII verwendet. In allen Ansätzen konnte ein *ee*-Wert von $\geq 99,6\%$ mit und ohne Katalase bzw. Toluol zur Permeabilisierung der Zellmembran erzielt werden. Weder Katalase noch der Zusatz von Toluol zeigten einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der oxidativen Reaktion.

Tab. 6. Übersicht über die Ganzzell-Umsetzungen mit TvDAAO mit und ohne Katalase.

Enzyme	Substrat	Toluol	<i>ee</i> (%)
Ganzzellbiotransformation (TvDAAO)	100 mM	Ja	$\geq 99,6$
	DL-Methionin	Nein	$\geq 99,6$
Ganzzellbiotransformation (TvDAAO/Katalase HPII)	100 mM	Ja	$\geq 99,6$
	DL-Methionin	Nein	$\geq 99,6$

2.2.2. RAMOS-Versuche

Die DAAO aus *Trigonopsis variabilis* wurde in diesem Projekt ausgesucht, da dieses literaturbekannte Enzyme kurzfristig verfügbar war und einen sofortigen Start in die Etablierung der RAMOS-Technologie auf dem Gebiet der Oxidasen ermöglicht. Die Abbildung 8 zeigt den online gemessenen Verlauf der Sauerstofftransferate bei der Umsetzung der Substrate

Phenylalanin und Methionin durch die TvDAAO. Die Sauerstofftransferate steigt rapide an, bevor ein langsamer Abfall folgt. Der rapide Anstieg in der ersten Stunde spiegelt nicht die Wirklichkeit wieder, da die RAMOS-Anlage zuerst mit einem Spülzyklus beginnt, bevor sie dann, mit der ersten Messphase den ersten Messpunkt generiert. In der Realität wird aber von der ersten Sekunde an Sauerstoff verbraucht. Dieser Mangel kann durch eine einfache Anpassung der Software (mit einer Messphase starten) behoben werden.

Abbildung 9 stellt die Integrale der Sauerstofftransferatenkurven dar. Die Kurvenverläufe verdeutlichen, dass die TvDAAO Methionin besser umsetzen kann als Phenylalanin. Weiterhin verdeutlichen die mit einer HPLC offline gemessenen Daten die Qualität der online gemessenen Sauerstofftransferaten (Abb. 8). Die Absolutwerte der offline Daten liegen in der Anfangsphase etwas höher als die online Daten, dies liegt in dem oben diskutierten Phänomen (Beginn mit der Spülphase) begründet (Abweichung ca. 5%).

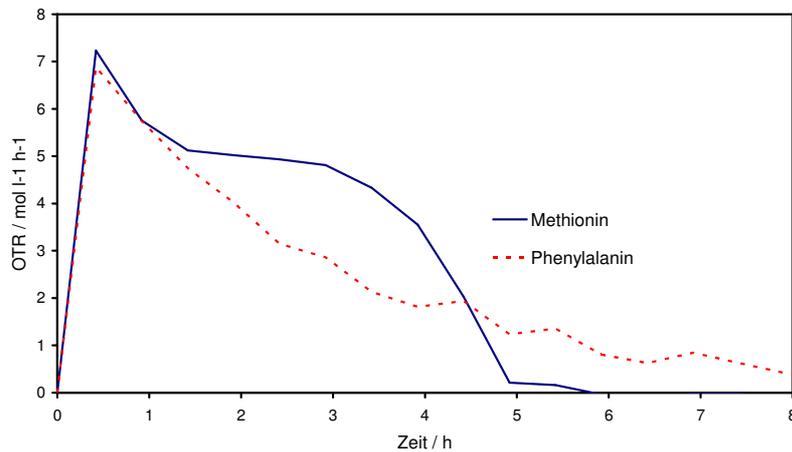


Abb. 8. Sauerstofftransferate der TvDAAO (50 mM Substratkonzentration, 50 mM Kpi-Puffer, ohne Katalase, 30 mL Füllvolumen, 200 RPM, 50 mm).

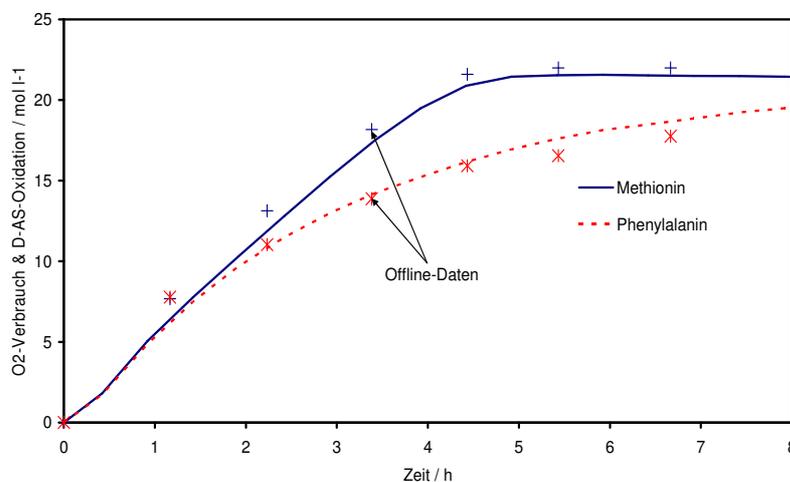


Abb. 9. Integral der Sauerstofftransferate der TvDAAO (50 mM Substratkonzentration, 50 mM Kpi-Puffer, ohne Katalase, 30 mL Füllvolumen, 200 RPM, 50 mm).

Weiterhin zeigt die Abbildung 10, dass es sich um eine unvollständige Umsetzung handelt, da 25 mM Substrat (äquimolar zum Sauerstoffverbrauch) umgesetzt werden müsste. Diese unvollständige Umsetzung wurde mit dem nächsten Experiment untersucht. Die Versuchsparameter sind in der Abbildung 10 dargestellt. Wie im vorhergehenden Versuch wird die Sauerstofftransferate und das Integral derselbigen dargestellt. Nach ca. 7 Stunden ist die Sauerstofftransferate auf Null abgesunken und zeigt damit an, dass die Umsetzung beendet ist. Analog zum vorhergehenden Experiment deutet das Sauerstoffintegral auf eine unvollständige Umsetzung hin. Die Zugabe von TvDAAO nach 21 Std. führt zu einem erneuten Anstieg der Sauerstofftransferate und bestätigt, dass noch Substrat in der Flüssigkeit vorhanden war, welches nicht durch die erste Enzymcharge umgesetzt wurde. Ergebnisse, die mit der ApDAAO gewonnen wurden, weisen daraufhin, dass die DAAO irreversibel von dem Nebenprodukt Wasserstoffperoxid geschädigt wird. Das geplante Scale-Up der Umsetzung in den 7,5 L Maßstab ist unter diesen Voraussetzungen nicht durchführbar.

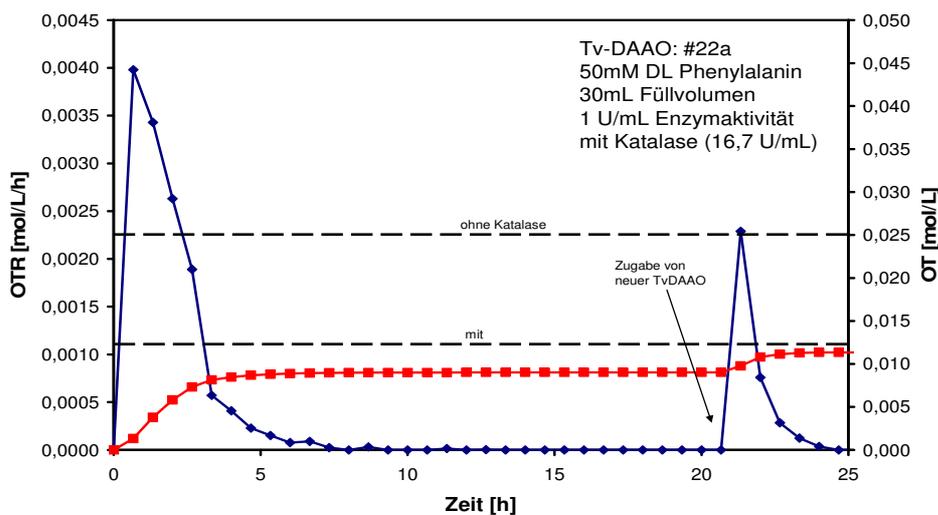


Abb. 10. Umsatz von L-Phenylalanin durch die TvDAAO in der RAMOS-Anlage (s. Angaben in der Abb.).

Die beispielhaften Daten zeigen, dass sich die RAMOS-Anlage sehr gut als online-Analytik für Umsetzungen mit Oxidasen einsetzen lässt. Der aufwendige Einsatz von offline-Analysenmethoden (ressourcenverbrauchend) wird dadurch drastisch reduziert.

2.3. Fermentation des rekombinanten *E. coli* BL21(DE3)-Stammes

Der *E. coli* BL21(DE3)-Expressionsstamm wurde im 7,5 L Bioreaktor fermentiert. Eine Fermentationsoptimierung wurde allerdings nicht mit diesem Enzym, sondern mit der D-AAO aus *A. protophormiae*, durchgeführt. Nach einer batch-Anwuchsphase wurde der

Feed gestartet (Glucose-Feed (20 mL/min bzw. 12 mL/min)). Weitere Werte sind in der Abbildung 11 dargestellt.

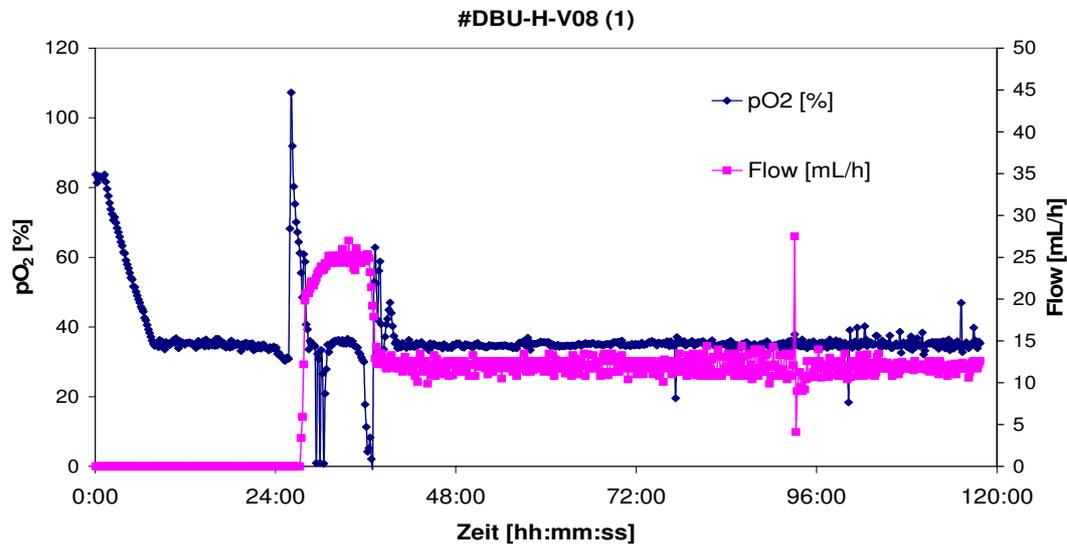


Abb. 11. Feed- und gelöst Sauerstoff-Profil bei der Fermentation von *E. coli* BL21(DE3)/ TvDAAO. Die Ergebnisse der Fermentation sind in der Abbildung 12 dargestellt. Die höchste

Enzymaktivität wurde nach ca. 70 Std. erreicht (11 U/mL). Dieses Ergebnis spiegelt die Schüttelkolbenergebnisse wieder.

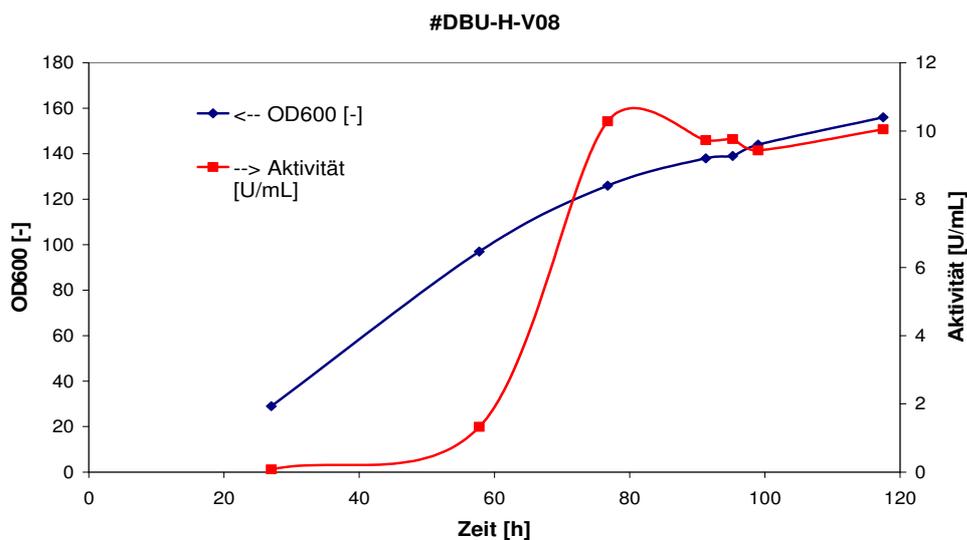


Abb. 12. Verlauf der optischen Dichte (OD₆₀₀) der Fermentationsbrühe und der Enzymaktivität der TvDAAO (30% iger Aufschluss).

Da sich die Fermentationsprozesse von der TvDAAO und der ApDAAO ähneln, wurde die Fermentationsoptimierung, wie geplant, mit dem *E. coli*-Stamm der ApDAAO durchgeführt. Nach Optimierung des Prozesses wurde eine ca. 20-fach höhere Volumenaktivität (240 U/mL) erreicht (siehe ApDAAO).

3. D-Aminosäureoxidase aus *Arthrobacter protophormiae* (ApDAAO)

3.1. Klonierung und Expression des *apdaao*-Gens

Für die Expression der ApDAAO erwies sich der *E. coli*-Expressionsvektor pET21a als gut geeignet. Nach Optimierung erreicht man eine spezifische Enzymaktivität im Rohextrakt von 30 U/mg.

3.2. Aufreinigung und biochemische Charakterisierung

Die rekombinante ApDAAO, gewonnen aus Zellen von *E. coli* BL21(DE3) mit pET21a/apdaao, wurde durch zwei verschiedene säulenchromatographische Trennverfahren gereinigt (Tab.7). Die spez. Aktivität von 30 U/mg im Rohextrakt konnte auf das 6-fache gesteigert werden. Über SDS-PAGE konnte nachgewiesen werden, dass die ApDAAO nach der zweiten chromatographischen Reinigung homogen vorlag.

Tab. 7. Reinigungsschema der ApDAAO nach heterologer Expression in *E. coli*.

	Gesamt- aktivität (U)	Gesamt- protein (mg)	Volumen (mL)	spez. Aktivität (U·mg⁻¹)	Reinigungs- faktor (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	2556	85	10	30	1,0	100
Q-Sepharose	1909	24	9,7	80	2,7	75
Hydroxylapatit	1434	8	12	180	6,0	56

Die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung der ApDAAO sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tab. 8. Zusammenfassung der biochemischen Daten für die ApDAAO.

pH-Optimum	K_M	pI	Molekulargewicht	
			Gelfiltration Nativ	SDS-PAGE Monomer

pH 7,5–8,5 80 mM TEA/HCl	0,90 mM für D-Methionin	4,4	79 kDa Homodimer	40,0 kDa
-----------------------------	----------------------------	-----	---------------------	----------

3.2.1. Spektroskopische Eigenschaften

Auch die D-AAO aus *A. protophormiae* zeigt ein für FAD-abhängige Enzyme charakteristisches Absorptionsspektrum mit zwei Maxima bei $\lambda = 379$ nm und 457 nm [17].

3.2.2. Einfluss von zugesetztem FAD und Riboflavin auf die Enzymaktivität

Sowohl dem Medium zugesetztes Riboflavin als auch FAD führen zu einer deutlichen Steigerung der Enzymausbeute von 6 auf 16 U/mg (Rohextrakt).

3.2.3. Stabilitätsuntersuchung der ApDAAO

Anwendungen mit der ApDAAO sowie den beiden Enzymen RoLAAO und NOX haben gezeigt, dass diese Enzyme in nativer Form relativ instabil sind, die Halbwertszeiten bei 30°C liegen im Bereich von ca. 3 Std. Alle drei Enzyme konnten allerdings durch Immobilisierung beträchtlich stabilisiert werden. So wurde für optimal immobilisierte ApDAAO nach 15 Tagen bei 30°C noch eine Restaktivität von 90% gemessen.

3.3. Biotechnologische Anwendung der ApDAAO

Der Anwendungsbereich der ApDAAO entspricht prinzipiell dem der TvDAAO (Formelschema 2). Unterschiede ergeben sich im wesentlichen aus den unterschiedlichen Substratspektren beider Enzyme.

3.3.1. RAMOS-Versuche

Im ersten Schritt wurden analog zur TvDAAO verschiedene Umsetzungen durchgeführt, die mit der RAMOS-Technologie online verfolgt wurden. Das Ergebnis war analog zur TvDAAO. Die ApDAAO war zum einen nicht stabil und zum anderen wurde das Enzym von selbst produzierten Wasserstoff geschädigt.

Erster Lösungsansatz war die Zugabe von Katalase, die das produzierte Wasserstoffperoxid zersetzen soll. In weiteren RAMOS-Versuchen konnte gezeigt werden, dass Katalase die

irreversible Schädigung der DAAO nicht verhindert. Im zweiten Schritt sollte immobilisierte ApDAAO getestet werden. Stabilitätsversuche (siehe oben) zeigten eine deutliche Verbesserung gegenüber der freien ApDAAO. Abbildung 13 zeigt exemplarisch einen RAMOS-Versuch mit der immobilisierten ApDAAO.

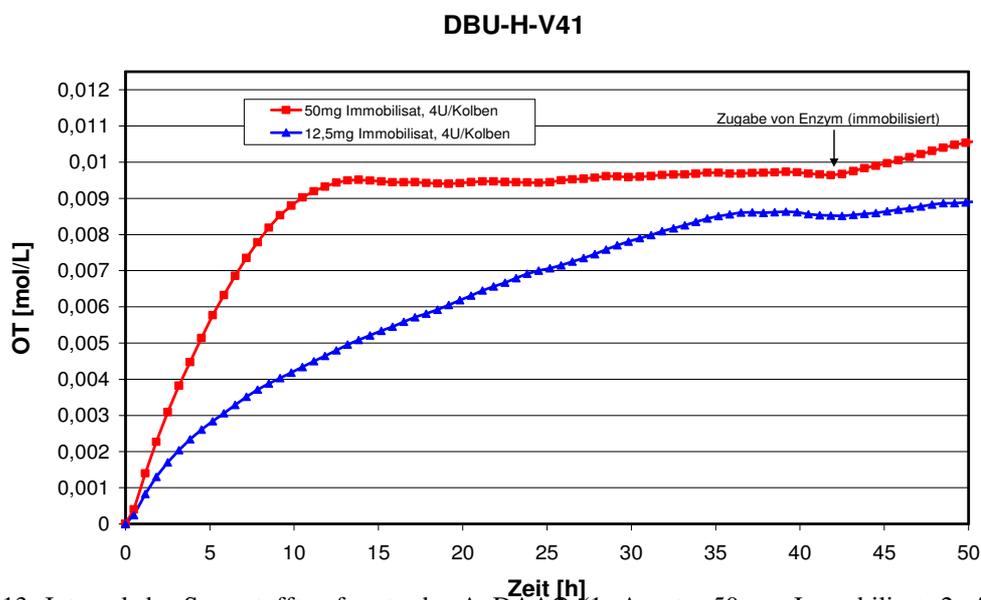


Abb. 13. Integral der Sauerstofftransferate der ApDAAO (1. Ansatz: 50 mg Immobilisat, 2. Ansatz: 12,5 mg Immobilisat, Aktivität der ApDAAO 4 U/30mL, Füllvolumen 30 mL, 50 mm, 200 RPM, Zugabe von Katalase (16,7 U/30mL)).

Wie erwartet, findet die Umsetzung mit der höheren Immobilisatmenge schneller statt als mit der geringeren. Beide Ansätze erreichen aber noch nicht die Endkonzentration von 12,5 mmol/L Sauerstoff (bzw. 25 mM D-Phenylalanin Endumsatz).

Dies zeigt, dass die Enzym-eigene Stabilität durch Immobilisierung zwar erheblich verbessert wurde, der schädigende Einfluss des Wasserstoffperoxid aber weiterhin vorhanden ist. Möglicherweise hilft hier eine Co-Immobilisierung der Oxidase mit Katalase. Das geplante Scale-Up der Umsetzung in den 7,5 L Maßstab wurde unter diesen Voraussetzungen noch nicht durchgeführt.

3.4. Fermentation

Es wurden verschiedene fed-batch Fermentationen durchgeführt, die in Tabelle 9 aufgeführt sind:

Tab. 9. Fermentationen zur Optimierung der Expression der ApDAAO in *E. coli* BL21(DE3).

IPTG-Konzentration	Feed-Strategie	Medium	Fermenter	Aktivität (U/mL)

50 μ M	konstanter Feed (20mL/min)	PAN-Medium	7,5 L	55
400 μ M	konstanter Feed (20mL/min)	PAN-Medium	7,5 L	60
5 mM	Exponentieller Feed ($\mu = 0,12$ 1/h)	Mineralsalz Medium mit Hefeextrakt	40 L	243
50 μ M	konstanter Feed	PAN-Medium	400 mL	11
400 μ M	konstanter Feed	PAN-Medium	400 mL	19
1 mM	konstanter Feed	PAN-Medium	400 mL	9
5 mM	konstanter Feed	PAN-Medium	400 mL	5

Es ist zu erkennen, dass die Fermentation mit einer exponentiellen Fütterungsstrategie und einem Medium mit Hefeextrakt die größte volumetrische Aktivität aufweist (das 4-fache im Vergleich zur konstanten Feed-Rate-Strategie). Dieses Ergebnis muss noch mit einer weiteren Fermentation auf Reproduzierbarkeit überprüft werden.

4. L-Aminosäureoxidase aus *Rhodococcus opacus* (RoLAAO)

Bei dieser bakteriellen Oxidase handelt es sich um ein neues Enzym, das kürzlich in der AG Hummel gefunden wurde. Von diesem Enzym abgesehen ist nur eine L-Aminosäure-Oxidase aus Schlangengift bekannt, die für industrielle Anwendungen aber aus diversen Gründen nicht eingesetzt werden kann. Das bakterielle Enzym wird offensichtlich im Wildstamm exportiert, die Genanalyse hat eine typische TAT-Signalsequenz aufgezeigt. Möglicherweise handelt es sich dabei auch gleichzeitig um einen biochemischen Schutzmechanismus, da eine intrazellulär aktive L-Aminosäure-Oxidase den internen Aminosäure-Pool beträchtlich stören könnte. Für die heterologe Expression stellt diese Signalsequenz aber auch eine Komplikation dar, da für eine optimale Expression zusätzlich die Signalsequenz, die Peptidase und auch der Transportweg mit einbezogen werden müssen.

4.1. Klonierung und Expression der RoLAAO

Zur Expression der RoLAAO wurde das Gen mit und ohne Signalsequenz jeweils in die drei *E. coli*-Expressionsvektoren pKK223-3, pET32a und pJOE4036 kloniert. Trotz umfangreicher Variationen der Expressionbedingungen konnte in den zellfreien Rohextrakten keine

L-AAO-Aktivität gemessen werden. Bei einigen Ansätzen konnte lediglich die L-AAO als deutliche Bande im SDS-Gel in der unlöslichen Fraktion sichtbar gemacht werden.

Da keine RoLAAO Expression in *E. coli* erzielt wurde, wurde nun das *laao*-Gen mit der *Rhodococcus*-Signalsequenz in die *Streptomyces*-Expressionsvektoren pIJ6021 und pUWL201 kloniert. Der Expressionsvektor pIJ6021 enthält den durch Thiostrepton induzierbaren *p_{tipA}*-Promotor und die *tipA* ribosomale Bindungsstelle, eine 'multiple cloning site', ein Kanamycin- und ein Thiostrepton-Resistenzgen (*kan* und *tsr*) und zwei Transkriptionsterminatoren (*t_o* und *t_{fd}*) [18].

Der Vektor pUWL201 ist ein Shuttle-Vektor und kann in *E. coli* und *Streptomyces* amplifiziert werden. Strangaufwärts der 'multiple cloning site' liegt der konstitutive Promotor *ermEp**, strangabwärts der Transkriptionsterminator *t_{fd}*. Soll der Vektor für die Expression in *Streptomyces* eingesetzt werden, muss eine ribosomale Bindungsstelle am 5'-Ende des Gens eingefügt werden, da der Vektor solch einen Sequenzabschnitt nicht enthält [19].

Mit diesem System ist es zumindest gelungen, eine Expression der LAAO zu erreichen. Die Optimierung der Expressionsbedingungen zeigte, dass der Induktionszeitpunkt einen großen Einfluss auf die Expression der L-AAO hat. Wurden die Zellen nach 10 h induziert, lag die spezifische Aktivität im zellfreien Rohextrakt nach weiteren 23 h bei 180 mU·mg⁻¹. Bei Induktion zum Animpfzeitpunkt oder nach 5 h verlangsamte sich das Wachstum deutlich und die spezifischen Aktivitäten erreichten Werte von maximal 70 mU·mg⁻¹.

Streptomyces lividans (pUWL201/laao+) wurde in YEME, low sugar, kultiviert, zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und auf L-AAO-Aktivität untersucht. Im Vergleich zu *Streptomyces lividans* (pIJ6021/laao+) wuchsen diese Zellen deutlich langsamer. Die höchste spezifische Aktivität wurde nach 53 h Kultivierungsdauer erreicht und lag bei 55 mU·mg⁻¹.

Die Vorteile eines induzierbaren Expressionssystems zeigten sich im Vergleich der zwei getesteten Plasmide. Während durch die konstitutive Expression der L-AAO in *Streptomyces lividans* (pUWL201/laao+) das Wachstum verlangsamt wurde und die Enzymausbeute relativ niedrig war, lag die spezifische L-AAO-Aktivität im Rohextrakt von *Streptomyces lividans* (pIJ6021/laao+) nach einer vorläufigen Optimierung des Induktionszeitpunktes und der -dauer um den Faktor 3 höher.

Zum Ende der Klonierungsarbeiten gelang es, die L-AAO heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Dabei wurde das *laao*-Gen mit und ohne Signalsequenz in andere *E. coli*-Expressionsvektoren - die anfänglich nicht untersucht wurden - kloniert und in *E. coli* exprimiert. Dabei wurden spezifische Aktivitäten von bis zu 1100 mU/mg erreicht (pE3laao). Damit liegt die höchste spez. Aktivität mit 1100 mU/mg im Rohextrakt 6-mal höher als die mit 180 mU/mg in *Streptomyces lividans* erreichbare und 34-mal höher als im *Rhodococcus opacus* Wildtyp (32 mU/mg).

Eine Zusammenfassung der getesteten Bedingungen für die einzelnen Konstrukte ist in Tabelle 10 zu sehen.

Tab. 10. Heterologe Expression der RoLAAO. Variation der Induktions- und Kultivierungsbedingungen für verschiedene Vektor-Wirt-Systeme (n.b. = nicht bestimmt, +/- = mit und ohne eigene Signalsequenz aus *Rhodococcus opacus*, cho+ = mit Choleroxidase-Signalsequenz aus *Streptomyces spec.*).

Konstrukt: Plasmid/ Insert	Stamm	Induktor- konz.	Induktions- Dauer (h)	Induktions- Zeitpunkt	Temp. (°C)	Aktivität	Inclusion Bodies
pKK223-3/ laao+	<i>E. coli</i>	0,01-1 mM IPTG	4	OD ₅₅₀ = 0,6- 0,7	25-37	-	-
pKK223-3/ laao-	<i>E. coli</i>	1 mM IPTG	4-14	OD ₅₅₀ = 0,3- 0,4	37	-	-
pKK223-3/ laao+	<i>E. coli</i>	0,5-1 mM IPTG	4-14	OD ₅₅₀ = 0,3- 0,4	25-37	-	+
pKK223-3/ laao-	<i>E. coli</i>	0,5-1 mM IPTG	4	OD ₅₅₀ = 0,3- 0,4	30-37	-	-
pJOE4036/ laao+	<i>E. coli</i>	0,2% Rhamnose	2-4	OD ₅₅₀ = 0,5- 0,7	20-30	-	+
pJOE4036/ laao-	<i>E. coli</i>	0,2% Rhamnose	2-4	OD ₅₅₀ = 0,5- 0,7	20-30	-	-
pET32a/ laao+	<i>E. coli</i>	1 mM IPTG	4-5	OD ₅₅₀ = 0,4- 0,6	37	-	+
pIJ6021/ laao+	<i>Strepto- myces lividans 1326</i>	5 µg/mL Thio- strepton	5-53	0-20 h	30	210 mU/mg	+
pUWL201/ laao+	<i>Strepto- myces lividans 1326</i>	5 µg/mL Thio- strepton	5-53	0-20 h	30	55 mU/mg	+
pIJ6021/ laaocho+	<i>Strepto- myces lividans 1326</i>	5 µg/mL Thio- strepton	48	20 h	30	-	n.b.
pE3laao+/-	<i>E. coli</i>	0,01-1 mM	4-30	OD ₅₅₀ = 0,4- 1,7	25-37	1100 mU/mg	-

4.2. Reinigung und biochemische Charakterisierung der RoLAAO

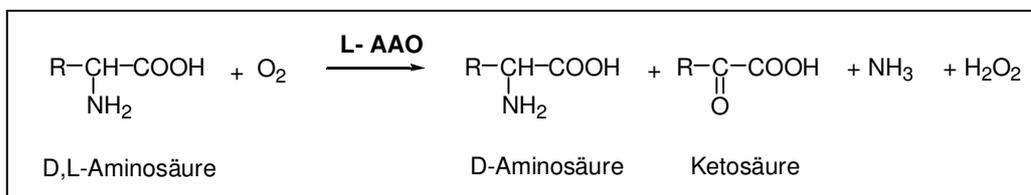
Die rekombinante RoL-AAO konnte durch drei Chromatographieschritte zur Homogenität aufgereinigt werden; die spezifische Aktivität der rec-L-AAO für L-Alanin lag bei 5,4 U·mg⁻¹. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem der Wildtyp L-AAO. Das Enzym liegt als Homodimer vor mit einer Molmasse von 54,2 kDa (MALDI-TOF) für die Untereinheit. Der K_M-Wert für L-Alanin liegt bei 0,3 mM.

4.2.1. Inaktivierung der L-AAO durch Wasserstoffperoxid

Überraschenderweise verhält sich die L-AAO Wasserstoffperoxid gegenüber völlig anders als die anderen und auch literaturbekannte Oxidasen. Inkubationen mit den schon relativ hohen H₂O₂-Konzentrationen bis 100 mM für 30 min hatten keine Desaktivierung ergeben. Erst bei noch höheren Konzentrationen wurde bei ca. 300 mM eine 50%-ige Schädigung beobachtet. Offensichtlich sind keine für die Aktivität oder Struktur wichtigen frei zugänglichen SH-Gruppen im Enzym vorhanden.

4.3. Biotechnologische Anwendung der RoLAAO/Präparation von D-Aminosäuren

L-Aminosäure-Oxidase ist ein interessanter Katalysator, da man damit einen technologisch sehr einfachen Zugang zu D-Aminosäuren hat (Formelschema 3).



Formelschema 3. Gewinnung von D-Aminosäuren durch Racemattrennung eines Aminosäure-Racemats mittels L-Aminosäure-Oxidase.

Das Substratspektrum ist sehr breit und umfasst aliphatische, aromatische und basische Aminosäuren. Einziger Cofaktor ist O₂, und auch die weiteren biochemischen Eigenschaften zeigen, dass dieses Enzym für Anwendungen gut geeignet sein sollte. Eine Inhibierung durch D-Aminosäuren und auch durch gebildetes H₂O₂ konnte nicht beobachtet werden. Im folgenden sind daher eine Reihe verschiedener Katalysatortypen, basierend auf der L-AAO, vergleichend geprüft worden, die Verwendung ganzer Wildtyp-Zellen, gereinigtes und immobilisiertes Enzym, quervernetztes Enzym oder auch Enzym im Enzym-Membran-Reaktor.

4.3.1. Ganzzellbiotransformation

Rhodococcus opacus-Zellen wurden zur Racemattrennung von D,L-Aminosäuren eingesetzt. Vorteile einer solchen Ganzzellbiotransformation sind im Allgemeinen der geringe Arbeitsaufwand, da kein Enzym präpariert werden muss, und die Möglichkeit, den Katalysator nach der Umsetzung einfach abzutrennen und erneut zu verwenden. Jedoch ist die volumetrische Aktivität begrenzt und die Reaktionsgeschwindigkeit kann aufgrund von Transportprozessen ebenfalls limitiert sein.

In allen Ansätzen konnte nach maximal 2 h kompletter Umsatz der L-Komponente beobachtet werden, so dass *ee*-Werte für D-Phenylalanin von über 99% erreicht wurden (Tab. 11).

4.3.2. Partiiell gereinigte RoLAAO

4.3.2.1. Umsatz von DL-Phenylalanin

Bei der Verwendung partiell gereinigter L-AAO zur Racematspaltung kann aufgrund der hohen Löslichkeit des Enzyms die Katalysatorkonzentration besser angepasst werden als beim Einsatz ganzer Zellen oder immobilisierten Enzyms. Die Möglichkeit zur Rückgewinnung der L-AAO über Ultrafiltration muss besonders bezüglich der Enzymausbeuten untersucht werden. D,L-Phenylalanin wurde im 1 mL-Maßstab durch die L-AAO umgesetzt. Dabei wurde die L-Komponente nahezu vollständig (99,6%) umgesetzt, der *ee*-Wert für D-Phe lag damit bei 99,2%.

4.3.2.2. Umsatz von DL-Serin

Der Umsatz von D,L-Serin wurde im 1 mL-Maßstab in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer gemessen. Anschließend wurde eine Maßstabsvergrößerung (200 mL) durchgeführt. In beiden Ansätzen konnte die L-Komponente zu 98 % bzw. 99 % umgesetzt werden.

4.3.3. Immobilisierte RoLAAO

Durch Immobilisierung auf festen Trägermaterialien wird die Abtrennung des Katalysators vom Reaktionsgemisch deutlich erleichtert und die Stabilität von Enzymen wird oft verbessert. Diese Vorteile rechtfertigen dann den Einsatz der relativ teuren Trägermaterialien und den erhöhten Arbeitsaufwand bei der Optimierung der Immobilisierungs- und Reaktionsbedingungen. Mit Eupergit als Träger konnte eine Immobilisierungsausbeute von 80% erreicht werden, die Halbwertszeit für immobilisiertes Enzym bei 30°C lag bei mehreren Tagen.

4.3.3.1. Recycling des Immobilisats

L-AAO auf Eupergit[®] wurde in mehreren Zyklen unter Standardbedingungen eingesetzt, um die Stabilität des Immobilisats unter Reaktionsbedingungen zu testen (Abb.14). Nach jeweils einer Stunde wurde zentrifugiert, der Überstand entnommen und eine neue Reaktion durch Zugabe von Substrat, Katalase und Puffer gestartet. Bei der Annahme eines linearen Reaktionsverlaufs entspricht dies einem Aktivitätsverlust von 28% im Verlauf der sechs Zyklen bzw. einem Verlust von ca. 5% pro Zyklus. Damit ist immobilisiertes Enzym für eine Vielzahl von Zyklen anwendbar.

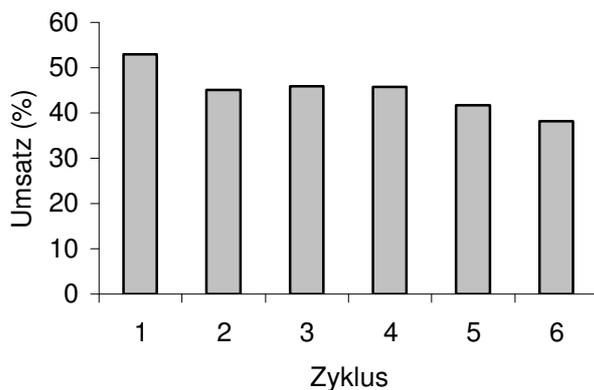


Abb. 14. Wiederholter Einsatz von Eupergit C[®] mit D,L-Phenylalanin als Substrat. Nach 1 h Reaktionsdauer unter Standardbedingungen wurde der Umsatz für L-Phenylalanin bestimmt.

4.3.4. Herstellung und Anwendung von Cross-linked enzyme crystals (CLECs)

CLECs sind durch kovalente Quervernetzung stabilisierte Proteinkristalle, die vermehrt in der technischen Anwendung eingesetzt werden. Die hohe Katalysatordichte im Kristall, die meist deutlich erhöhte Stabilität der Enzyme und die gute Separierbarkeit vom Reaktionsansatz sind die Vorteile dieser relativ neuen Methode [20-24]. Die L-AAO kristallisierte reproduzierbar und in kurzer Zeit in einem Konzentrationsbereich von 6-10 mg·mL⁻¹ mit 8-20% PEG 4000 in 0,1 M Hepes pH 7,8 (Abb. 15).

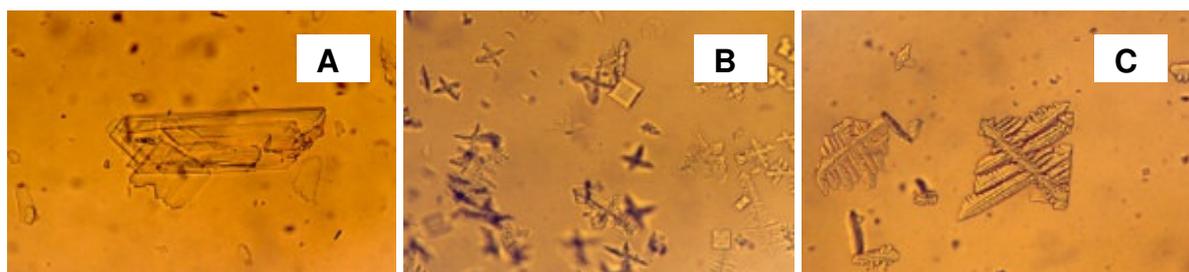


Abb. 15. L-AAO-Kristalle vor der Quervernetzung (A: 0,3 x 0,1 mm, - Isopropanol, - Cymal-5[®]; B: 0,05 x 0,05 mm, + Isopropanol, + Cymal-5[®]; C: 0,2 x 0,2 mm, + Isopropanol, - Cymal-5[®]).

Beim Einsatz der CLECs für die Racematspaltung von D,L-Phenylalanin wurde deutlich, dass bei der Quervernetzung mit Glutardialdehyd sehr hohe Aktivitätsverluste (>99,9%) auftraten. Das ist in aller Regel ein Hinweis darauf, dass im aktiven Zentrum des Enzyms eine Aminosäure, wahrscheinlich Lysin, vorhanden ist, die mit Glutardialdehyd reagiert. Trotz der geringen Restaktivität war es möglich, durch Verlängerung der Reaktionszeiten Umsätze von 99,6% und *ee*-Werte von 99,2% zu erzielen.

4.3.5. Enzym-Membran-Reaktor (EMR)

Der Einsatz von Enzymen in einem EMR ermöglicht die kontinuierliche Herstellung des gewünschten Produkts bei gleichzeitiger Zurückhaltung des Katalysators durch die Membran. Eine Voraussetzung für stabile Betriebsbedingungen sind relativ geringe Aktivitätsverluste des Enzyms während der Prozesszeiten. Bei dieser Anwendung zeigte sich allerdings, dass die L-AAO ihre katalytische Aktivität verlor, bevor konstante Reaktionsbedingungen erreicht werden konnten. Aufgrund dieser offensichtlichen Instabilität des Enzyms im EMR wurde der Versuch nach 7 h abgebrochen.

In Tabelle 11 ist eine Zusammenfassung der Racemattrennung von DL-Phenylalanin mit verschiedenen RoLAAO Enzympräparaten dargestellt.

Tab. 11. Vergleich der verschiedenen Enzympräparationen, die für die Racemattrennung von D,L-Phenylalanin eingesetzt wurden.

Enzym- präparation	Ver- fahren	Umsatz (%)	<i>ee</i> (%)	Vorteile	Nachteile
<i>Rhodococcus opacus</i> -Zellen	batch	>99	>99	• Einfache Handhabung	• Zellen lysieren
Freie L-AAO	batch & rep. batch	>99	>99	• Einfache Handhabung • Enzym mittels UF recyclebar	
L-AAO auf Eupergit	batch & rep. batch	>99	>99	• Sehr gute Ausbeuten bei Immobilisierung • Katalysator gut separierbar • Erhöhte Stabilität	• Kosten des Trägermaterials • O ₂ -Versorgung beim Scale-Up?
L-AAO als CLEC	batch	>99	>99	• Katalysator gut separierbar • Erhöhte Stabilität	• 99,9% Aktivitätsverlust während der Quervernetzung
Freie L-AAO	EMR:	62			• Keine stabilen

4.3.6. RAMOS-Versuche

Die RoLAAO wurde in verschiedenen RAMOS-Versuchen eingesetzt. Exemplarisch werden drei Versuche dargestellt, die die Eigenschaften der LAAO und die Unterschiede zur DAAO hervorheben.

Abbildung 16 stellt einen RAMOS-Versuch dar, bei dem DL-Phenylalanin von der RoLAAO ohne Anwesenheit von Katalase umgesetzt wurde. Weiterhin wurde das Füllvolumen variiert. Die gleichen Niveaus der beiden Sauerstofftransferratenkurven zeigen, dass die Umsetzungen nicht durch die Schüttelbedingungen limitiert sind, sondern durch die Enzymkinetik. Dieses Ergebnis stellt die Basis dar, damit eine Ermittlung der Enzymkinetik mit RAMOS möglich ist.

Weiterhin weist das Ansteigen der Sauerstofftransferrate am Ende der Umsetzung auf eine Substratinhibierung der enzymatischen Umsetzung hin. Das Integral beider Sauerstofftransferraten (25 mM Sauerstoffverbrauch) zeigt, dass die Umsetzung vollständig war. Eine irreversible Schädigung der LAAO, wie bei der DAAO, wird hier nicht beobachtet.

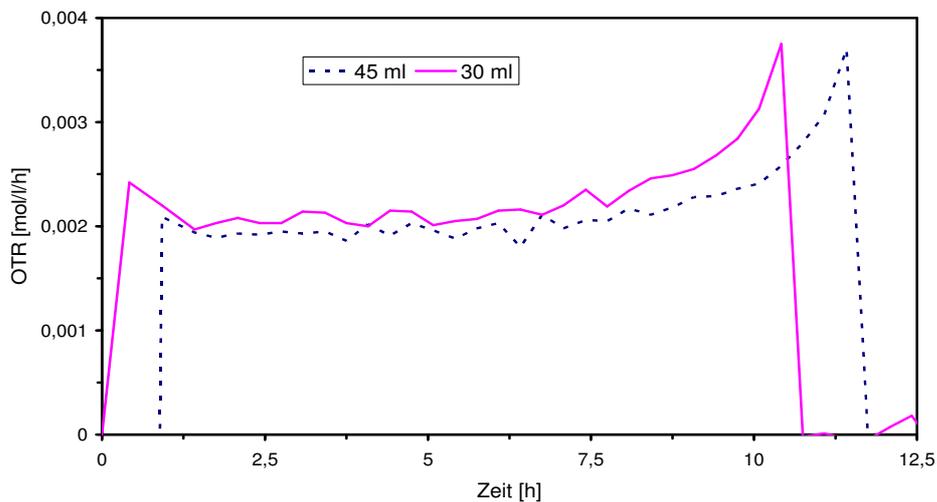


Abb. 16. Umsetzung von DL-Phenylalanin durch die RoLAAO (Füllvolumen variabel, 200 RPM, 50mm, 4.3 U Gesamtaktivität pro Kolben, Puffer: 50 mM Kpi pH 7.5, ohne Katalase).

In Abb. 17 ist der Sauerstoffverbrauch der Umsetzung mit LAAO dargestellt, beim Einsatz verschiedener L-Aminosäuren. Während sich die Umsetzungen von L-Alanin, L-Phenylalanin und L-Leucin ähnlich verhalten, ist der Umsatz von L-Valin wesentlich langsamer.

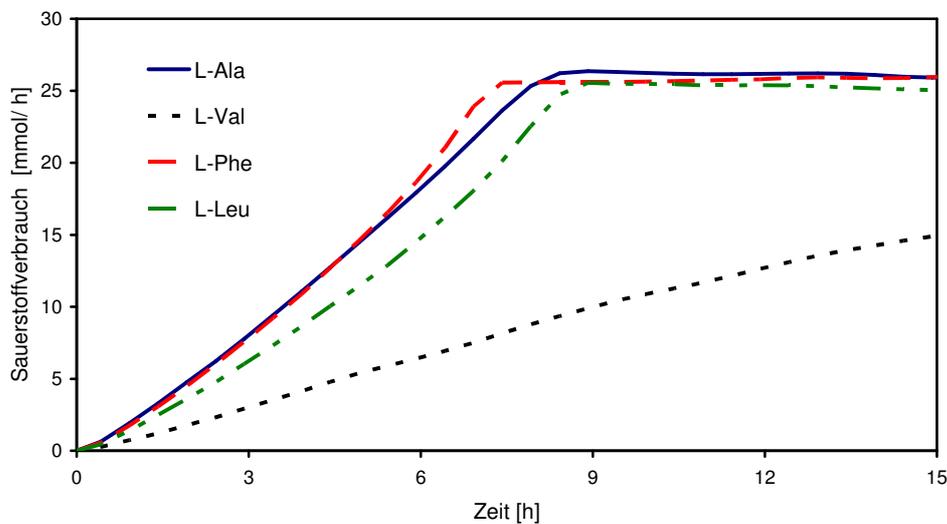


Abb. 17. Umsetzung von 50 mM DL-Aminosäure durch die RoLAAO in der RAMOS-Anlage (Gesamtvolumen 30 mL, 200 RPM, 50mm, 4.3 U Gesamtaktivität pro Kolben, Puffer: 50 mM Kpi pH 7.5, ohne Katalase).

Die Beispiele zeigen, dass das RAMOS-System erfolgreich in der Enzymkatalyse eingesetzt werden kann. Die Online-Technik reduziert im erheblichen Maße die aufwendigen und ressourcenbindenden offline-Analysenschritte. Im nächsten Schritt wird diese Messtechnologie auf den 7,5 L Reaktor übertragen, Voraussetzung dafür ist die Verfügbarkeit von ausreichenden Mengen an Enzym.

4.3.7. Scale Up / Substratinhibierung

Aus den RAMOS-Daten konnte folgende Enzymkinetik für die LAAO (Phenylalanin) gewonnen werden:

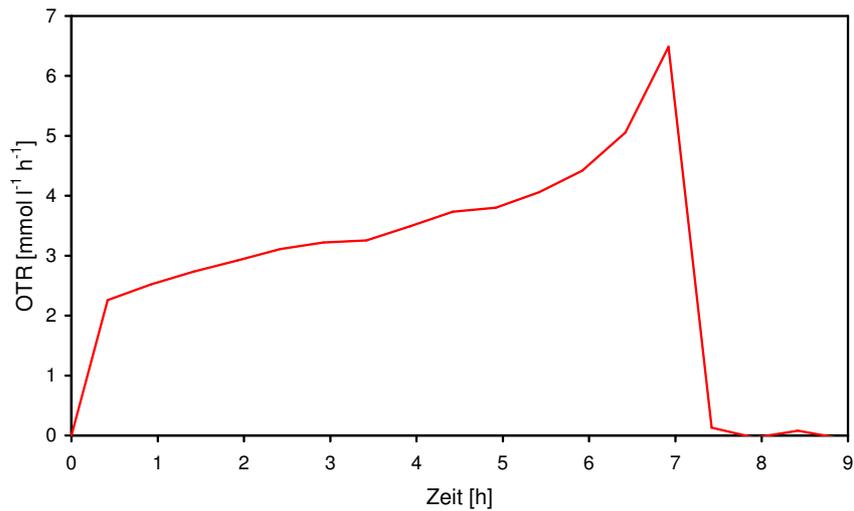


Abb. 18: Versuchsdaten: 50mM KPi (pH7,5); lösliches Enzym 3,5mL (4U), 50mM DL-Phenylalanin, 30mL Füllvolumen, 200 RPM, 50mm

$$V = V_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_S + \frac{S^2}{K_I}}$$

$$v_{\max} = 0,1455 \text{ [U/mL]}$$

$$K_S = 0,0143 \text{ [mM]}$$

$$K_I = 7,48 \text{ [mM}^2\text{]}$$

Diese Daten bilden die Basis für die Erstellung eines Modells, welches die Originaldaten (siehe unten) wie erwartet gut wieder.

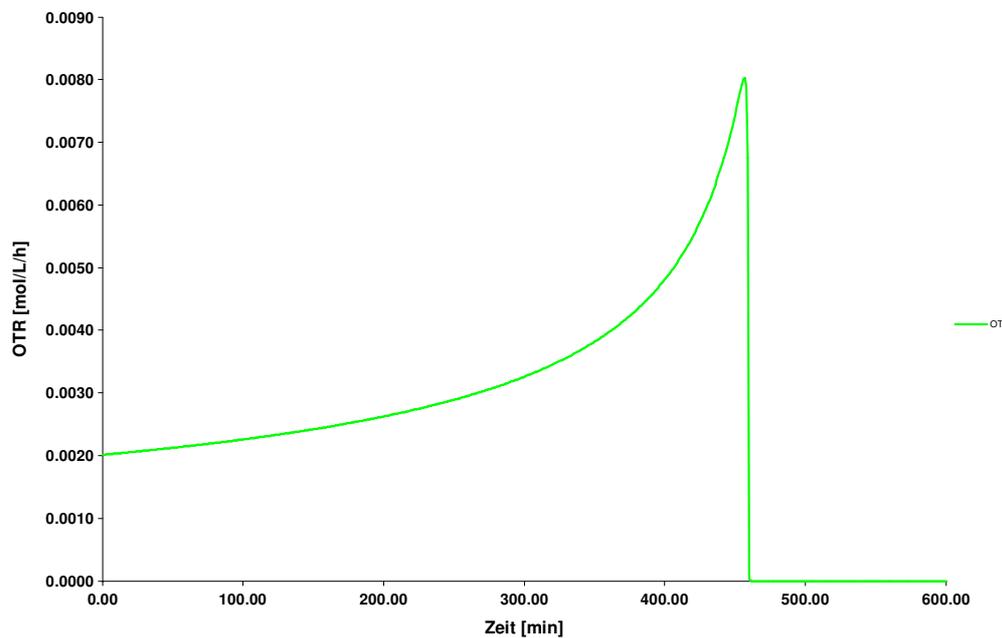


Abb. 19: modellierte Sauerstofftransferrate von der LAAO

Dieses Modell wurde erstellt, um folgende Punkte abzuklären:

- 1) Ist der Parameter OTR auch für die online Verfolgung von enzymatische Umsetzungen im 7,5L Bioreaktor geeignet?
- 2) Wie würde sich eine fed-batch-Fahrweise auswirken und welche sind die optimalen Betriebsparameter.

1. Scale-Up in den 7,5L Bioreaktor

Kriterium für die Etablierung der Messmethode (Reaktionskinetikbestimmung über den OTR) im 7,5L Maßstab ist die Auswertbarkeit des Sauerstoffpartialdrucks am Ausgang des Gefäßes. Der Ausgangssauerstoffpartialdruck muss um 0,5-1 Vol.-% vom Eingangssauerstoffpartialdruck abweichen, um eine gesicherte OTR-Bestimmung vornehmen zu können (mit handelsüblichen Abgasanalytiken).

Ausgangspunkt der Modellierung ist die aus der RAMOS-Anlage ermittelte Enzymkinetik. Abbildung 20 zeigt den Sauerstoffpartialdruck am Ausgang des Reaktorbehälters bei verschiedenen Begasungsraten. Erst bei einer Begasungsrate von 1000 mL/min (entspricht 1/6 vvm) kann mit Hilfe einer Abgasanalytik der OTR sicher bestimmt werden. Diese Simulation zeigt, dass ein Scale-Up der Messanalytik problemlos machbar ist.

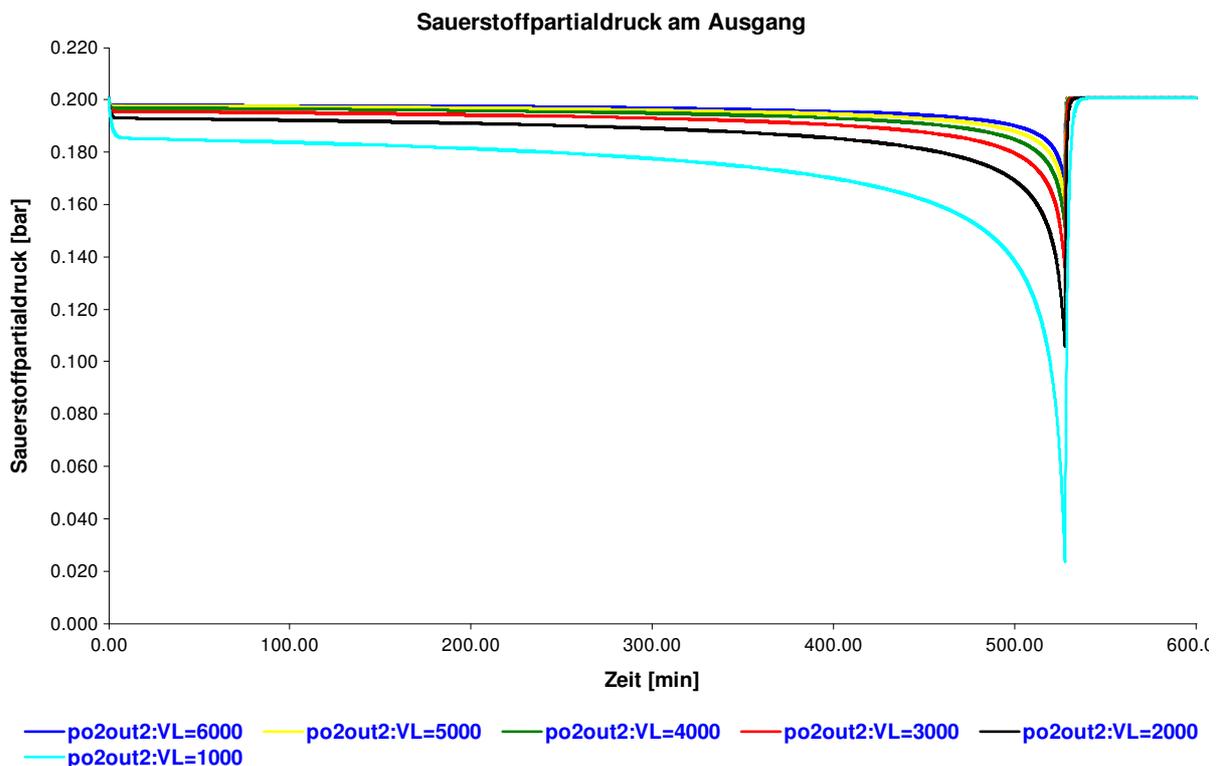


Abb. 20: 7,5L Gasvolumen, 6L Flüssigkeit, 10 fache Enzymmenge wie im Schüttelkolben, 200mM DL-Phenylalanin, Begasungsrate [mL/min] variiert von 6000mL/min bis auf 1000mL/min.

2. Fed-Batch-Fahrweise

Modelliert wurde eine Fed-batch Fahrweise im 7,5L Bioreaktor. Hintergrund dieser Simulation ist die Prüfung, ob sich die Substratinhibierung der enzymatischen Reaktion durch diese Fahrweise reduzieren lässt.

Um die Ergebnisse einfach in die Praxis übertragen zu können wurde ein konstanter nicht geregelter Feed gewählt, wie in Abbildung 21 dargestellt ist. Abbildung 22 zeigt die Auswirkungen verschiedener Zuflussraten auf die Sauerstofftransferrate (entspricht der Enzymaktivität). Bei einer Zuflussrate von 500 mL/h erhalten wir die höchste Zeitraumausbeute (Abbildung 22), da die Gesamtreaktionszeit, aufgrund der höheren Aktivität am kürzesten ist. Höhere Zuflussraten (600 und 700mL/h) führen zu einer Anreicherung des Substrates im Glasreaktor (siehe Abbildung 23) und damit zu einer nicht erwünschten Reduzierung der Enzymaktivität. Mit allen anderen Zuflussraten wird eine substratlimitierte Fahrweise erzielt, wie in Abbildung 6 zu sehen ist.

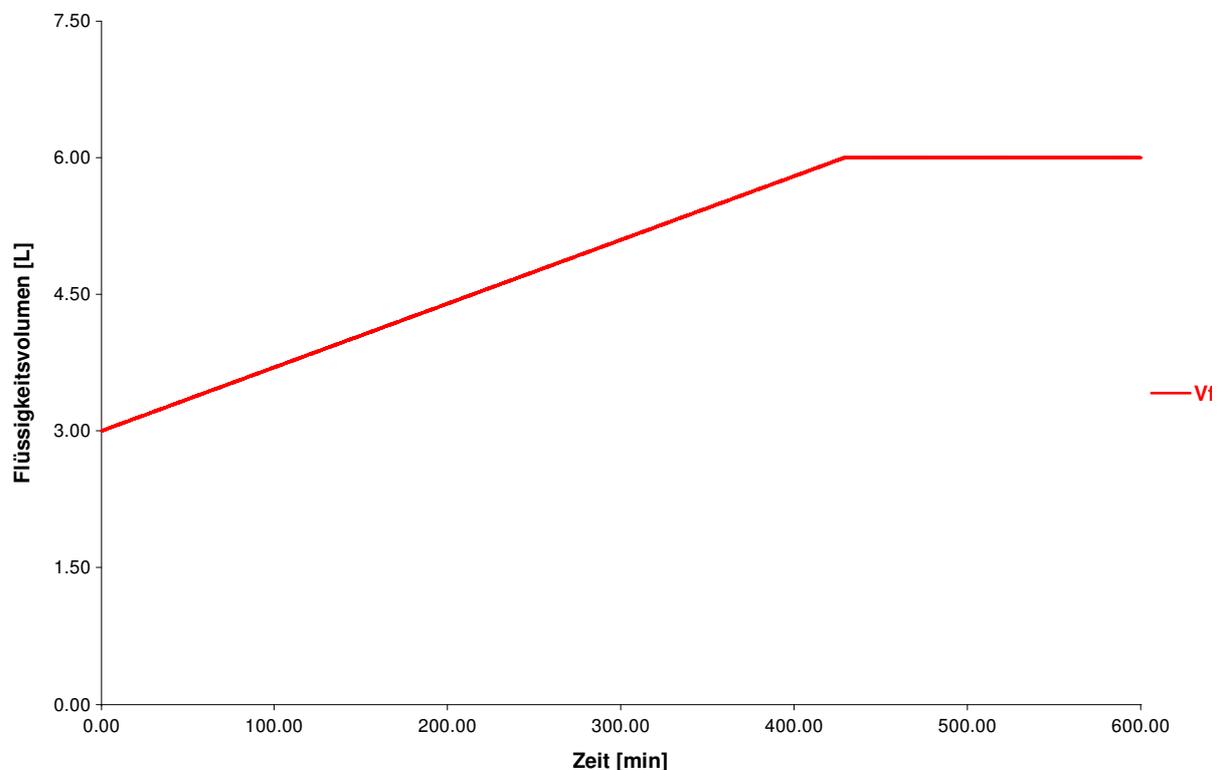


Abb. 21: Flüssigkeitsvolumen in einem 7,5L Glasreaktor, Startvolumen 3L Zufussrate 419mL/h, Feedkonzentration 500mM, 10 fache Enzymmenge als beim Schüttelkolbenexperiment (Vergleichbar mit batch-Experiment im Fermenter)

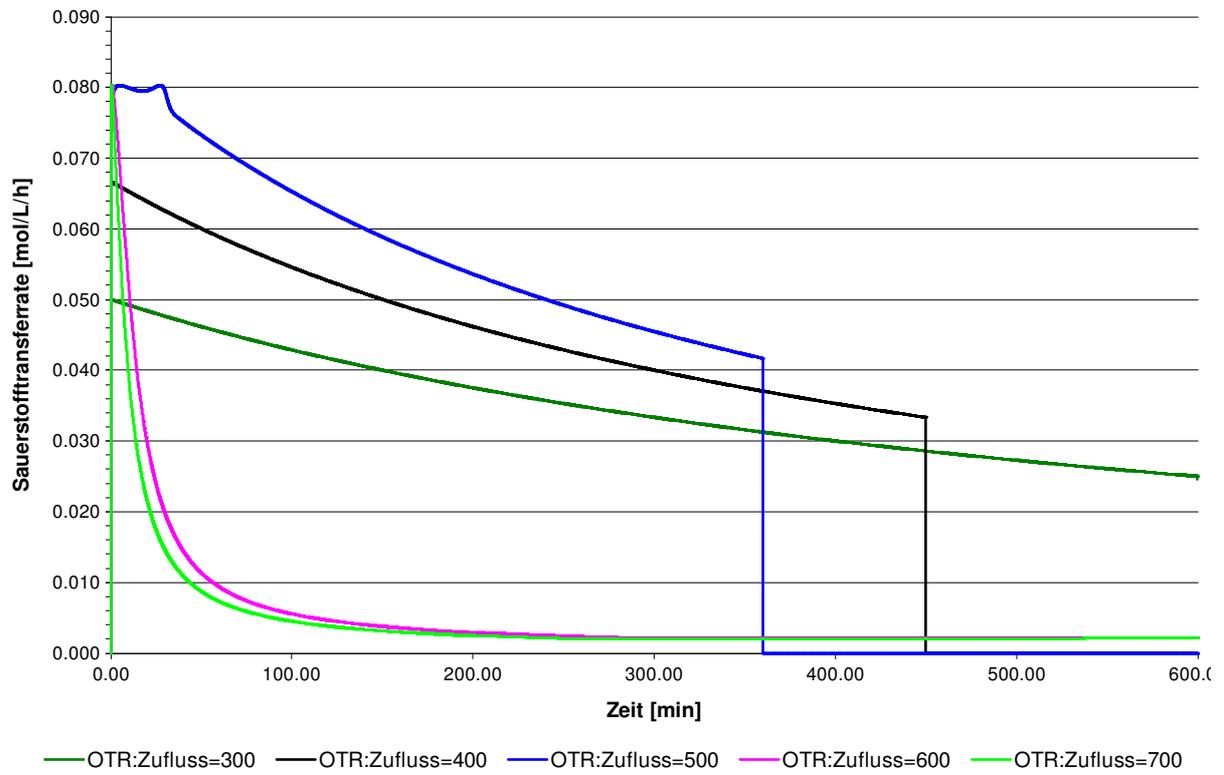


Abb. 22: Sauerstofftransferaten in einem 7,5L Glasreaktor, Startvolumen 3L Zufussrate variiert, Feedkonzentration 500mM, 10 fache Enzymmenge als beim Schüttelkolbenexperiment (Vergleichbar mit batch-Experiment im Fermenter)

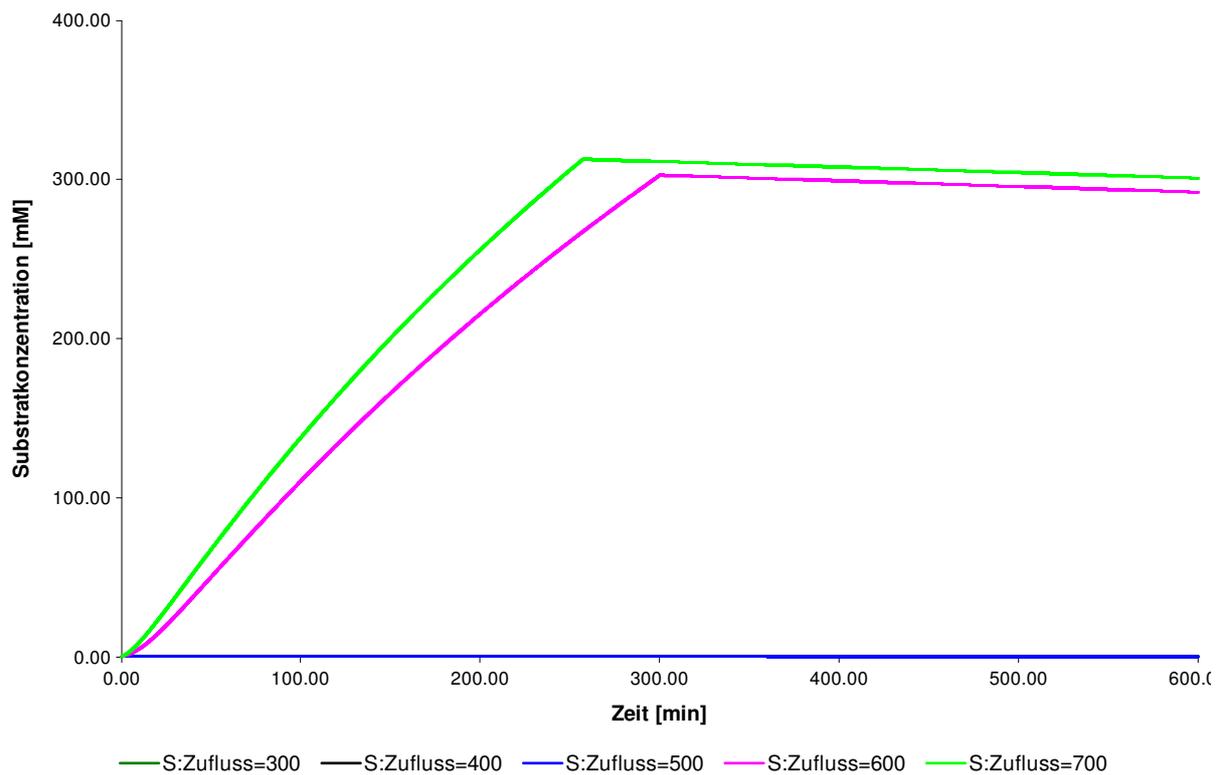


Abb. 23: Substratkonzentration in einem 7,5L Glasreaktor, Startvolumen 3L Zuflussrate variiert, Feedkonzentration 500mM, 10 fache Enzymmenge als beim Schüttelkolbenexperiment (Vergleichbar mit batch-Experiment im Fermenter)

Mit Hilfe der Simulation lässt sich jetzt der optimale Feedfluss berechnen, in dem die Substratkonzentration im Reaktionsgefäß konstant im Optimum (0,4mM) gehalten wird. Hieraus resultiert der Zufluss, der in Abbildung 24 dargestellt ist. Die Schwankungen des Feedflusses am Anfang rühren aus dem Einregelungsprozesses und können durch einen geeigneteren Startwert reduziert werden. Dass der Prozess im Optimum betrieben wird, kann an Hand des OTR-Wertes (Siehe Abbildung 25) gezeigt werden, der konstant hoch bei 0,08 mol/L/h bleibt.

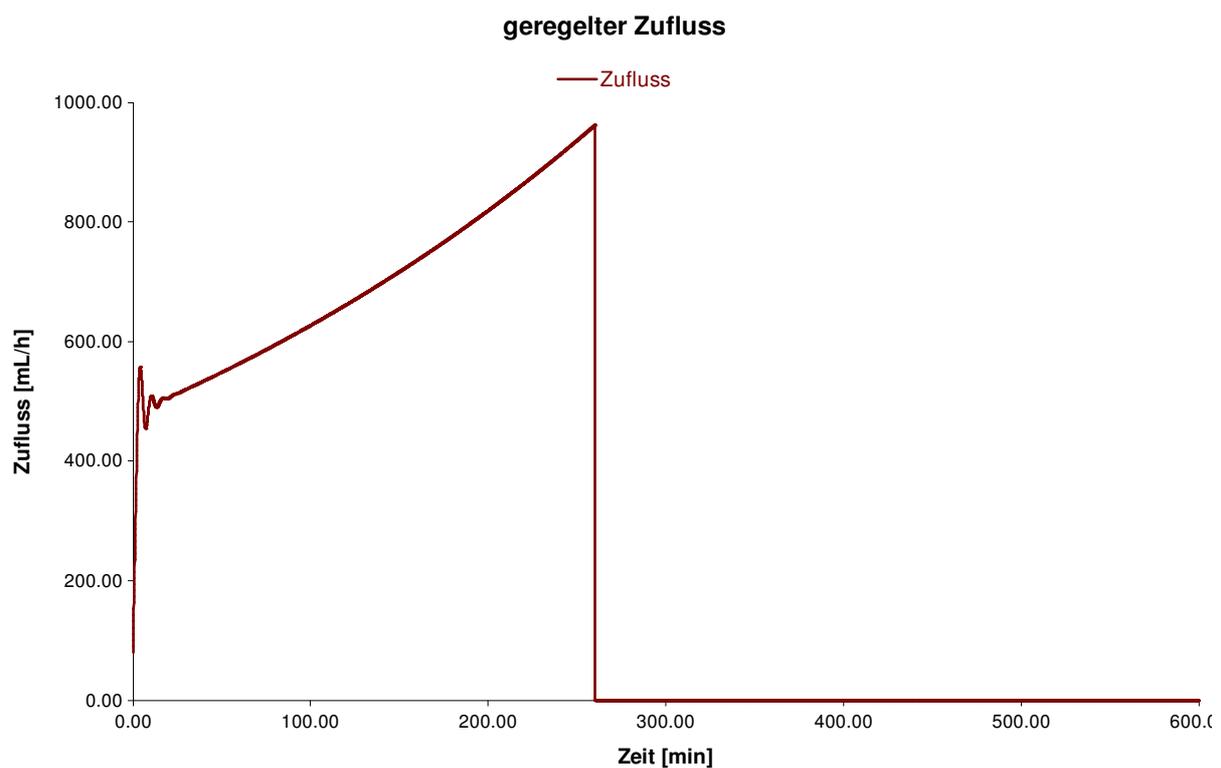


Abb. 24: Zufluss im 7,5L Glasreaktor bei einer konstant gehalten Substratkonzentration, Startvolumen 3L, Feedkonzentration 500mM, 10 fache Enzymmenge als beim Schüttelkolbenexperiment (Vergleichbar mit batch-Experiment im Fermenter)

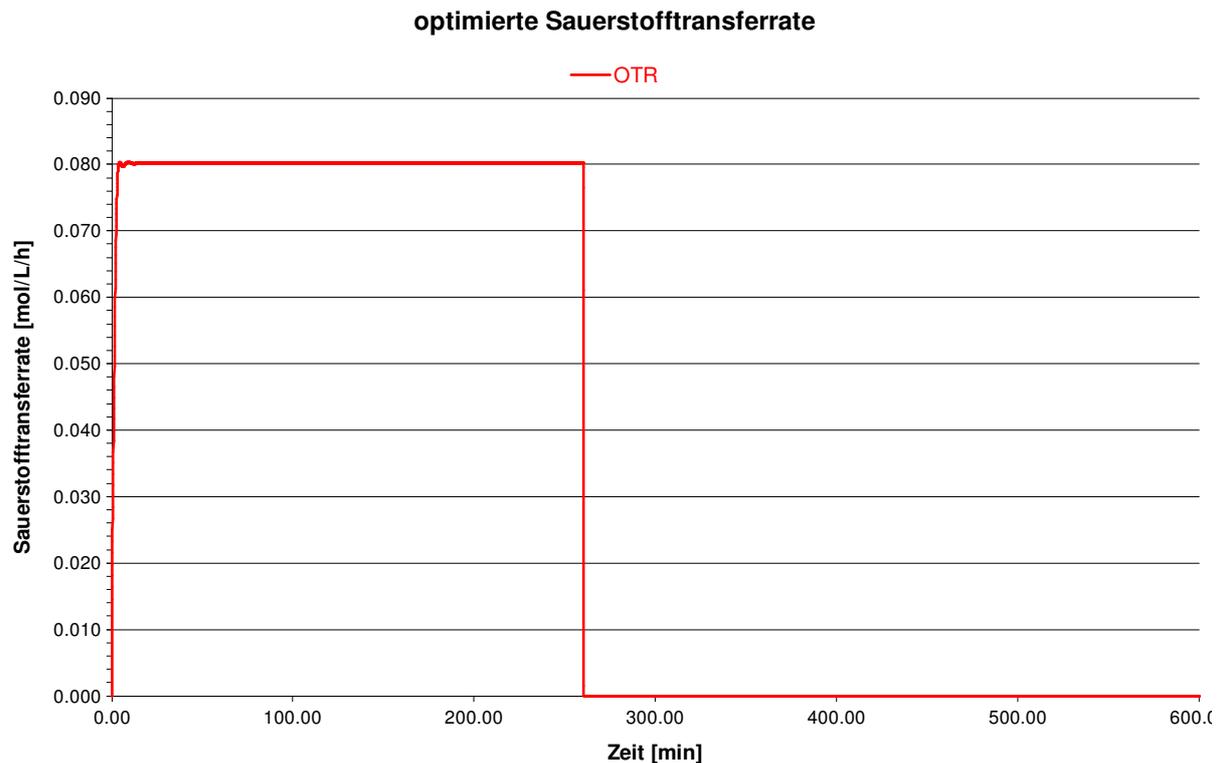


Abb. 25: OTR im 7,5L Glasreaktor bei einer konstant gehalten Substratkonzentration, Startvolumen 3L, Feedkonzentration 500mM, 10 fache Enzymmenge als beim Schüttelkolbenexperiment (Vergleichbar mit batch-Experiment im Fermenter)

FAZIT:

Die Modellierung zeigt, dass eine Übertragung der Messmethodik in den Großenmaßstab unproblematisch ist. Weiterhin zeigt die Modellierung, dass mit Hilfe einer Fedbatch-Fahrweise gegenüber der Batch-Fahrweise 50% mehr Edukt in 2/3 der Zeit umgesetzt werden kann. Eine weitere Optimierung des Zuflusses führt zu einer Steigerung der Raumzeitausbeute um ca. 30%.

4.4. Fermentation des *Rhodococcus opacus* (Wildtyp), des rekombinanten *Streptomyces lividans*- und *E. coli*-Stammes

Der Vergleich der Fermentationen von *Rhodococcus opacus* und *Streptomyces lividans* zur Produktion der RoLAAO (Tab.12) zeigt, dass sich die Zellausbeute bei der Fermentation von *S. lividans* verdoppelt hat, bei einer gleichzeitigen Reduzierung der spezifischen Aktivität. Deutlich ist zu erkennen, dass die höchste Aktivität im Schüttelkolben gemessen wurde (max. 180 mU/mg). Dieses hohe Ergebnis war durch eine Optimierung des Induktionszeitpunktes erreicht worden.

Da aus den Klonierungsarbeiten ein leistungsstarker rek. *E. coli*-Expressionsstamm *E. coli/pE3laao* zur Bildung von L-AAO entwickelt wurde, konnte dieser *E. coli*-Stamm auch fermentativ sehr hohe Enzymmengen liefern. Der Fermentationsverlauf ist in Abb. 18 dargestellt.

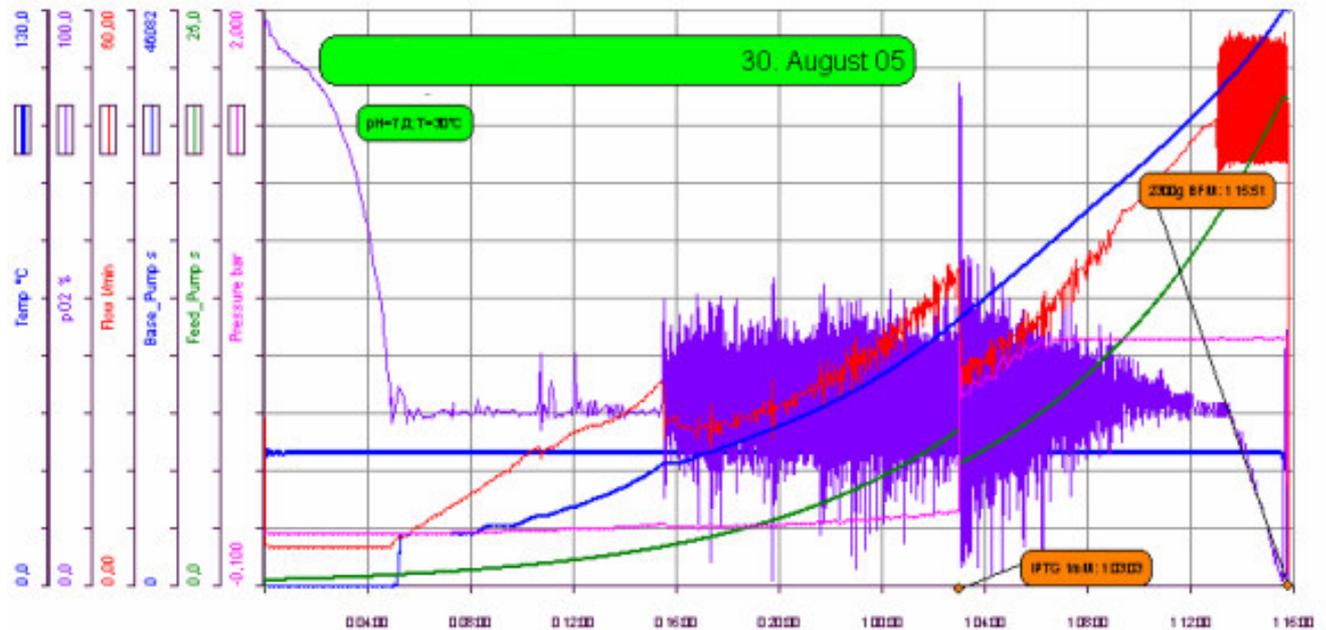


Abb. 25: Ergebnis der Fermentation von *E. coli/pE3laao* im 15 L-Maßstab.

Aus einer 15 L-Fermentation wurden insgesamt 50550 Units RoLAAO erzielt. Dabei wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von über $85 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt. Wie in Tabelle 12 zu sehen ist, liegt dieser Wert über 170-mal höher sowohl für den *Rhodococcus opacus* Wildtyp ($0,5 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) als auch für den rek. *Streptomyces lividans* ($0,5 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Schon anhand der außerordentlichen Gesamt-Units-Anzahl von 50550 und der Raum-Zeit-Ausbeute von über $85 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wird deutlich, dass der in dieser Arbeit entwickelte rekombinante *E. coli*-Expressionsstamm *E. coli/pE3laao* zur Bildung von L-AAO sehr gut geeignet ist.

Tab. 12: Vergleich der RoLAAO-Expressionsausbeuten in *Rhodococcus opacus*, *Streptomyces lividans* (p_{l_{aa}o}+) und *Escherichia coli* (pE3_{laao}) (ZFM = Zellfeuchtmasse, Akt./Vol. = volumetrische Aktivitätsausbeute, RZA = Raum-Zeit-Ausbeute).

	<i>Rhodococcus opacus</i> (Wildtyp)		<i>Streptomyces lividans</i> (p _{l_{aa}o} +))		<i>Escherichia coli</i> (pE3 _{laao})	
	Schüttel- kolben	Fermenter	Schüttel- kolben	Fermenter	Schüttel- kolben	Fermenter
Max. spez. Akt.	32	20-70	180	40	1100	400

im Rohextrakt						
[mU·mg⁻¹]						
Dauer [h]	48	24	33	35	5	39,6
ZFM [g l⁻¹]	34	15	15	30	15	153
Akt./ZFM [U·g⁻¹]	2,8	0,8	3	0,6	26	22
Akt./Vol. [U l⁻¹]	95	12	45	18	390	3370
RZA [U l⁻¹·h⁻¹]	2	0,5	1,4	0,5	78	85

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit das erste *E. coli*-Expressionssystem für eine L-AAO etabliert werden. Durch weitere Optimierung der heterologen Expression kann in Zukunft die Verfügbarkeit des Enzyms für technische Anwendungen verbessert werden.

5. Soll-/IstVergleich

SOLL-/ISTVERGLEICH

	Soll	Ist
B2	Fermentation der TvDAAO	Fermentation der TvDAAO wurde erfolgreich abgeschlossen.
B3	RAMOS: Validierung der Technologie durch Einsatz der TvDAAO	TvDAAO wurde mit der RAMOS-Analytik untersucht.
B4	Scale-up der enzymatischen Umsetzung (TvDAAO): Etablierung der neuen Messtechnik	Aufgrund der irreversiblen Schädigung der TvDAAO durch Wasserstoffperoxid konnte ein Scale-up nicht durchgeführt werden.
B5	Expressionsoptimierung der L-AAO	Expressionsoptimierung wurde erfolgreich durchgeführt und abgeschlossen. Erfolgreiche Expression auch in <i>E. coli</i> .
B6	Fermentationsoptimierung von <i>Streptomyces lividans</i> (rek. L-AAO)	Fermentationen wurden durchgeführt, die spez. Aktivitäten im Schüttelkolben konnten nicht erreicht werden. Doch mit dem neuen Expressionssystem (<i>E. coli</i>) konnte fermentativ viel höhere Aktivitätswerte erreicht werden.
B7	RAMOS: Untersuchung von enzymatischen Umsetzungen durch die L-AAO	Enzymatische Umsetzungen durch die L-AAO wurden erfolgreich durchgeführt und abgeschlossen. Eine irreversible Schädigung der L-AAO durch Wasserstoffperoxid konnte nicht beobachtet werden. .
B8	Besonderheit: Fed-batch, Optimierung der Dosierprofile	Optimales Fed-batch-Profil wurde ermittelt und führt zu einer
B9	Scale-up der enzymatischen Umsetzung (L-AAO)	Das Scale-up der Messmethode hat sich als unproblematisch gezeigt
B10	Expressionsoptimierung der	Expressionsoptimierung wurde erfolgreich durchgeführt und

	ApDAAO	abgeschlossen.
B11	Fermentationsoptimierung des rekombinanten, ApD-AAO-produzierenden Stammes	Fermentationsoptimierung wurde erfolgreich durchgeführt und abgeschlossen.
B12	RAMOS: Untersuchung der enzymatischen Umsetzung	Die RAMOS-Analysentechnik wurde erfolgreich für das Monitoring einer ApDAAO-katalysierten Reaktion angewandt.
B13	Scale-up der enzymatischen Umsetzung (ApDAAO)	Aufgrund der irreversiblen Schädigung der ApDAAO durch Wasserstoffperoxid konnte ein Scale-up nicht durchgeführt werden.
B14	Expressionsoptimierung der NOX	Expressionsoptimierung wurde erfolgreich abgeschlossen.
B15	Fermentationsoptimierung des rekombinanten, NOX-produzierenden Stammes	Fermentationen der NOX erste Erfolge
B16	RAMOS: Validierung der gekoppelten enzymatischen Umsetzung	Erfolgreich abgeschlossen, Ergebnis NOX im löslichen Zustand instabil
B17	RAMOS: Untersuchung der enzymatischen Umsetzung mit unterschiedlichen Dehydrogenasen	Umsetzungen wurden im Labormaßstab durchgeführt
B18	Scale-up der gekoppelten enzymatischen Umsetzungen	Modellierung zeigt ein Scale Up der Messmethode ist unproblematisch

6. Präsentationen und Publikationen

Die Ergebnisse dieses Projekts sind in mehreren Publikationen und Präsentationen zusammenfassend dargestellt:

Präsentationen

- GVC-Tagung, 2001 [25]
- BIOCAT-Kongress, 2004 [26]
- BIOFORUM, 2004 [27]
- Bioperspectives, 2004 [28]
- CPHI-Kongress, 2004 [29]
- Bioperspectives 2005 [30]

Publikationen

- W. Hummel, M. Kuzu, B. Geueke (2003) "An efficient and selective enzymatic oxidation system for the synthesis of enantiomerically pure *D-tert*-leucine." *Organic Letters* **5** (20): 3649-50.
- W. Hummel, M. Kuzu, B. Geueke (2004) "Oxidative resolution of racemic mixtures by the coupled use of dehydrogenases and NADH oxidase." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (*in press*).

- M. Kuzu, W. Hummel (2004) "Preparation of D-amino acids by enantioselective oxidation catalyzed by recombinant *Escherichia coli* cells expressing L-leucine dehydrogenase and NADH oxidase." ChemBioChem (*submitted*).
- M. Kuzu, K. Niefind, W. Hummel, D. Schomburg (2005) „Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a flavoprotein NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*." Acta Crystallographica Section F 61: 528-30.
- M. Kuzu, W. Hummel (2005) "Influence of the expression conditions on the formation of apo- and holoenzyme from *Lactobacillus brevis* NADH oxidase." Biochimica et Biophysica Acta (*submitted*).
- Z. Findrik, D. Vasić-Rački, M. Kuzu, W. Hummel (2005) "Application of a new D-amino acid oxidase from *Arthrobacter protophormiae*" Engineering in Life Sciences (*submitted*).
- M. Kuzu, K. Niefind, W. Hummel, D. Schomburg (2005) "Structure of a water-forming NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* refined at 2.7 Å Resolution." Biochemistry (*submitted*).

7. Literaturverzeichnis

- [1] A. Schmid, J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, Industrial biocatalysis today and tomorrow, Nature 409 (2001) 258-68.
- [2] G.W. Huisman, D. Gray, Towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries, Curr Opin Biotechnol 13 (2002) 352-8.
- [3] M.S. Pilone, L. Pollegioni, D-Amino acid oxidase as an industrial biocatalyst, Biocatalysis and biotransformation 20 (2002) 145-59.
- [4] G. Molla, C. Vegezzi, M.S. Pilone, L. Pollegioni, Overexpression in *Escherichia coli* of a recombinant chimeric *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase, Protein Expr Purif 14 (1998) 289-94.
- [5] E.H. Park, Y.M. Shin, Y.Y. Lim, T.H. Kwon, D.H. Kim, M.S. Yang, Expression of glucose oxidase by using recombinant yeast, J Biotechnol 81 (2000) 35-44.
- [6] A. Kapat, J.K. Jung, Y.H. Park, Enhancement of glucose oxidase production in batch cultivation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: optimization of oxygen transfer condition, J Appl Microbiol 90 (2001) 216-22.
- [7] T. Anderlei, J. Büchs, Verfahren und Vorrichtung zur Ermittlung und Überwachung des physiologischen Zustandes mikrobieller Kulturen. In: EP 0 905 229 A2(1998).
- [8] T. Anderlei, J. Büchs, Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks, Biochem Eng J 7 (2001) 157-62.
- [9] A. Bommarius, M. Schwarm, K. Stingl, M. Kottenhahn, K. Huthmacher, K. Drauz, Synthesis and use of enantiomerically pure *tert*-leucine, Tetrahedron 6 (1995) 2851-88.
- [10] J. Velasco, J.L. Adrio, M.A. Moreno, B. Diez, G. Soler, J.L. Barredo, Environmentally safe production of 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA) using recombinant strains of *Acremonium chrysogenum*, Nat Biotechnol 18 (2000) 857-61.
- [11] M. Kuzu, K. Niefind, W. Hummel, D. Schomburg (2005) „Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a flavoprotein NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*." Acta Crystallographica Section D (*submitted*).
- [12] Park H-J, Kreutzer R, Reiser COA, Sprinzl M (1992) Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding a H₂O₂-forming NADH oxidase from the extreme thermophilic *Thermus thermophilus* HB8 and its expression in *Escherichia coli*, Eur J Biochem 205, 875-9.

- [13] Sakamoto M and Komagata K (1996) Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria, *J Ferment Bioeng* 82, 210-6.
- [14] W. Hummel, M. Kuzu, B. Geueke (2003) "An efficient and selective enzymatic oxidation system for the synthesis of enantiomerically pure *D-tert-leucine*." *Organic Letters* 5 (20): 3649-50.
- [15] W. Hummel, M. Kuzu, B. Geueke (2004) "Oxidative resolution of racemic mixtures by the coupled use of dehydrogenases and NADH oxidase." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (*in press*).
- [16] M. Kuzu, W. Hummel (2004) "Preparation of D-amino acids by enantioselective oxidation catalyzed by recombinant *Escherichia coli* cells expressing L-leucine dehydrogenase and NADH oxidase." *ChemBioChem* (*submitted*).
- [17] M. Kuzu, W. Hummel (2005) "Influence of the expression conditions on the formation of apo- and holoenzyme from *Lactobacillus brevis* NADH oxidase." *Biochimica et Biophysica Acta* (*submitted*).
- [18] Takano E, White J, Thompson CJ and Bibb MJ (1995) Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp., *Gene* 166, 133-7.
- [19] Doumith M et al. (2000) Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*, *Mol Gen Genet* 264, 477-85.
- [20] Margolin AL and Navia MA (2001) Protein Crystals as Novel Catalytic Materials, *Angew Chem Int Ed Engl* 40, 2204-22.
- [21] St Clair N, Wang YF and Margolin AL (2000) Cofactor-Bound Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of Alcohol Dehydrogenase, *Angew Chem Int Ed Engl* 39, 380-3.
- [22] Lee TS, Turner MK and Lye GJ (2002) Mechanical stability of immobilized biocatalysts (CLECs) in dilute agitated suspensions, *Biotechnol Prog* 18, 43-50.
- [23] Lee TS, Vaghjiani JD, Lye GJ and Turner MK (2000) A systematic approach to the large-scale production of protein crystals, *Enzyme Microbial Technol* 26, 582-92.
- [24] Collins MC, Maslin C and Davies RJ (1998) Scale-Up of a Chiral Resolution Using Cross-Linked Enzyme Crystals, *Organic Process Research & Development* 2, 400-6.
- [25] Anderlei, T., Curvers, S., Knabben, I., Binder, M., Marx, A., Hummel, W., Geueke, B. Poster GVC 2003, 2.4.2003-4.4.2003, München, 2003.
- [26] Anderlei, T., Curvers, S., Knabben, I., Hummel, W., Kuzu, M., Geueke, B. Poster Bioperspectives 2004, 4.5.2004-6.05.2004, Wiesbaden, 2004.
- [27] Kuzu, M., Hummel, W., Anderlei, T., Curvers, S., Knabben, I. Poster Biocat 2004, 29.8.2004-1.9.2004, Hamburg, 2004.
- [28] Kuzu, M., Hummel, W., Anderlei, T., Curvers, S., Knabben, I. Poster Bioforum 2004, 7.11.2004, Lüttich, 2004.
- [29] Anderlei, T., Curvers, S., Knabben, I., Hummel, W., Kuzu, M., Geueke, B. Poster CPHI 2004, 7.12.2004-9.12.2004, Brüssel, 2004.
- [30] Anderlei, T., Curvers, S., Knabben, I., Hummel, W., Kuzu, M., Geueke, B. Poster Bioperspectives 200, 10.5.2005-12.05.2005, Wiesbaden, 2005.