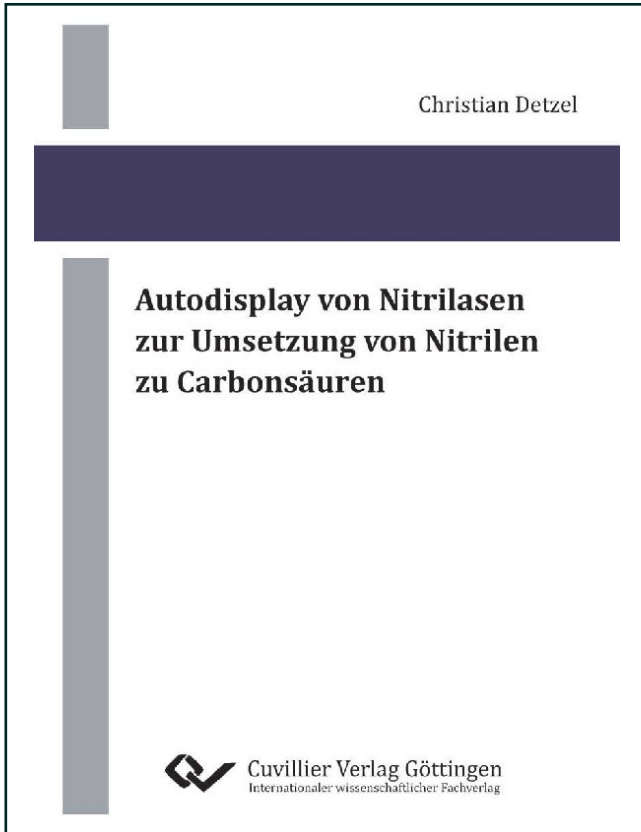




Christian Detzel (Autor)

Autodisplay von Nitrilasen zur Umsetzung von Nitrilen zu Carbonsäuren



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/497>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung.....	1
II.	Summary.....	3
III.	Einleitung.....	5
1.	Nitrilasen	6
1.1.	Entdeckung und physiologische Rolle.....	7
1.2.	Superfamilie der Nitrilasen.....	9
1.3.	Aufbau und Reaktionsmechanismus.....	9
1.4.	Anwendungen und Eigenschaften von Nitrilasen in der Biotechnologie.....	13
1.4.1.	Herbizidresistenz und Detoxifikation.....	13
1.4.2.	Enantioselektive Synthese.....	14
1.4.3.	Regioselektive Synthese.....	15
1.5.	Immobilisierung.....	16
2.	Das Autodisplay-System	17
3.	Ziele der Arbeit	20
IV.	Material und Methoden.....	21
1.	Material	21
1.1.	Geräte.....	21
1.2.	Software.....	22
1.3.	Chemikalien und Materialien.....	22
1.4.	Reagenziensätze („kits“).....	24
1.5.	Enzyme.....	25
1.6.	Oligonukleotide.....	25
1.7.	Bakterienstämme.....	26
1.8.	Plasmide.....	26
1.9.	Nährmedien.....	27
1.9.1.	LB-Medium.....	27
1.9.2.	2xYT-Medium.....	27
1.9.3.	SOC-Medium.....	27
1.9.4.	PPM-Medium.....	27
1.10.	Lösungen und Puffer.....	27
1.10.1.	Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.....	27
1.10.2.	Lösungen für die SDS-PAGE.....	28
1.10.3.	Lösungen für die Isolierung von Proteinen der äußeren Bakterienmembran.....	28
1.10.4.	Lösungen für die Plasmidisolierung nach Birnboim und Doly.....	29
1.10.5.	Lösungen für die Analytik mittels Dünnschicht-Chromatographie.....	29
1.10.6.	Lösungen für die Analytik mittels HPLC.....	29

2.	Methoden	30
2.1.	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	30
2.1.1.	Kultivierung auf Agarplatten.....	30
2.1.2.	Kultivierung im Schüttelkolben	30
2.1.3.	Kultivierung im Fermenter.....	31
2.1.4.	Stammhaltung	33
2.1.5.	Herstellung elektrokompetenter Zellen	33
2.1.6.	Transformation von elektrokompetenten Zellen	33
2.1.7.	Expression der Autotransporter Fusionsgene in <i>E. coli</i>	34
2.1.8.	Umsetzung im Mikroreaktionsgefäß	34
2.1.9.	Umsetzung im Fermenter.....	35
2.2.	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	35
2.2.1.	Plasmidisolierung.....	35
2.2.2.	Polymerasekettenreaktion	35
2.2.3.	Enzymatische Spaltung von DNA-Fragmenten	36
2.2.4.	Agarosegelelektrophorese.....	36
2.2.5.	Färbung von Agarose-Gelen	37
2.2.6.	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel	37
2.2.7.	Ligation	37
2.2.8.	DNA Sequenzanalyse	37
2.3.	Arbeiten mit Proteinen	38
2.3.1.	Außenmembranproteinpräparation.....	38
2.3.2.	Proteasesensitivitätstest	38
2.3.3.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.4.	Analytik.....	40
2.4.1.	Achirale HPLC-Analytik	40
2.4.2.	Mandelsäureextraktion und Kristallisation	42
2.4.3.	Chirale DC-Analytik.....	42
2.4.4.	Chirale HPLC-Analytik	43
2.4.5.	Kolorimetrische Bestimmung von Ammoniak.....	44
V.	Experimente und Ergebnisse.....	45
1.	Autodisplay einer Nitrilase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in <i>E. coli</i>	45
1.1.	Konstruktion eines Plasmids zum Autodisplay	45
1.2.	Expression und Oberflächenständigkeit der Nitrilase	47
1.3.	Enzymaktivität der oberflächenexprimierten Nitrilase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
1.3.1.	HPLC-Analyse	50
1.3.2.	Spektroskopische Methoden	51
2.	Autodisplay einer Nitrilase aus <i>Klebsiella pneumoniae</i> in <i>E. coli</i>	55
2.1.	Konstruktion eines Plasmids zum Autodisplay	55
2.2.	Expression und Oberflächenständigkeit der Nitrilase	58
2.3.	Enzymaktivität der oberflächenexprimierten Nitrilase aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>	60
2.4.	Biochemische Charakterisierung des Ganzzell-Biokatalysators	68
2.4.1.	pH-Optimum	68
2.4.2.	Temperaturoptimum	69

3.	Klonierung und Oberflächenexpression einer Nitrilase aus <i>Alcaligenes faecalis</i> zum Autodisplay in <i>E. coli</i>	70
3.1.	Klonierung des Gens für eine Nitrilase aus <i>Alcaligenes faecalis</i>	70
3.2.	Expression von NitAf-AT unter der Kontrolle eines IPTG induzierbaren Promotors.....	72
3.3.	Expression von NitAf-AT unter der Kontrolle eines Rhamnose induzierbaren Promotors in <i>E. coli</i> KRX	73
3.4.	Oberflächenständigkeit der Nitrilase.....	74
3.5.	Enzymaktivität der oberflächenexprimierten Nitrilase aus <i>Alcaligenes faecalis</i>	76
3.6.	Vergleich der Mandelsäureproduktion in <i>E. coli</i> BL21(DE3), JK321(DE3), KRX und UT5600(DE3)	78
3.7.	Nachweis der Enantiomerenreinheit der produzierten Mandelsäure mittels chiraler Dünnschicht-Chromatographie.....	79
3.8.	Nachweis der Enantiomerenreinheit der produzierten R-Mandelsäure mittels chiraler HPLC.....	80
3.9.	Einfluss der Umsetzungstemperatur auf die Enantiomerenreinheit der R-Mandelsäure	81
3.10.	Umsetzung von Phenylacetonitril	83
3.11.	Umsetzung von Prunasin	84
3.12.	Optimierung der Kulturbedingungen	88
3.12.1.	Bestimmung der optimalen Substratkonzentration	88
3.12.2.	Bestimmung der optimalen Induktionszeit von IPTG	89
3.12.3.	Einfluss des Induktionszeitpunktes auf die Mandelsäureproduktion.....	89
3.13.	Biochemische Charakterisierung des Ganzzell-Biokatalysators.....	91
3.13.1.	pH-Optimum	91
3.13.2.	Temperaturoptimum.....	91
3.13.3.	Einfluss der Lagerung auf die Mandelsäureproduktion	92
3.13.4.	Bestimmung von K_m und v_{max}	94
3.13.5.	Zyklische Wiederverwendbarkeit.....	95
4.	Untersuchungen zur Produktion von R-Mandelsäure im Fermenter durch NitAf-AT tragende Zellen	97
4.1.	Produktion von R-Mandelsäure im Milligramm-Maßstab	97
4.2.	Vorversuche für die Kultivierung im Fermenter	98
4.3.	Kultivierung im Fermenter.....	100
4.4.	Produktion von R-Mandelsäure im Fermenter	110
VI.	Diskussion.....	113
1.	Enzymaktivität von Nitrilasen im Autodisplay-System	113
2.	Einfluss der Oberflächenpräsentation auf die Substratspezifität	116
3.	Biochemische Charakterisierung von NitAf-AT und NitKp-AT	118
3.1.	Einfluss des pH auf die Aktivität der oberflächenpräsentierten Nitrilasen.....	118
3.2.	Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Aktivität der oberflächenpräsentierten Nitrilasen.....	119
3.3.	Einfluss der Oberflächenpräsentation auf den K_m -Wert	119
3.4.	Lagerstabilität NitAf-AT tragender Zellen.....	120
3.5.	Wiederverwendbarkeit von NitAf-AT tragenden Zellen und Vergleich mit anderen Immobilisierungstechniken.....	121

4.	Kultivierung NitAf-AT tragender Zellen im Fermenter	123
4.1.	Biomassewachstum	123
4.2.	Einflussfaktoren auf die Mandelsäureproduktion.....	124
4.2.1.	Glucose	124
4.2.2.	Einfluss der Induktion durch IPTG auf die Mandelsäureproduktion	126
4.2.3.	Mercaptoethanol	127
5.	Biokatalytische Produktion von Mandelsäure im Fermenter	127
5.1.	Vergleich mit anderen Nitrilase Ganzzell-Biokatalysatoren.....	128
6.	Fazit	129
VII.	Literatur	131
VIII.	Anhang.....	141
1.	Abkürzungsverzeichnis	141
2.	Sequenzen	142
3.	Plasmidkarten	149
4.	Veröffentlichungen	150