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 Agarosegelektrophorese 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 *E. coli* ... 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 *E. coli* ... 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 *Saccharomyces cerevisiae* in *E. coli* 45
1.1. Konstruktion eines Plasmids zum Autodisplay ... 45
1.2. Expression und Oberflächenständigkeit der Nitrilase ... 47
1.3. Enzymaktivität der oberflächenexprimierten Nitrilase aus *Saccharomyces cerevisiae* ... 49
1.3.1. HPLC-Analyse ... 50
1.3.2. Spektroskopische Methoden ... 51

2. Autodisplay einer Nitrilase aus *Klebsiella pneumoniae* in *E. coli* 55
2.1. Konstruktion eines Plasmids zum Autodisplay ... 55
2.2. Expression und Oberflächenständigkeit der Nitrilase ... 58
2.3. Enzymaktivität der oberflächenexprimierten Nitrilase aus *Klebsiella pneumoniae* ... 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 *Alcaligenes faecalis* zum Autodisplay in *E. coli* 70

3.1. Klonierung des Gens für eine Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* 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 *E. coli* KRX 73
3.4. Oberflächenständigkeit der Nitrilase....74
3.5. Enzymaktivität der oberflächenexprimierten Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* 76
3.6. Vergleich der Mandelsäureproduktion in *E. coli* 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