

Optimierung der Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* für die enantio-selektive Synthese von (R)-Cyanhydrinen

- Entwicklung und Etablierung geeigneter Reaktionsparameter und molekulare Stabilisierung durch rationales Enzymdesign –

Daniel Okrob

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG)
Biotechnologie (IBG-1)

Optimierung der Hydroxynitril-Lyase aus Arabidopsis thaliana für die enantio-selektive Synthese von (R)-Cyanhydrinen

**– Entwicklung und Etablierung geeigneter
Reaktionsparameter und molekulare Stabilisierung
durch rationales Enzymdesign –**

Daniel Okrob

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 53

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-782-5

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Herausgeber
und Vertrieb:
Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2012

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 53

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2012)

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-782-5

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit dieser Arbeit konnte durch zwei verschiedene Strategien (Reaktion- und Proteindesign) die Einsatzfähigkeit der Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*) zur enantioselektiven Synthese von industriell relevanten Cyanhydrinen gezeigt werden.

Die biokatalytische Synthese von Cyanhydrinen wird von einer nicht-selektiven racemischen Produktbildung begleitet, die die Enantioselektivität der Cyanhydrinsynthese empfindlich stören kann. Diese Nebenreaktion wird maßgeblich durch den pH-Wert, die Temperatur und den Wassergehalt des Reaktionsmediums beeinflusst. Die Unterdrückung der racemischen Produktbildung wird in technischen Prozessen in wässrigen oder organisch-wässrigen Reaktionssystemen durch ein Absenken des pH-Werts unter pH 5 und Reaktionstemperatur ≤ 10 °C erreicht. Unterhalb von pH 5 ist die *AtHNL* jedoch sehr instabil.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zwei Strategien zu Etablierung der *AtHNL* für die Synthese enantiomerenreiner Cyanhydrine verfolgt.

Zum einen wurden Reaktionsbedingungen identifiziert, bei denen die *AtHNL* stabil vorliegt und die racemische Produktbildung unterdrückt wird. Hierbei konnte durch den Einsatz des einphasigen Puffer-gesättigten organischen Lösungsmittels Methyl-*tert*.butylether eine nahezu vollständige Unterdrückung der racemischen Produktbildung bei gleichzeitig guter Enzymaktivität zur Synthese von mehreren industriell relevanten Cyanhydrinen identifiziert werden.

Effiziente Cyanhydrinsynthesen konnten mittels unterschiedlicher Immobilisierungs-methoden (z.B. adsorptive Trägerbindung, Einschluss in einer Gelmatrix, Quervernetzung von präzipitierter *AtHNL*) und Ganzzellbiotransformation erreicht werden. Als besonders geeignet erwiesen sich die Ganzzellbiokatalyse mit rekombinanten *E. coli*-Zellen sowie die adsorptive Bindung gereinigter *AtHNL* an Celite-Partikel. Bezuglich der Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril zeigten beide Präparationen eine vergleichbare katalytische Effizienz, Prozess- und Lagerstabilität, sodass durch mehrfache Recyclierung (6-8 Reaktionszyklen) eine maximale Produktausbeute von ~1,6 g (*R*)-Mandelsäurenitril pro g eingesetzter Zellfeuchtmasse erreicht werden konnte.

Die zweite Strategie verfolgte die Entwicklung einer im sauren pH-Bereich stabileren *AtHNL* Variante, die für den Einsatz im technisch etablierten wässrig-organischen Zweiphasensystem geeignet ist. Basierend auf der hohen strukturellen Ähnlichkeit zur stabileren HNL aus *Manihot esculenta* (MeHNL) wurden gezielt Aminosäuren an der Enzymoberfläche der *AtHNL* ausgetauscht. So konnte eine signifikante Aktivitäts- und Stabilitätssteigerung, sowie eine Verschiebung des pH-Spektrums ins saure Milieu erreicht werden. Im Vergleich zum Wildtyp-Enzym zeigt die Variante im pH-Bereich von 4,5 – 6,5 eine bis zu 1,7-fach erhöhte Aktivität und bei pH 5 eine bis zu 14-fach gesteigerte Stabilität von 2,23 h. Besonders wichtig für die Anwendung ist die gute Aktivität der Variante bei pH 4,5 (24 U/mg Spaltungsaktivität), verbunden mit einer Halbwertszeit von 0,22 h, wohingegen das Wildtyp-Enzym unter diesen Bedingungen inaktiv ist. Durch die enantioselektive Synthese verschiedener Cyanhydrine (ee: 92 - 99 %) im wässrig-organischen Zweiphasensystem bei pH 4,5 und 0 °C konnte das Potential der Variante demonstriert werden.

ABSTRACT

In this work the potential of the hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* (*At*HNL) for the enantioselective synthesis of industrially important cyanohydrins was demonstrated by two different principles: reaction- and protein engineering.

The enantiomeric excess of this enzymatic reaction is strongly compromised by a non-selective side-reaction resulting in racemic cyanohydrins and thus lowering the enantiomeric excess of the biotransformation. This non-selective product formation is influenced by pH, temperature and the water content of the reaction medium. For industrial applications aqueous or aqueous-organic reaction systems are used where the racemic product formation is suppressed by lowering the pH below pH 5 and running the process at ≤ 10 °C. However, both approaches are not feasible with *At*HNL, since the enzyme is rapidly inactivated below pH 5.

In order to enable the use of *At*HNL for the enantioselective synthesis of industrial important cyanohydrins two strategies were developed in this work.

The first strategy concerned the suppression of the racemic product formation by reaction engineering. Thereby, a micro-aqueous reaction medium (buffer-saturated mono-phasic methyl *tert.* butyl ether) was used to suppress the undesired side reaction, which resulted in a good enzymatic activity and high enantioselectivities for several industrially important cyanohydrins.

Efficient cyanohydrin syntheses were reached in the established reaction system by application of whole cells and the use of immobilized enzyme (e.g., enzyme adsorption at celite particles, encapsulation in solgel, cross-linking of enzyme aggregates), respectively. Best results were obtained using whole recombinant *E. coli* cells as well as celite-adsorbed isolated *At*HNL. For the synthesis of (*R*)-mandelonitrile both preparations showed comparable catalytic efficiencies, process- and storage stabilities, resulting in a maximal productivity of ~ 1.6 g (*R*)-mandelonitrile per g wet cell mass (after 6-8 recycling steps).

The second strategy was the development of a stabilized *At*HNL variant which is stable under acidic conditions and thus applicable in industrially established aqueous-organic two-phase reaction systems. Based on the highly similar HNL from *Manihot esculenta* (*Me*HNL), which is stable under these conditions, the protein

surface of *AtHNL* was altered by eleven amino acid exchanges. Thereby, a significantly enhanced activity and stability, as well as a shift of the pH-spectrum to the acidic range were achieved. Compared to the wild type enzyme the variant showed an up to 1.7-fold enhanced activity at pH 4.5 – 6.5 connected with an up to 14-fold enhanced stability at pH 5. Particularly important for the application is its good activity at pH 4.5 (24 U/mg cleavage activity) with a half-life of 0.22 h, while the wild type enzyme is inactive under such conditions.

The potential of the variant was demonstrated by the enantioselective syntheses of different aromatic and heteroaromatic cyanohydrins (ee: 92 - 99 %) in an aqueous-organic reaction system at pH 4.5 and 0 °C.

Publikationen in Fachjournals

D. Okrob, M. Paravidino, R. V. A. Orru, W. Wiechert, U. Hanefeld, M. Pohl (2011). **Hydroxynitrile Lyase from *Arabidopsis thaliana*: Overcoming stability problems in enantiopure cyanohydrin synthesis.** *Adv. Synth. Catal.* 353, 2399 - 2408

K. E. Scholz, D. Okrob, B. Kopka, A. Grünberger, D. Kohlheyer, M. Pohl, K.-E. Jaeger, U. Krauss (2012). **Synthesis of chiral cyanohydrins with recombinant *E. coli* cells in a micro-aqueous reaction system.** *Februar 2012 eingereicht bei Appl. Environ. Microbiol.*

D. Okrob, J. Metzner, W. Wiechert, K. Gruber, M. Pohl (2012). **Tailoring a stabilized variant of hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana*.** *ChemBioChem*, Februar 2012, DOI: 10.1002/cbic.201100619

Poster Präsentationen

D. Okrob, J.-K. Guterl, J. N. Andexer, J. von Langermann, K. Gruber, M. Pohl (2009). **Comparison of hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* and *Manihot esculenta*.** *9th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, Bern (Schweiz)

D. Okrob, M. Paravidino, W. Wiechert, U. Hanefeld, M. Pohl (2010). **First immobilization of the hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana*.** *5th International Congress of Biocatalysis Biocat2010*, Hamburg-Harburg (Deutschland)

D. Okrob, M. Paravidino, W. Wiechert, U. Hanefeld, M. Pohl (2010). **First immobilization of the hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana*.** *28. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen*, Aachen (Deutschland)

D. Okrob, J. Metzner, W. Wiechert, K. Gruber, M. Pohl (2011). **Stabilization of the hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* by rational protein engineering.** *10th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, Giardini Naxos, Sizilien (Italien)

Kathrin Klein, Daniel Okrob, Martina Pohl, Karl-Erich Jäger, Ulrich Krauss (2011). **Fluorescence reporters for analysis of whole cell biocatalysts in non-conventional media.** *10th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, Giardini Naxos, Sizilien (Italien)

Auf diesem Weg möchte ich mich bei allen, die mir im Verlauf meiner Doktorarbeit geholfen haben bedanken. Bei einigen möchte ich mich an dieser Stelle besonders bedanken:

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Martina Pohl für die sehr interessante Themenstellung und gegebene Freiheit in Form internationaler Kooperationen bei der Ausgestaltung dieser Arbeit. Dabei möchte ich mich insbesondere für ihre freundschaftliche Betreuung sowie stets ausgezeichnete und kompetente Hilfestellung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats und die Möglichkeit meine Promotionsarbeit im Institut für Molekulare Enzymtechnologie beginnen zu können.

Herrn Prof. Dr. Ulf Hanefeld und Frau Dr. Monica Paravidino aus dem Department of Biotechnology der TU Delft danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut sowie Hilfestellung bei der Planung und Durchführung der Enzymimmobilisierungs-Studien.

Bei Herrn Dr. Ulrich Krauß und Frau Kathrin Scholz aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie möchte ich mich besonders für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bedanken.

Bei Herrn Dr. Karl Gruber und Herrn Dr. Georg Steinkellner aus dem Institut für Molekulare Biowissenschaften der Universität Graz bedanke ich mich für freundliche Unterstützung sowie die Hilfestellung bei der Planung und Entwicklung von Enzym-Varianten.

Im Verlauf meiner Promotionsarbeit wechselte die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Martina Pohl an das Institut für Bio- und Geowissenschaften (ehemals Institut für Biotechnologie 2), in dem ich meine Arbeit fertig stellen konnte. Ich danke Prof. Dr. Wolfgang Wiechert für sein Interesse an den Promotionsprojekten, sein Engagement bei der Wiedereinführung des jährlichen Doktorandenausflugs und für die Schaffung einer kommunikativen und produktiven Arbeitsatmosphäre am Institut.

Das Graduiertenkolleg BioNoCo (GRK 1166) bot mir während meiner Promotionsarbeit Möglichkeiten der interdisziplinären Weiterbildung und Teilnahme an internationalen Fachkongressen. Ich möchte allen Beteiligten herzlich für ihr Engagement und die freundlichen und konstruktiven Hilfestellungen danken.

Für die freundliche Atmosphäre und gute Integration geht mein Dank an alle Mitglieder der Biokatalyse und Biosensoren Arbeitsgruppe. Hier möchte ich insbesondere bei Julia Metzner für ihre ausgezeichnete Motivation und ihr großes Interesse im Rahmen ihrer Bachelorarbeit danken. Mein persönlicher Dank geht an Justyna Kulig, Tina Gerhards, Carmen Kocot, Kerstin Würges, Melanie Schwarz, Robert Westphal, Torsten Sehl, Daniel Jussen und Alvaro Gomez Baraibar für die schöne und zugleich unterhaltsame Zeit, ihre Hilfestellung und Freundschaft. Mein besonderer persönlicher

Dank geht an Roland Moussa für die überaus unterhaltsame Zeit in der Fahrgemeinschaft und für seine fachliche als auch freundschaftliche Unterstützung.

Nicht zuletzt bedanke ich sehr herzlich bei meiner und der Familie meiner Freundin Melanie. Mein besonderer Dank gilt dabei Melanie und ihren Eltern, die mich vollständig in ihre Familie integriert haben. Selbstverständlich möchte ebenfalls ich meinem Vater besonders danken, da er mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat.

Zum Schluss möchte ich meinen langjährigen Freunden Christian Michael und Thorsten Wenzel danken, da sie mir jederzeit ein offenes Ohr boten und den einen oder anderen Ratschlag gaben.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Wissenschaftliche Publikationen & Poster	V
Danksagung	VI
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XIV
Abkürzungen	XV
1. Einleitung	1
1.1. Die Entdeckung und Anwendung von Biokatalysatoren	1
1.2. Die Entdeckung der Hydroxynitril-Lyasen.....	3
1.2.1. HNLs katalysieren die Cyanogenese und Hydrocyanierung	4
1.2.2. Die Cyanogenese der höheren Pflanzen.....	4
1.2.3. Pflanzlicher Metabolismus cyanogener Glycoside	5
1.2.4. Die konvergente Evolution der HNLs	9
1.2.4.1. HNLs mit dem Faltungsmotiv von Zink-abhängigen Dehydrogenasen.....	10
1.2.4.2. HNLs mit dem Faltungsmotiv von Flavin-abhängigen Oxidoreduktasen	10
1.2.4.3. HNLs mit Serin-Carboxypeptidase-Faltungsmotiv	11
1.2.4.4. HNLs mit Acetylcholin-Esterase Faltungsmotiv.....	12
1.2.4.4.1. Die S-selektive HNL aus <i>Manihot esculenta</i>	13
1.2.4.4.2. Die R-selektive HNL aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
1.2.4.5. HNLs einer neuen Superfamilie? – Cupine oder Cupin-ähnliche Proteine	20
1.3. HNLs als Biokatalysatoren zur enantioselektiven Synthese von Cyanhydrinen.....	20
1.3.1. Cyanhydrine als chirale Bausteine	21

1.3.2. Reaktionsbedingungen der biokatalytischen Synthese enantiomerenreiner Cyanhydrine	22
1.3.3. Grundvoraussetzungen von HNLs für die enantio-selektive Synthese von Cyanhydrinen im technischen Maßstab.....	24
1.4. Optimierung von HNLs für den technischen Einsatz	25
1.4.1. Stabilisierung mittels Immobilisierung	25
1.4.1.1. Adsorptive Immobilisierung	26
1.4.1.2. Kovalente Immobilisierung	27
1.4.1.3. Immobilisierung durch Einschluss	29
1.4.2. Ganzzellbiokatalyse.....	30
1.4.3. Enzymoptimierung durch Proteindesign.....	32
1.4.3.1. Optimierung der <i>PaHNL</i> für den industriellen Einsatz.....	32
1.4.3.2. Optimierung der <i>HbHNL</i>	34
1.4.3.3. Optimierung der <i>MeHNL</i>	34
2. Motivation und Zielsetzung	36
3. Publikationen.....	38
3.1. Publikation 1 Etablierung eines geeigneten Reaktionssystems zur enantioselektiven Synthese von Cyanhydrinen mittels isolierter und immobilisierter <i>AtHNL</i>	38
3.2. Publikation 2 Ganzzellbiokatalyse mittels rekombinanter <i>Escherichia coli</i> Zellen zur enantioselektiven Synthese von Cyanhydrinen	49
3.3. Publikation 3 Stabilisierung der <i>AtHNL</i> durch den gezielten Austausch von Aminosäuren der Enzymoberfläche	66
4. Diskussion	73
4.1. Die <i>AtHNL</i> als potentieller technischer Biokatalysator.....	73
4.2. Etablierung geeigneter Reaktionsparameter für die <i>AtHNL</i>	76
4.3. Synthese von industriell relevanten Cyanhydrinen mittels immobilisierter <i>AtHNL</i>	81
4.3.1. Die Reinigung von HNLs und der Einsatz ganzer Zellen	81
4.3.1.1. Vergleich der <i>AtHNL</i> -Präparationsmethoden	82

4.3.2. Synthese von (<i>R</i>)-Cyanhydrinen mittels immobilisierter <i>AtHNL</i> und durch Ganzzellbiokatalyse.....	84
4.3.2.1. Trägerbeladung und Etablierung der immobilisierten <i>AtHNL</i>	85
4.3.2.1.1. Präparation von Celite- <i>AtHNL</i>	73
4.3.2.1.2. Präparation von Solgel- <i>AtHNL</i>	86
4.3.2.1.3. Etablierung eines Herstellungsprotokolls für <i>AtHNL</i> -CLEAs	86
4.3.3. Gegenüberstellung der Enzymaktivität und Selektivität verschiedener <i>AtHNL</i> -Präparationen.....	88
4.3.3.1. Vergleichende Cyanhydrinsynthesen.....	89
4.3.3.1.1. Solgel- <i>AtHNL</i> zeigt die höchste Enzymaktivität	91
4.3.3.1.2. Celite- <i>AtHNL</i> zeigt eine leicht reduzierte Enzymaktivität	91
4.3.3.1.3. <i>AtHNL</i> -CLEAs verlieren viel Enzymaktivität und sind schlecht präparierbar	92
4.3.3.1.4. Bei der (<i>R</i>)-2-Hydroxyheptannitirl-Synthese ist der Einfluss der Enzympräparation besonders groß.....	92
4.3.4. Der Einfluss des Wassergehalts auf die Synthese von Cyanhydrinen...93	93
4.3.4.1. Einfluss des Wassergehalts auf den Enantiomeren-überschuss	93
4.3.4.2. Einfluss des Wassergehalts auf die Aktivität der Celite- <i>AtHNL</i>94	94
4.3.5. Ganzzellbiotransformationen zur Synthese von Cyanhydrinen.....95	95
4.3.6. Vergleich der Produktausbeuten bei der Synthese von (<i>R</i>)-Mandelsäurenitril	98
4.3.6.1. Recyclierbarkeit und Stabilität der immobilisierten <i>AtHNL</i> und des Ganzzellansatzes	98
4.3.6.2. Produktivitätsvergleich der enzymatischen (<i>R</i>)-Mandelsäurenitril- Synthese.....	103
4.3.6.2.1. (<i>R</i>)-Mandelsäurenitrilsynthese mit präzipitierter <i>AtHNL</i>	104
4.3.6.2.2. (<i>R</i>)-Mandelsäurenitrilsynthese mit <i>AtHNL</i> -CLEAs	105
4.3.6.2.3. (<i>R</i>)-Mandelsäurenitrilsynthese mit Solgel- <i>AtHNL</i>	105
4.3.6.2.4. (<i>R</i>)-Mandelsäurenitrilsynthese mit Celite- <i>AtHNL</i>	106
4.3.6.2.5. (<i>R</i>)-Mandelsäurenitrilsynthese mittels Ganzzellbio-katalyse.....	106
4.3.7. Vergleich der Produktivität der <i>AtHNL</i> -Präparationen zur etablierten <i>PaHNL</i>	107
4.4. Stabilisierung der <i>AtHNL</i> durch rationales Enzymdesign	108
4.4.1. Sequenzieller und struktureller Vergleich von <i>AtHNL</i> und <i>MeHNL</i>	108

4.4.2. Modellierung einer tetrameren <i>AtHNL</i> und Optimierung der Dimer-Dimer-Interaktion.....	110
4.4.3. Vergleichende Charakterisierung von Wildtyp- <i>AtHNL</i> und der Variante mit modifizierter Enzymoberfläche	112
4.4.3.1. Surfmod- <i>AtHNL</i> ist aktiver und zeigt breiteres pH-Spektrum	112
4.4.3.2. Surfmod- <i>AtHNL</i> ist thermostabiler.....	114
4.4.3.3. Surfmod- <i>AtHNL</i> ist ein Dimer mit niedrigerem iso-elektrischen Punkt	116
4.4.4. Surfmod- <i>AtHNL</i> katalysierte enantioselektive Synthese von Cyanhydrinen in einem Zweiphasensystem	118
5. Ausblick	121
6. Literatur.....	122

ABBILDUNGEN & TABELLEN

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Spaltung von Amygdalin durch Bittermandelextrakt	3
Abb. 2: Stereoselektive Blausäureaddition an Benzaldehyd.....	3
Abb. 3: Hydroxynitril-Lyase katalysierte reversible Spaltung von Cyanhydrinen	4
Abb. 4: Anabolismus, Katabolismus und Entgiftungsmechanismus des cyanogenen Glycosids Linamarin von <i>Manihot esculenta</i>	7
Abb. 5: Schematische Darstellung einer Mesophyllzelle des Blattes von <i>Manihot esculenta</i>	7
Abb. 6: Theorie zur konvergenten Entwicklung der Hydroxynitril-Lyasen.....	9
Abb. 7: Kristallstruktur der HNL aus <i>Prunus amygdalus</i>	11
Abb. 8: Kristallstruktur der HNL aus <i>Sorghum bicolor</i>	12
Abb. 9: Reaktionsmechanismus der MeHNL-katalysierten Spaltung von Acetoncyanhydrin	14
Abb. 10: Kristallstruktur der HNL aus <i>Manihot esculenta</i>	15
Abb. 11: Biochemische Eigenschaften der MeHNL	16
Abb. 12: Kristallstruktur der HNL aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
Abb. 13: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der AtHNL.....	18
Abb. 14: Biochemische Eigenschaften der AtHNL	19
Abb. 15: Wichtige Folgeprodukte ausgehend von chiralen Cyanhydrinen.....	21
Abb. 16: Gegenüberstellung der stereoselektiven MeHNL-katalysierten und der racemischen Substratumssetzung von Benzaldehyd und HCN zu Mandelsäurenitril	22
Abb. 17: Schematisch Darstellung eines organisch-wässrigen Zweiphasensystems....	23
Abb. 18: Schematische Darstellung der Solgel Immobilisierung von Enzymen.....	30
Abb. 19: Schematischer Überblick der Optimierungsstrategien der AtHNL zur Synthese enantiomerenreiner Cyanhydrine	75
Abb. 20: Gegenüberstellung von Reaktionsparametern, die zur enantioselektiven bzw. racemischen Cyanhydrinbildung führen	76

Abb. 21: <i>AtHNL</i> -katalysierte Synthese von (<i>R</i>)-Mandelsäurenitril in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem bei pH 5.....	77
Abb. 22: Nicht enzymatische racemische Bildung von (<i>R</i>)-Mandelsäurenitril bei pH 5,0 und pH 4,5.....	78
Abb. 23: <i>AtHNL</i> -katalysierte Synthese von (<i>R</i>)-Mandelsäurenitril in Puffer-gesättigtem MTBE	79
Abb. 24: <i>AtHNL</i> -katalysierte Synthese von industriell relevanten Cyanhydrinen.....	80
Abb. 25: Synthese von (<i>R</i>)-Mandelsäurenitril mittels Celite- <i>AtHNL</i>	85
Abb. 26: Synthese von (<i>R</i>)-Mandelsäurenitril mittels Solgel- <i>AtHNL</i>	86
Abb. 27: Katalytische Restaktivität von präparierten <i>AtHNL</i> -CLEAs.....	87
Abb. 28: <i>AtHNL</i> -CLEA katalysierte Synthese von (<i>R</i>)-Mandelsäurenitril in einphasigem MTBE	88
Abb. 29: Synthese von (<i>R</i>)-Hydroxyheptannitril mittels Solgel- <i>AtHNL</i>	94
Abb. 30: Einfluss des Wassergehalts von Celite- <i>AtHNL</i> auf die Enzymaktivität.....	95
Abb. 31: Ausbluten des <i>AtHNL</i> -LOV-Fusionsproteins aus den <i>E. coli</i> Zellen ins Lösungsmittel.....	96
Abb. 32: Reaktionsaufbau zur Untersuchung Recyclierbarkeit von <i>AtHNL</i> Präparationen	99
Abb. 33: Recyclierung von Celite- <i>AtHNL</i> und Solgel- <i>AtHNL</i> bei der Synthese von (<i>R</i>)-Mandelsäurenitril	99
Abb. 34: Recyclierung des Ganzzellansatzes bei der Synthese von (<i>R</i>)-Mandelsäurenitril	100
Abb. 35: Lagerung von Celite- <i>AtHNL</i> bei 4 °C über einen Zeitraum von 31 Tagen.....	101
Abb. 36: Untersuchung zur Bindungsstärke von aktiver, immobilisierter <i>AtHNL</i> ...	101
Abb. 37: Recyclierung von Solgel- <i>AtHNL</i> mit intermediären Waschschriften in Puffer.....	102
Abb. 38: Lagerung von Solgel- <i>AtHNL</i> bei 4 °C über einen Zeitraum von 31 Tagen	102
Abb. 39: Alignment der Aminosäuresequenzen von <i>AtHNL</i> und <i>MeHNL</i>	109
Abb. 40: Vergleich der Rückgratstruktur des <i>AtHNL</i> - und <i>MeHNL</i> -Dimers	109
Abb. 41: Strukturalignment der tetrameren <i>MeHNL</i> und des putativen <i>AtHNL</i> Modells	111
Abb. 42: Vergleich der pH-abhängigen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten von Wildtyp- <i>AtHNL</i> und Surfmod- <i>AtHNL</i>	113

Abb. 43: Thermostabilität von Wildtyp-AtHNL und Surfmod-AtHNL	115
Abb. 44: Größenausschlusschromatographie von Wildtyp-AtHNL und Surfmod-AtHNL	116
Abb. 45: Surfmod-AtHNL katalysierte Synthese von (<i>R</i>)-Mandelsäurenitril im wässrig-organischen Zweiphasensystem	118
Abb. 46: Surfmod-AtHNL katalysierte Synthese von (<i>R</i>)-3-Fluormandelsäurenitril und (2 <i>S</i>)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitril im wässrig-organischen Zweiphasensystem	119

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Wichtige Cyanhydrine	74
Tab. 2: Gegenüberstellung der Präparationsmethoden der AtHNL	83
Tab. 3: Relative Enzymaktivität von präzipitierter und immobilisierter AtHNL (Celite, Solgel und CLEA) bei der Synthese verschiedener Cyanhydrine ..	90
Tab. 4: Synthese von verschiedenen Cyanhydrinen mittels Ganzzellbiokatalyse ..	97
Tab. 5: Zusammenstellung der AtHNL Präparationen und der erzielbaren (<i>R</i>)-Mandelsäurenitrilausbeute pro g Zellmasse	104
Tab. 6: Aminosäuren der Dimer-Dimer Interaktionsfläche der MeHNL	112
Tab. 7: pH-Stabilität von Wildtyp-AtHNL und Surfmod-AtHNL	114

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AS	Aminosäure
AthHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
AU	Relative Einheiten
C	Kohlenstoff
DIPE	Diisopropylether
DNA	Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CP	Citrat-Phosphat (-Puffer)
ee	Enantiomerenüberschuss
FAD	Flavinadenosindinucleotid
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde(n)
HCN	Cyanwasserstoff oder Blausäure
HbHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Hevea brasiliensis</i>
HNL	Hydroxynitril-Lyase
K	Kalium
kDa	Kilodalton
KP	Kalium-Phosphat (-Puffer)
L	Liter
Lsg.	Lösung
LuhHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Linum usitatissimum</i>
MeHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Manihot esculenta</i>
M	Molar
min	Minute(n), minütig
ml	Milliliter
mol	Chemische Stoffmenge Mol
M _r	Molekulargewicht
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NAD ⁺	Nicotinamidadenosindinucleotid
PaHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Prunus amygdalus</i>
sec	Sekunde(n)
SbHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Sorghum bicolor</i>
SCP	Serin-Carboxypeptidase
t	Zeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
U	Enzymeinheit Substratumsatz (1 µmol m ⁻¹)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZnADH	Zink-abhängige Alkoholdehydrogenase

KAPITEL 1

1. Einleitung

1.1. Die Entdeckung und Anwendung von Biokatalysatoren

Die Nutzung biokatalytischer Prozesse reicht in der Geschichte weit zurück. Dabei stellt die spontane Vergärung zuckerhaltiger Fruchtsäfte die einfachste Form eines solchen Prozesses (Fermentation) ohne menschliches Zutun dar und diente im Laufe der Jahrhunderte als Grundlage für komplexere biokatalytische Anwendungen.^[1] Erste schriftliche Hinweise auf die Nutzung von Fermentationsprozessen liefert das vor über 5000 Jahren verfasste Gilgamesch-Epos, in dem unter anderem die Herstellung von Brot und Bier beschrieben wurde.^[2]

Die wissenschaftliche Aufklärung biokatalytischer Prozesse begann Anfang des 19. Jahrhunderts durch die Erforschung des alkoholischen Gärungsprozesses, welcher in unabhängigen Versuchsreihen auf lebende Hefezellen zurückgeführt werden konnte.^[3, 4] Mitte des 19. Jahrhunderts postulierte Louis Pasteur die „vitalistische Gärungstheorie“, die lebende Mikroorganismen als Katalysator in Gärungsprozessen beschreibt.^[5] Im darauf folgenden Jahr (1858) beschrieb Pasteur die kinetische Racematspaltung von Weinsäure, katalysiert durch den Pilz *Penicillium glaucum*, und damit den ersten stereoselektiven biokatalytischen Spaltungsprozess.^[6] Ende des 19. Jahrhunderts, im Jahr 1897, widerlegte Eduard Buchner die „vitalistische Gärungstheorie“, indem er Gärungsprozesse mittels zellfreier Hefeextrakte durchführte und die Existenz von intrazellulären Enzymen bewies.^[7] In den darauf folgenden Jahren wurden weitere zellfreie Enzyme identifiziert und ihr katalytisches Potential für die industrielle Anwendung außerhalb der Lebensmittelherstellung entdeckt.^[8] Ein klassisches Beispiel ist die Stärke-hydrolysierende Enzympräparationen des Pilzes *Aspergillus oryzae*, die seit Ende des 19. Jahrhunderts von der Firma Jokichi Takamine produziert wurde und auch heute noch unter dem Namen Taka-Diastase vertrieben wird.^[9]

Mit dem Beginn der 1980er Jahre begann die Entwicklung molekularbiologischer Methoden. Durch die Identifikation neuer Biokatalysatoren, deren Optimierung mittels Mutagenese sowie ihrer kostengünstigen Produktion mittels heterologer Expression in Mikroorganismen, steht heute eine große Bandbreite an Biokatalysatoren für diverse Reaktionen bereit.^[10] Dadurch stieg in den letzten Jahren auch der Einsatz von Biokatalysatoren im industriellen Maßstab stark an.

Gegenüber konventionellen chemischen Katalysatoren besitzen Biokatalysatoren den Vorteil, dass sie zumeist umweltverträglich in wässrigen Lösungen unter milden Reaktionsbedingungen, wie beispielsweise moderaten Temperaturen und neutralem pH eingesetzt werden können.^[11] Die enzymatische Umsetzung von schlecht wasserlöslichen, organischen Verbindungen kann jedoch auch in nicht-wässrigen organischen Lösungsmitteln, ionischen Flüssigkeiten, überkritischen Fluiden oder Kombinationen aus den genannten Reaktionsmedien erfolgen.^[12, 13]

Neben den milden Reaktionsbedingungen verfügen Enzyme über eine hohe Regio-, Chemo- und Stereoselektivität, die sie zur Darstellung enantiomerenreiner Feinchemikalien und pharmazeutischer Produkte mittels einem oder weniger Syntheseschritte zunehmend attraktiver machen.^[14, 15]

Hydroxynitril-Lyasen können beispielsweise die stereoselektive Carboligation aus achiralen Vorstufen katalysieren, die mit konventionellen chemischen Methoden nur schwer durchführbar ist.^[16, 17]

1.2. Die Entdeckung der Hydroxynitril-Lyasen

Im Jahr 1837 beobachteten Wöhler und Liebig die Spaltung des Amygdalins der Mandel durch Bittermandelextrakte („Emulsin“) in eine Zuckerkomponente, Benzaldehyd und Blausäure (Abb. 1).^[18]

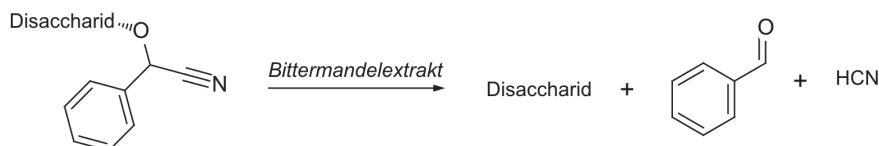


Abb. 1: Spaltung von Amygdalin durch Bittermandelextrakt. Amygdalin wird durch die Enzyme des Bittermandelextrakts (β -Galactosidase, Hydroxynitril-Lyase) in eine Zuckerkomponente (Gentiobiose), Benzaldehyd und Blausäure gespalten.

Etwa 70 Jahre später, im Jahr 1908, berichtete Rosenthaler, dass mittels Emulsin ebenfalls die stereoselektive Umkehrreaktion, die Blausäureaddition an Benzaldehyd, möglich sei (Abb. 2).^[19] Mit dieser Entdeckung beschreibt Rosenthaler eine der ersten asymmetrische biokatalytische C-C-Bindungsknüpfung.



Abb. 2: Stereoselektive Blausäureaddition an Benzaldehyd katalysiert durch Bittermandelextrakt.

In den darauf folgenden Jahren konnte der Versuch mit weiteren Pflanzenextrakten erfolgreich wiederholt werden,^[20, 21] sodass Zweifel an der enzymkatalysierten Reaktion aufkamen und chirale Verunreinigungen der Pflanzenextrakte als Katalysator der Reaktion vermutet wurden.^[22, 23] Aufklärung lieferte Albers bis zum Jahr 1941, indem er zuerst in Rohzellextrakten der Mandel und anschließend mit teilgereinigten Enzymextrakten, die Hydroxynitril-Lyase (HNL) katalysierte, asymmetrische Blausäureaddition belegen konnte.^[24, 25] Seit den 1960er Jahren wurden umfangreiche Untersuchungen an HNLs aus diversen (meist pflanzlichen) Quellen durchgeführt, die im Folgenden näher beschrieben werden.^[26, 27]

1.2.1. HNLs katalysieren die Cyanogenese und Hydrocyanierung

Hydroxynitril-Lyasen werden in der Literatur auch als Oxynitrilasen bezeichnet und zählen zur Enzymklasse der Aldehyd-Lyasen (EC 4.1.2.10/11/46/47). Sie katalysieren die asymmetrische reversible Spaltung von Cyanhydrinen in eine Carbonylkomponente (Aldehyd oder Keton) und Blausäure (Abb. 3).^[28] Dabei ist die Spaltungsreaktion beispielsweise Bestandteil der Cyanogenese, der Freisetzung von Blausäure, welche hauptsächlich aus der Pflanzenfamilie der *Rosaceae* (Rosengewächse) bekannt ist.^[29, 30] Die Hydrocyanierung beschreibt die stereoselektive Synthesereaktion, bei der Blausäure an eine Carbonylkomponente addiert wird.

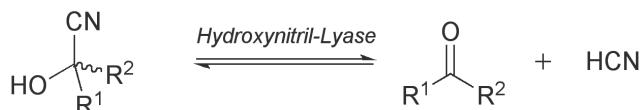


Abb. 3: Hydroxynitril-Lyase katalysierte reversible Spaltung von Cyanhydrinen in ein Aldehyd oder Keton (Carbonylkomponente) und Blausäure.

1.2.2. Die Cyanogenese der höheren Pflanzen

Die native Funktion von HNLs ist die Cyanogenese, also die Freisetzung von Blausäure (HCN) mittels Cyanhydrinspaltung, die zumeist als Abwehrstrategie gegenüber Herbivoren und Mikroorganismen bei über 2650 Pflanzenspezies dokumentiert wurde.^[31-33] Jedoch verfügt nicht jede cyanogene Pflanze über HNLs, da die Freisetzung von HCN ebenfalls durch eine langsamere chemische Reaktion erfolgen kann.^[34] In der Literatur sind derzeit ca. 100 cyanogene Komponenten beschrieben, welche als Ausgangssubstanz der Cyanogenese dienen können.^[32] Bei den pflanzlichen cyanogenen Verbindungen handelt es sich zumeist um cyanogene Glycoside, bei denen das Cyanhydrin über eine glycosidische Bindung an einen Zuckerrest geknüpft ist und somit stabilisiert wird.^[35] Diese cyanogenen Glycoside können neben ihrer Funktion im pflanzlichen Abwehrsystem auch als Stickstoffquelle bei der Aminosäuresynthese genutzt werden.^[36, 37]

Die Effektivität der Cyanogenese als Abwehrsystem wird durch die hohe Toxizität der Blausäure, bzw. des durch Dissoziation gebildeten Cyanids erreicht, welches eine

gezielte Inhibierung vieler Metalloenzyme bewirkt. In erster Linie wird dabei die Cytochrom-c-Oxidase, welche eine essentielle Funktion in der Atmungskette des Zellstoffwechsels von aeroben Organismen hat,^[30] durch irreversible Bindung des Cyanids mit dem zentralen Eisen(III)-Ion des Häm- α_3 -Cofaktors inhibiert, wodurch kein Elektronentransfer auf den Sauerstoff erfolgen kann. Diese Unterbrechung der Zellatmungskette bewirkt den Zelltod durch Ersticken.^[38] Neben der Inaktivierung der Cytochrom-c-Oxidase bindet Cyanid an das Eisen(II)-Ion des Hämoglobins roter Blutkörperchen, die somit die Fähigkeit der Sauerstoffbindung verlieren. Diese Inaktivierung ist jedoch im Vergleich zur Desaktivierung der Zellatmungskette weniger toxisch.^[39]

1.2.3. Pflanzlicher Metabolismus cyanogener Glycoside

Bedingt durch die hohe Toxizität der Blausäure (bzw. des Cyanids) auf aerobe Organismen, können cyanogene Pflanzen instabile Cyanid-haltige Verbindungen nicht in der Pflanzenzelle lagern. Aus diesem Grund bilden sie in ihren Zellen stabile cyanogene Komponenten durch die glycosidische Verknüpfung der Cyanid-haltigen Verbindungen mit Zuckerresten, sogenannte cyanogene Glycoside. Diese werden im Bedarfsfall enzymatisch gespalten. Höhere Pflanzen haben ein komplexes System zur Synthese, Lagerung und Spaltung der cyanogenen Glycoside entwickelt. Im Folgenden wird dies am Beispiel des Maniok (*Manihot esculenta*) beschrieben (Abb. 4, Abb. 5).

Die Synthese des cyanogenen Glycosids Linamarin (Abb. 4, D) erfolgt bei der Maniok-Pflanze in erster Linie in den Sprossspitzen, ausgehend von der α -Aminosäure Valin (Abb. 4, A).^[40] Im ersten Schritt des Biosynthesewegs zum Linamarin, wird aus Valin mittels zweier membranständiger (Tonoplast) Cytochrom-P450-Enzyme (CYP79D1 und CYP79D2) das Intermediat 2-Methyl-propanal-oxim (Abb. 4, B) gebildet, welches in die Vakuole sekretiert wird.^[41, 42] Das 2-Methyl-propanal-oxim wird im nächsten Reaktionsschritt, katalysiert durch ein weiteres Cytochrom-P450-Enzym (CYP71E), zu Acetoncyanhydrin (Abb. 4, C) umgesetzt,^[40, 43, 44] welches anschließend mittels der UDP-Glycosyltransferase (UDP: Uridindiphosphat) mit Glucose verknüpft wird. Das gebildete Produkt ist das cyanogene Glycosid Linamarin (Abb. 4, D). Es verbleibt zur Lagerung in der Vakuole.

Die gezielte Freisetzung von Blausäure als Fraßschutz geschieht durch eine zweistufige enzymatische Spaltung des Linamarins. Im ersten Spaltungsschritt wird der Zucker des Linamarins mittels der β -Glucosidase Linamarase abgespalten. Das gebildete Acetoncyanhydrin wird im zweiten Schritt HNL-katalysiert gespalten, wodurch Blausäure (Abb. 4, F) und Aceton (Abb. 4, E) freigesetzt werden.^[41]

Ist die Pflanzenzelle intakt, so unterbleibt die Spaltungsreaktion aufgrund der räumlichen Trennung von Enzymen (Linamarase, HNL) und Linamarin. Das Linamarin befindet sich in der Zellvakuole und die Enzyme sind in der Zellwand der Pflanzenzelle eingelagert. Die Spaltungsreaktion setzt ein, sobald die Pflanzenzelle, beispielsweise durch einen Fraßfeind, beschädigt wird und die Kompartimentierung der Zelle zerstört wird, wodurch das Linamarin aus der Vakuole austreten kann und mit den Enzymen in Kontakt kommt.

Die meisten cyanogenen Pflanzen enthalten allerdings keine HNLs. Bei diesen Pflanzen findet die Spaltung von Cyanhydrinen spontan oberhalb pH 4 (pH-Wert der Vakuole) und 25 °C statt.^[45] Die enzymatische Cyanhydrinspaltung, im weniger sauren Zellmilieu, verläuft jedoch deutlich beschleunigt und verstärkt somit den Abwehrmechanismus.^[35] Dabei können cyanogene Pflanzen freigesetztes Cyanid nicht nur für die Abwehr von Fraßfeinden, sondern mittels enzymatischer Umsetzung (β -Cyanoalanin-Synthase, β -Cyanoalanin-Hydrolase) auch für die Synthese der Aminosäure Asparagin (Abb. 4, K) nutzen. Ein weiterer Entgiftungsmechanismus, der bei Maniok schwach ausgeprägt ist, jedoch bei Säugetieren, Insekten und Mikroorganismen hauptsächlich genutzt wird, ist die enzymatische Umsetzung (Rhodanese) des Cyanids zu Thiosulfat (Abb. 4, G) und Sulfit (Abb. 4, H).

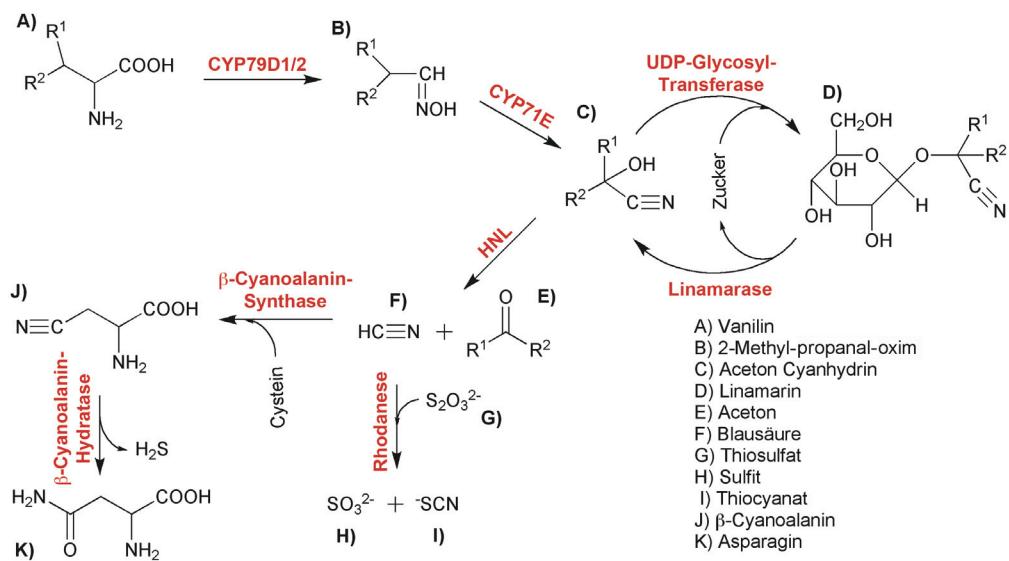


Abb. 4: Anabolismus, Katabolismus und Entgiftungsmechanismus des cyanogenen Glycosids Linamarin von *Manihot esculenta*. Die Synthese des Linamarins beginnt mit der Umsetzung der Aminosäure Valin. Die Spaltung von Linamarin wird durch die Linamarase und HNL katalysiert. Der Entgiftungsmechanismus führt zur Bildung von Thiocyanat, Sulfit und der Aminosäure Asparagin. Modifiziert nach Hickel.^[35]

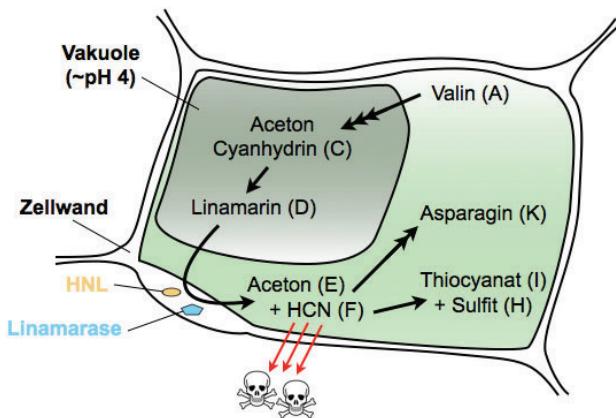


Abb. 5: Schematische Darstellung einer Mesophyllzelle des Blattes von *Manihot esculenta*. Valin (A) wird über membranständige und frei in der Vakuole vorkommende Cytochrom-P450-Enzyme zu Aceton Cyanhydrin (C) und anschließend durch enzymatische Glucosilierung (UDPG-Glycosyl-Hydratase) zu Linamarin (D) umgesetzt. Eine Beschädigung der Mesophyllzelle führt zur Aufhebung der Kompartimentierung des Linamarins (D) und der Enzyme Linamarase und HNL, sodass eine enzymatische 2-Schrittspaltung des Linamarins in Aceton (E) und HCN (F) stattfinden kann. Das HCN (F) ist sehr toxisch und dient zur Abwehr von Fraßfeinden. Der zelluläre Entgiftungsmechanismus kann HCN enzymatische zu Thiocyanat (I), Sulfit (H) oder Asparagin (K) umsetzen. Modifiziert nach McMahon.^[41]

Der zuvor beschriebene Biosyntheseweg und Abbau des cyanogenen Glycosids kann mit leichten Änderungen auf andere cyanogene Pflanzen übertragen werden. So kann beispielsweise die Biosynthese des cyanogenen Glycosids statt mit Valin mit einer anderen Aminosäure wie beispielsweise Leucin, Isoleucin, Tyrosin oder Phenylalanin beginnen und infolge dessen zu einem anderen cyanogenen Glycosid führen. Von den 100 in der Literatur beschriebenen cyanogenen Verbindungen^[32] sind 60 cyanogene Glycoside.^[28]

Zudem wurden Unterschiede bei der Kompartimentierung der cyanogenen Glycoside und ihrer spaltenden Enzyme beschrieben. So findet deren Trennung bei der Hirse (*Sorghum bicolor*) nicht auf intrazellulärer Ebene wie bei Maniok statt, sondern die cyanogenen Glycoside konnten in den Vakuolen der Epidermiszellen nachgewiesen werden, wohingegen die β -Glycosidase und HNL in der darunter liegenden Mesophyllschicht lokalisiert sind.^[35]

Abgesehen von diesen Unterschieden konnte bei den bereits umfangreich charakterisierten HNLs eine hohe phylogenetische Diversität nachgewiesen werden, die im Folgenden näher beschrieben wird.

1.2.4. Die konvergente Evolution der HNLs

Derzeit sind ca. 40 HNLs in der Literatur beschrieben, deren Ursprung größtenteils pflanzlich ist. So konnten HNLs in cyanogenen Nutzpflanzen wie beispielsweise Maniok (*Manihot esculenta*, *MeHNL*), Gummibaum (*Hevea brasiliensis*, *HbHNL*), Hirse (*Sorghum bicolor*, *SbHNL*), Lein (*Linum usitatissimum*, *LuHNL*) und Mandel (*Prunus amygdalus*, *PaHNL* oder *P. dulcis*) nachgewiesen werden. Eine HNL wurde zudem aus einer nicht cyanogenen Pflanze, der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*, *AtHNL*), isoliert. Neben Pflanzen konnten HNLs zudem in einigen Bakterien (z.B. *Chromobacter violaceum*, *Pseudomonas mephitica*), Cyanobakterien (*Anacyctis nidulans*), Algen (*Chlorella sp.*), Pilzen (*Fusarium sp.*) und wenigen Arthropoden nachgewiesen werden.^[28, 46, 47]

Analysen der Aminosäurezusammensetzung und Proteinstruktur zeigen, dass obwohl alle HNLs die enantioselektive reversible Spaltung von Cyanhydrinen katalysieren, sie eine große Sequenz- und Strukturdiversität aufweisen, sodass sie offensichtlich durch konvergente Evolution, ausgehend von zwei Faltungsmotiven ($\beta\alpha\beta$ -Bindemotiv oder α/β -Hydrolase Faltungsmotiv), entstanden sind (Abb. 6).

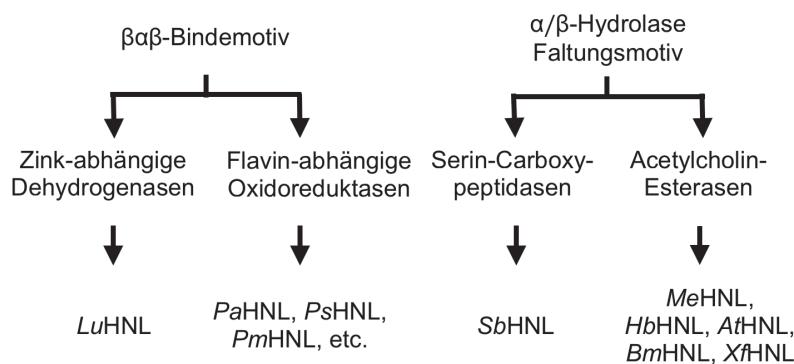


Abb. 6: Theorie zur konvergenten Entwicklung der Hydroxynitril-Lyasen. Ausgehend von zwei Faltungsmotiven ($\beta\alpha\beta$ -Bindemotiv, α/β -Hydrolasefaltung) sind bisher vier HNL-Superfamilien bekannt (Zink-abhängige Dehydrogenasen, Flavin-abhängige Oxidoreduktasen, Acetylcholin-Esterasen und Serin-Carboxypeptidasen). Die *LuHNL* aus *Linum usitatissimum* wird den HNLs mit Faltungsmotiv der Zink-abhängigen Dehydrogenasen zugeordnet. Die *PaHNL* aus *Prunus amygdalus*, *PsHNL* aus *P. serotina* und die *PmHNL* aus *P. mume* zählen zu den HNLs mit Faltungsmotiv der Flavin-anhängigen Oxidoreduktasen. Die *SbHNL* aus *Sorghum bicolor* ist derzeit die einzige HNL mit Serin-Carboxypeptidase Faltungsmotiv und die *MeHNL* aus *Manihot esculenta*, *HbHNL* aus *Hevea brasiliensis*, *AtHNL* aus *Arabidopsis thaliana*, *BmHNL* aus *Baliospermum montanum* und die *XfHNL* aus *Xylella fastidiosa* sind HNLs mit Acetylcholin Esterase Faltungsmotiv zuzuordnen.

Die beiden Faltungsmotive teilen sich in insgesamt vier Superfamilien, in die nach aktuellem Stand alle HNLs eingeordnet werden können.

1.2.4.1. HNLs mit dem Faltungsmotiv von Zink-abhängigen Dehydrogenasen

Im Jahr 1988 wurde in der Nutzpflanze Lein (*Linum usitatissimum*), eine Zink-abhängige, *R*-selektive HNL identifiziert (*LuHNL*), welche eine hohe Sequenzähnlichkeit zu langkettigen Zink-abhängigen Alkoholdehydrogenasen (Klasse I) aufweist.^[48, 49] Obwohl Zink für die katalytische HNL-Aktivität des Enzyms notwendig ist, konnte keine katalytische Dehydrogenase-Nebenaktivität der *LuHNL* nachgewiesen werden.^[50] Aufgrund der schlechten heterologen Expression in *E. coli* gelang die Charakterisierung der *LuHNL* nur teilweise. Zu ihren Besonderheiten zählt jedoch die ausschließliche Akzeptanz von aliphatischen Substraten, insbesondere von Ketonen.^[51-53]

1.2.4.2. HNLs mit dem Faltungsmotiv von Flavin-abhängigen Oxidoreduktasen

Die HNLs dieser Superfamilie stellen eine homogene Gruppe dar und entstammen alle der Pflanzenfamilie der Rosengewächse (*Rosaceae*). Sie sind *R*-selektive, monomere Glycoproteine und benötigen FAD zur Aufrechterhaltung ihrer strukturellen Integrität. Dabei ist FAD nicht am katalytischen Mechanismus der Enzyme beteiligt.^[54] Die Glycosilierung der Enzyme resultiert in Isoenzymen mit unterschiedlichen Glycosilierungsmuster. Die Art der Glycosilierung hat Auswirkungen auf die katalytische Aktivität der HNL.^[55] Das natürliche Substrat aller HNLs dieser Superfamilie ist (*R*)-Mandelsäurenitril, wobei ebenfalls eine Vielzahl an aromatischen und aliphatischen Substraten akzeptiert werden. Die bestuntersuchte HNL dieser Superfamilie, deren Kristallstruktur und katalytischer Mechanismus sowie umfangreiche Charakteristika bekannt sind, stammt aus *Prunus dulcis* bzw. *Prunus amygdalus* (*PaHNL*) (Abb. 7).^[56-58] Die *PaHNL* akzeptiert aromatische und aliphatische Substrate, bevorzugt allerdings Aldehyde. Sie kann aufgrund der

Glycosilierung nur in Hefen heterolog exprimiert werden, weist jedoch eine hohe Enzymaktivität und Stabilität unter sauren Bedingungen auf. Aus diesem Grund ist sie ein vielfach verwendeter Biokatalysator für die industrielle Synthese von (*R*)-Cyanhydrinen.^[16, 17]

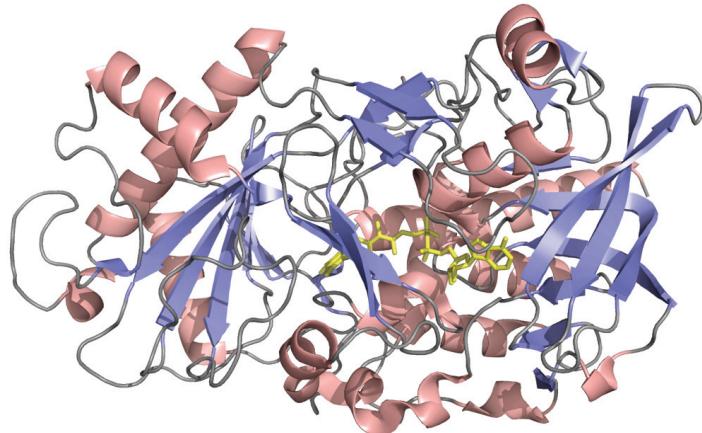


Abb. 7: Kristallstruktur der HNL aus *Prunus amygdalus* bzw. *P. dulcis* (PaHNL; pdb 1JU2). Das Enzym liegt in seiner Quartärstruktur als Monomer vor. Das Struktur-stabilisierende FAD (gelb) ist zentral im Enzym positioniert.

Weitere HNLs mit ähnlichen Eigenschaften wurden beispielsweise aus *Prunus serotina* (PsHNL),^[59-61] *Prunus mume* (PmHNL)^[16] und *Eriobotrya japonica* (EjHNL)^[62, 63] isoliert.

1.2.4.3. HNLs mit Serin-Carboxypeptidase-Faltungsmotiv

Im Jahr 1961 wurde erstmals eine HNL mit Serin-Carboxypeptidase Faltungsmotiv aus Hirse (*Sorghum bicolor*; SbHNL) beschrieben.^[26] Bei der Strukturaufklärung (Abb. 8) der SbHNL wurde die typische heterotetramere Quartärstruktur ($\alpha_2\beta_2$), bei der die β -Untereinheiten glycosiliert und durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind, gezeigt.^[57, 64] Aufgrund der Glycosilierung kommt die SbHNL in drei Isoformen vor (SbHNL-I, -II, -III). Das natürliche Substrat des Enzyms ist (S)-4-Hydroxymandelsäurenitril. Die aus Hirsekeimlingen isolierte SbHNL wurde umfangreich charakterisiert.^[26, 57, 64-67] Allerdings gelang die heterologe Expression in *Pichia pastoris* nur mit sehr geringer enzymatischer Restaktivität.^[68] Neben der

strukturellen Ähnlichkeit der *SbHNL* zu Serin-Carboxypeptidasen konnte bei ihr eine geringe Carboxypeptidase- und Esterase-Aktivität nachgewiesen werden.^[50]

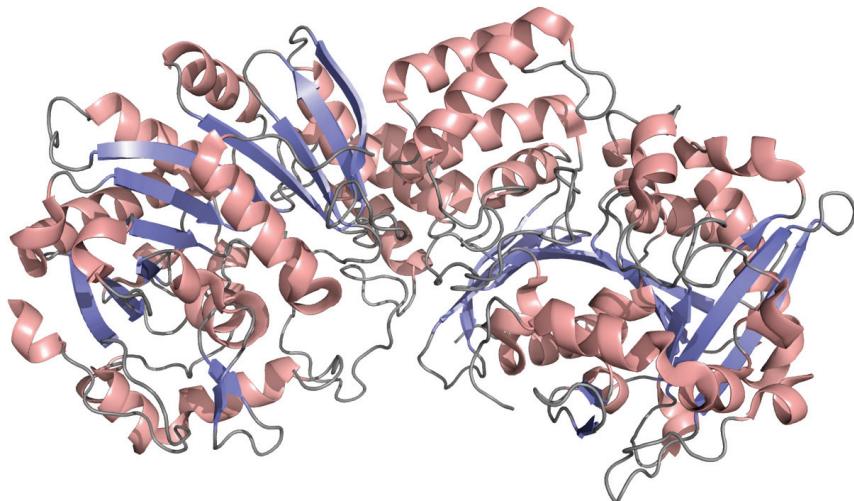


Abb. 8: Kristallstruktur der HNL aus *Sorghum bicolor* (*SbHNL*; pdb 1GXS). Die *SbHNL* zeigt in der Kristallstruktur ein typisches α/β -Hydrolase Faltungsmotiv.^[69]

1.2.4.4. HNLs mit Acetylcholin-Esterase Faltungsmotiv

Die HNLs dieser Superfamilie stellen eine heterogene Gruppe dar, die jedoch am umfangreichsten charakterisiert wurden. HNLs dieser Gruppe wurden in Pflanzen der Familie der Wolfsmilch- (*Euphorbiaceae*) und Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*), sowie in einem pflanzenpathogenen Proteobakterium (*Xanthomonadaceae*) entdeckt. Basierend auf Arbeiten mit den Enzymen aus *Manihot esculenta* (*MeHNL*) und *Hevea brasiliensis* (*HbHNL*) wurde bis zum Jahr 2007 angenommen, dass ausschließlich *S*-selektive HNLs zu dieser Superfamilie zählen.^[41, 70-73] Im Jahr 2007 wurde die erste und bisweilen einzige *R*-selektive HNL aus *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*) mit Acetylcholin-Esterase Faltungsmotiv entdeckt.^[74] Sowohl bei der *HbHNL* als auch der *AtHNL* konnte eine für Esterasen typische katalytische Nebenreaktion nachgewiesen werden.^[75, 76] Die starke strukturelle Ähnlichkeit zwischen Esterasen und den Hydroxynitril-Lyasen dieser Gruppe wurde 2010 zudem im Gegenexperiment bestätigt. Dabei konnte einer Esterase aus *Nicotiana tabacum*

durch den Austausch zweier Aminosäuren im aktiven Zentrum eine leichte Hydroxynitril-Lyase Aktivität verliehen werden.^[77]

Bis zum Jahr 2011 wurde die Enzymgruppe um zwei weitere HNLs erweitert: die S-selektive HNL aus der cyanogenen Pflanze *Baliospermum montanum* (*BmHNL*) und die HNL aus dem Proteobakterium *Xylella fastidiosa* (*XfHNL*), deren Stereoselektivität noch nicht aufgeklärt wurde.

Im Folgenden werden exemplarisch die S-selektive *MeHNL* und die R-selektive *AfHNL* näher betrachtet.

1.2.4.4.1. Die S-selektive HNL aus *Manihot esculenta*

Die HNL aus *Manihot esculenta* zählt zu den am besten beschriebenen HNLs in der Literatur. Sie wurde im Jahr 1981 erstmals beschrieben^[78] und seitdem umfangreich charakterisiert. Im Fokus der Untersuchungen standen einerseits ihre physiologische Funktion in der cyanogenen Maniok-Pflanze (siehe 1.2.2), da deren Knolle als Nahrungsmittel in einigen Regionen Afrikas dient, dabei jedoch einer speziellen Verarbeitung bedarf^[44, 79] und andererseits die potentielle Anwendbarkeit des Enzyms als industrieller Biokatalysator. Dazu wurden insbesondere die biochemischen Eigenschaften sowie das Substratspektrum, die Kristallstruktur, und der katalytische Mechanismus aufgeklärt.^[33, 80-83]

Der katalytische Mechanismus umfasst die für α/β -Hydrolasen typische katalytische Triade (Ser-80 – His-236 – Asp-208).^[81] Der Reaktionsmechanismus für die Spaltung von Acetoncyanhydrin wurde durch ortsspezifische Mutagenese von verschiedenen Aminosäuren im aktiven Zentrum der *MeHNL* aufgeklärt. Dabei wird die Hydroxylgruppe des Acetoncyanhydrins über Thr-11 und Ser-80 stabilisiert. His-236 fungiert als katalytische Base, welche, vermittelt durch Ser-80, ein Proton von der Hydroxylgruppe des Cyanhydrins auf das dabei entstehende Cyanid überträgt. Der katalytische Mechanismus ist im Detail Abb. 9 in dargestellt.

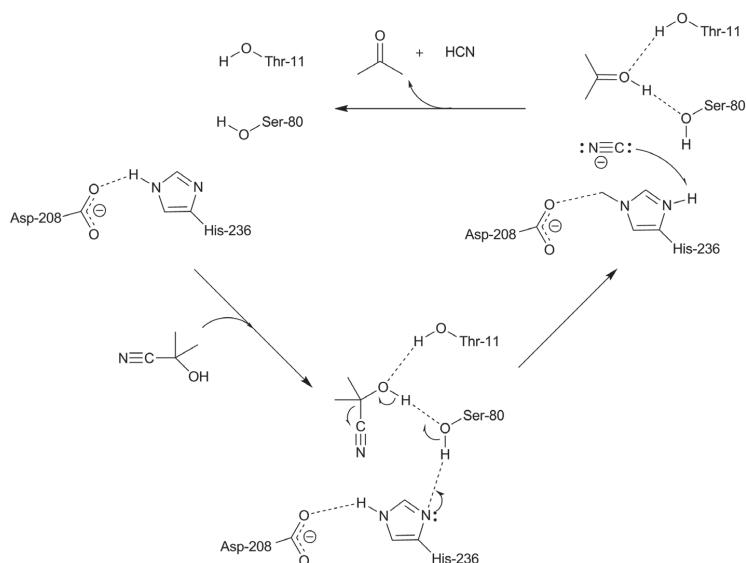


Abb. 9: Reaktionsmechanismus der MeHNL-katalysierten Spaltung von Acetoncyanhydrin. Die Hydroxylgruppe des Acetoncyanhydrins wird über Wasserstoffbrücken zu Thr-11 und Ser-80 stabilisiert. His-236 zieht, vermittelt durch Ser-80 ein Proton von der Hydroxylgruppe des Acetoncyanhydrins und überträgt es auf das entstehende Cyanid.^[83]

Ungeklärt ist bisher die eindeutige Quartärstruktur der MeHNL in gelöster Form. Während das Enzym in der Kristallstruktur als Homodimer vorliegt,^[82] weicht das durch Größenausschlusschromatographie bestimmte Molekulargewicht davon ab. Das erwartete Molekulargewicht des MeHNL-Dimers beträgt ca. 58 kDa (29 kDa pro Untereinheit); wohingegen das Molekulargewicht der MeHNL in der Literatur zwischen 92 kDa (Trimer) bis 124 kDa (Tetramer) angegeben wird.^[33, 84-86] Computergestützte Analysen, basierend auf der Kristallstruktur der MeHNL, zeigten das Enzym als stabil vorliegendes Homodimer, welches jedoch eine schwache Dimer-Dimer Interaktionsfläche aufweist, die zur Tetramerbildung führen kann (Abb. 10). Die von Jan Guterl erzielten Ergebnisse zur Quartärstruktur der MeHNL in Lösung deuten entweder auf ein Trimer oder ein sich rasch einstellendes Gleichgewicht zwischen Dimer und Tetramer hin.^[86]

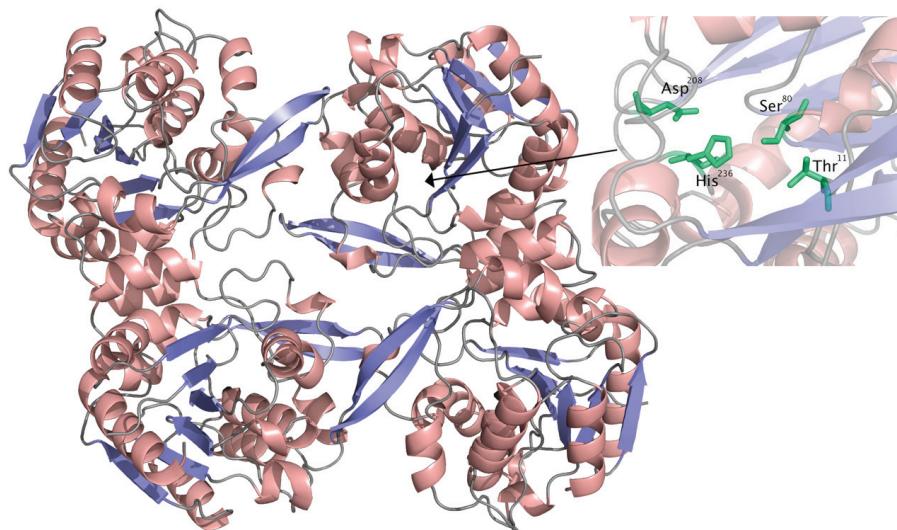


Abb. 10: Kristallstruktur der HNL aus *Manihot esculenta* (MeHNL: pdb 1DWP). Links: Die im Kristall als Dimer vorliegende MeHNL wurde an ihrer Drehachse vertikal gespiegelt, um ihre potentielle Tetramerisierung zu verdeutlichen.^[86, 87] Rechts: Anordnung der katalytisch aktiven Aminosäuren im aktiven Zentrum der MeHNL.

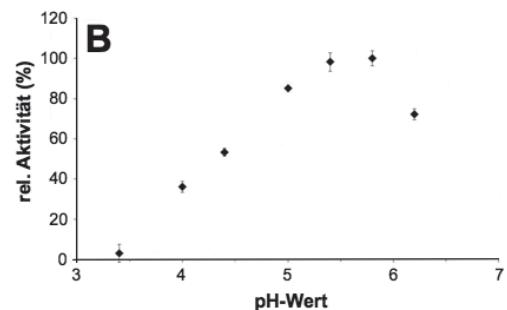
Detaillierte Untersuchungen zu den kinetischen Parametern der MeHNL zeigten eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) für die Spaltung des natürlichen Substrats Mandelsäurenitril von $50 (\pm 10)$ U/mg mit einem K_m -Wert von $4,1 (\pm 0,7)$ mM. Die Synthesereaktion ausgehend von Benzaldehyd und HCN verläuft mit einer maximalen Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von $17,5 (\pm 1,4)$ U/mg langsamer. Dabei weist die MeHNL einen K_m -Wert von $5,9 (\pm 1,5)$ mM für Benzaldehyd (Abb. 11, A) auf.

Neben dem natürlichen Substrat Mandelsäurenitril akzeptiert die MeHNL diverse aromatische, heteroaromatische und aliphatische Substrate.

Als Inhibitor des Enzyms konnte Acetat identifiziert werden, das häufiger Bestandteil in für HNLs genutzten Puffersystemen ist. Vermutlich bindet Acetat im aktiven Zentrum anstelle des Substrats, wodurch die Substratbindung inhibiert wird.^[86]

A Kinetische Parameter der MeHNL		
	Spaltung	Synthese
V_{max} [U/mg]	50 (± 10)	17,5 ($\pm 1,4$)
K_m (MSN) [mM]	4,1 ($\pm 0,7$)	-
K_m (BA) [mM]	-	5,9 ($\pm 1,4$)
K_m (HCN) [mM]	-	179 (± 29)

Bestimmung in 10 mM Kaliumphosphat Puffer (pH 4,0), 25°C
MSN = Mandelsäurenitril, BA = Benzaldehyd



C Temperatur ^a und pH-Stabilität ^b der MeHNL			
Temperatur [°C]	Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ [h]	pH-Wert	Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ [h]
0	> 96	3,5	0,4
4	> 96	4,0	9
10	> 96	4,6	n.b.
20	> 96	5,0	> 48
30	> 48	5,4	> 96
37	64	6,0	> 240
50	2,7		
60	0,5		

Inkubiert in 10 mM Kaliumphosphat Puffer (pH 6,0 // 25 °C),
Spaltung von Mandelsäurenitril; n.b. = nicht bestimmt

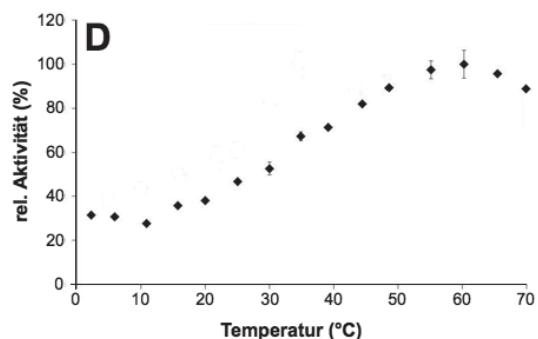


Abb. 11: Biochemische Eigenschaften der MeHNL. A) Kinetische Parameter für die Spaltung und Synthese von Mandelsäurenitril. B) Relative Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von pH 3 - 7. C) Temperaturstabilität, Halbwertszeiten in Stunden. D) Relative Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von 0 - 70°C.^[53]

Des Weiteren zeigt das Enzym ein breites pH- und Temperaturspektrum. So kann die MeHNL prinzipiell in einem pH-Bereich von pH 3,5 – 7,5 und in einem Temperaturbereich von 0 – 37 °C eingesetzt werden, wobei sie bei pH 5,8 (25 °C) bzw. bei 60 °C (pH 5) die höchste Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zeigt. Von besonderer Bedeutung für die Anwendung in der Cyanhydrinsynthese ist die gute Stabilität des Enzyms \geq pH 4,0 (20 °C). Bereits bei pH 4,0 zeigt die MeHNL eine Halbwertszeit von bis zu neun Stunden, die bei steigendem pH-Wert stark zunimmt (Abb. 11, B-D).^[53, 86]

1.2.4.4.2. Die *R*-selektive HNL aus *Arabidopsis thaliana*

Im Jahr 2007 wurde bei einem sequenzbasierten Screening nach neuen Hydroxynitril-Lyasen das Genom des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* nach Genen durchsucht, die für potentielle HNLs mit Sequenzähnlichkeit zur *MeHNL* bzw. *HbHNL* kodieren. Dabei wurde eine neue HNL mit 45 % Sequenzidentität und 68 % Sequenzähnlichkeit zur *MeHNL* bzw. *HbHNL* identifiziert (*AtHNL*).^[74]

Die Entdeckung der *AtHNL* ist bemerkenswert, da *Arabidopsis thaliana* nicht zu den cyanogenen Pflanzen zählt und keine natürliche Funktion dieser HNL bekannt ist. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die *AtHNL* ein evolutionäres Relikt sein könnte.^[74]

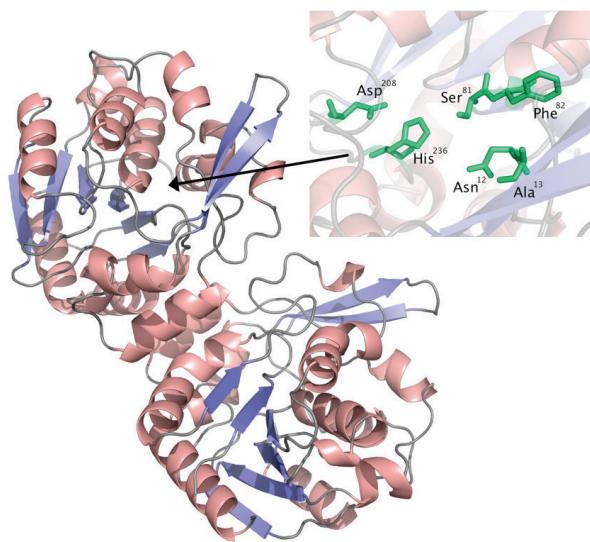


Abb. 12: Kristallstruktur der HNL aus *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*: pdb 3DQZ). Links: Die *AtHNL* bildet sowohl im Kristall, als auch in Lösung ein Dimer. Rechts: Die am Reaktionsmechanismus beteiligten Aminosäuren sind grün hervorgehoben.

Die *AtHNL* ist die erste und bisweilen einzige *R*-selektive HNL mit α/β -Hydrolasefaltung (bzw. Acetylcholin-Esterase Faltungsmotiv).

Die Aufklärung ihrer Kristallstruktur zeigte, dass die katalysierte Reaktion, wie bei den S-selektiven HNLs der selben Strukturklasse, über eine katalytische Triade (Ser-80 – His-236 – Asp-208) verläuft, die Substrate jedoch über andere Aminosäuren stabilisiert werden, woraus die komplementäre Stereochemie resultiert (Abb. 12). Bei

dem von Andexer im Jahr 2008 vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus wird die Cyanogruppe des Substrats über Wasserstoffbrücken zu den Peptidgruppen von Ala-13 und Phe-82 sowie ein Helixdipolmoment stabilisiert. Eine stabilisierende Wasserstoffbrücke zwischen Asp-12 und der Hydroxylgruppe des Substrats ermöglicht, dass His-236 diese deprotoniert und das Proton über Ser-81 auf das dabei entstehende Cyanid transferiert wird.^[88] Der Reaktionsmechanismus ist detailliert in Abb. 13 dargestellt.

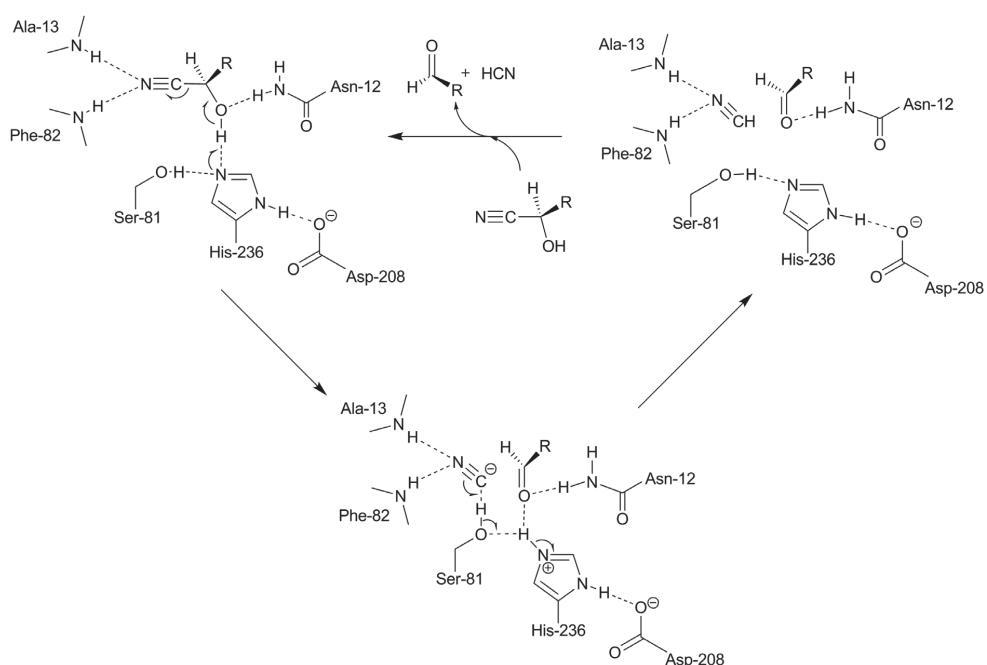


Abb. 13: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der AtHNL. Die Cyanogruppe des Substrats wird durch Wasserstoffbrücken zu den Peptidgruppen von Ala-13 und Phe-82 sowie ein Helixdipolmoment stabilisiert. Die Cyanogruppe wird durch eine Wasserstoffbrücke mit Asp-12 stabilisiert, während His-236 diese deprotoniert und das Proton über Ser-81 auf das entstehende Cyanid überträgt.^[74]

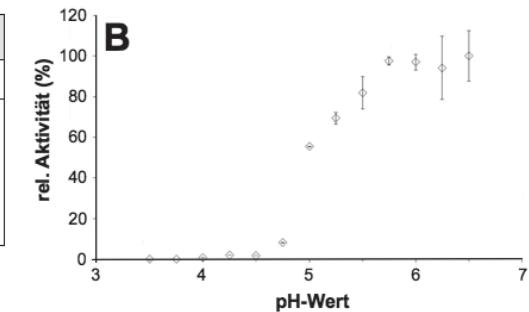
Bei der Charakterisierung der AtHNL konnte gezeigt werden, dass ihre kinetischen Parameter für die Spaltung von Mandelsäurenitril mit einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 80 (± 10) U/mg und einem K_m -Wert von 1,4 ($\pm 0,3$) mM in der gleichen Größenordnung liegen wie bei der MeHNL. Dasselbe gilt auch für die kinetischen Parameter der Synthesereaktion mit $V_{max} = 15,3$ ($\pm 1,9$) U/mg und $K_m = 6,0$ ($\pm 0,6$) mM für Benzaldehyd (Abb. 14, A). Zudem zeigt die AtHNL ein ähnlich breites Substratspektrum, wie die MeHNL, ist allerdings *R*-

selektiv.^[74] Entgegen der *MeHNL* ist die *AtHNL* aufgrund des anderen Aufbaus ihres aktiven Zentrums nicht durch Acetat inhibierbar, sondern zeigt in Acetatpuffer sogar die höchste Enzymaktivität.^[53]

Trotz der hohen strukturellen Ähnlichkeit der *AtHNL* zur *MeHNL*, weist sie ein schmaleres pH- und Temperaturspektrum auf. So ist die *AtHNL* bei niedrigen pH-Werten (\leq pH 5) instabil und kann lediglich von pH 5,0 - 7,5 eingesetzt werden. Dabei liegt ihr pH-Optimum bei pH 6,0 (25 °C). Ihr Temperaturspektrum reicht von 0 - 50 °C, wobei sie bei 37 °C die höchste Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zeigt. Die Stabilität der *AtHNL* ist in erster Linie durch den pH-Wert limitiert, da sie erst bei pH 5,4 eine Halbwertszeit von einer Stunde erreicht. Oberhalb von pH 5,4 steigt ihre Enzymstabilität rapide (Abb. 14, B-D).^[53] Die geringe Stabilität der *AtHNL* im sauren pH-Bereich limitiert ihre Anwendung zur enantioselektiven Synthese von *R*-Cyanhydrinen im organisch-wässrigen Zweiphasensystem unter sauren Reaktionsbedingungen. Dieser Aspekt ist in der vorliegenden Arbeit intensiv untersucht worden.

A Kinetische Parameter der <i>AtHNL</i>		
	Spaltung	Synthese
V_{max} [U/mg]	80 (\pm 10)	15,3 (\pm 1,9)
K_m (MSN) [mM]	1,4 (\pm 0,3)	-
K_m (BA) [mM]	-	6,0 (\pm 1,4)
K_m (HCN) [mM]	-	-

Bestimmung in 10 mM Kaliumphosphat Puffer (pH 5,0), 25°C
MSN = Mandelsäurenitril, BA = Benzaldehyd



C Temperatur ^a und pH-Stabilität ^b der <i>AtHNL</i>			
Temperatur [°C]	Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ [h]	pH-Wert	Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ [h]
0	> 96	3,4	0
4	> 96	4,0	0
10	> 96	4,4	0
20	> 80	5,0	0,16
30	> 33	5,4	1
37	6,6	5,6	3
50	0,3	5,8	16
60	< 0,16	6,0	48

Inkubiert in 10 mM Kaliumphosphat Puffer (^apH 6,0 // ^b25 °C), Spaltung von Mandelsäurenitril

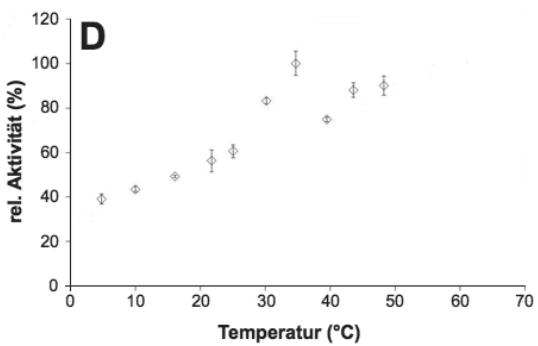


Abb. 14: Biochemische Eigenschaften der *AtHNL*. A) Kinetische Parameter für die Spaltung und Synthese von Mandelsäurenitril. B) Relative Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von pH 3 - 7. C) Temperaturstabilität, Halbwertszeiten in Stunden. D) Relative Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von 0 - 70°C.^[53]

1.2.4.5. HNLs einer neuen Superfamilie? – Cupine oder Cupin-ähnliche Proteine

Neueste Erkenntnisse deuten auf bakterielle (*Pseudomonas sp.*) *R*-selektive HNLs aus einer weiteren (fünften) Superfamilie hin. Diese HNLs zeigen eine hohe Aminosäuresequenzähnlichkeit zu Proteinen der Cupin (oder Cupin-ähnliche) Superfamilie, wurden jedoch noch nicht weitergehend charakterisiert oder in der Literatur beschrieben.^[89]

1.3. HNLs als Biokatalysatoren zur enantioselektiven Synthese von Cyanhydrinen

Hydroxynitril-Lyasen sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur enantioselektiven C-C-Bindungsknüpfung, zur Bildung chiraler Cyanhydrine, wichtige Biokatalysatoren auch für den industriellen Einsatz. Chirale Cyanhydrine dienen dabei als Bausteine zur Synthese von pharmazeutischen, agrochemischen und biologisch aktiven Produkten.^[16, 17, 90] Als Intermediate werden sowohl (*S*)- als auch (*R*)-Cyanhydrine benötigt. Am Beispiel der *S*-selektiven *HbHNL* kann ihr erfolgreicher Einsatz im industriellen Maßstab zur Synthese von (*S*)-3-Phenoxybenzaldehydcyanhydrin, einer Vorstufe eines synthetisch erzeugten Insektizids (Pyrethroid), genannt werden. Dieser Prozess wird von dem Unternehmen Dutch State Mines (DSM, Niederlanden) mit 10 t pro Jahr durchgeführt. Entsprechend wird zur Herstellung von (*R*)-2-Chlormandelsäurenitril als Intermediat zur Synthese des Antithrombosemittels (*R*)-2-Chlormandelsäure die *R*-selektive *PaHNL*, ebenfalls von dem Unternehmen DSM, genutzt.^[17, 91]

1.3.1. Cyanhydrine als chirale Bausteine

Chirale Cyanhydrine sind aufgrund ihrer funktionellen Gruppen wertvolle Bausteine für Folgereaktionen. Dabei werden in erster Linie die Cyanogruppe oder Hydroxylgruppe modifiziert. Jedoch können auch das chirale Kohlenstoffatom oder die aromatischen bzw. aliphatischen Reste verändert werden, wie am Beispiel der ungesättigte Cyanhydrine gezeigt werden kann.

Durch Modifikation der Cyanogruppe eines Cyanhydrins können α -Hydroxyaldehyde, α -Hydroxsäuren oder β -Aminoalkohole gebildet werden.^[16] Wird die Hydroxylgruppe des Cyanhydrins verändert, so werden α -Aminonitrile, α -Aminosäuren und Aziridine zugänglich (Abb. 15).^[92, 93]

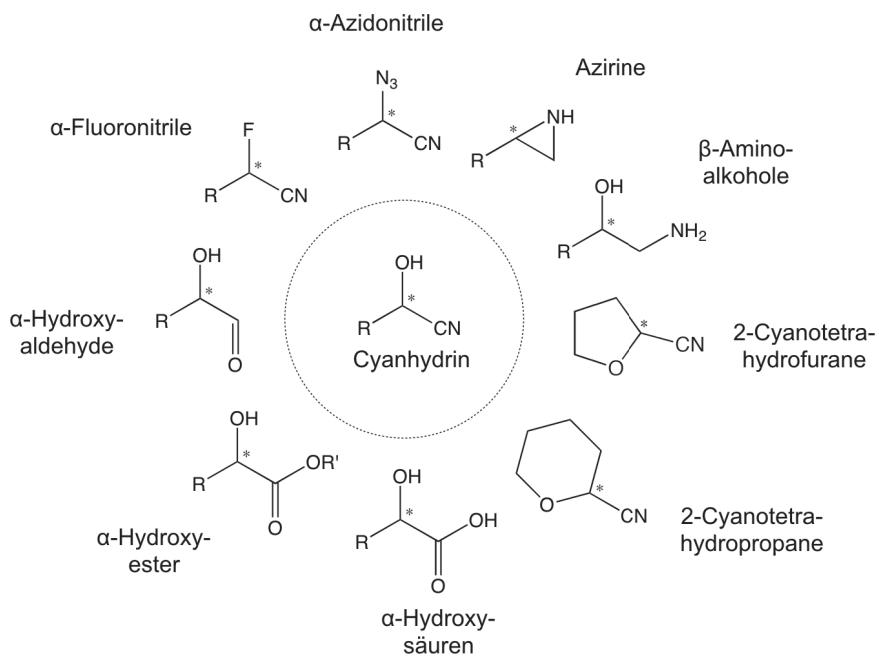


Abb. 15: Wichtige Folgeprodukte ausgehend von chiralen Cyanhydrinen. Abbildung modifiziert nach Dadashipour.^[16]

Um einen hohen Enantiomerenüberschuss („enantiomeric excess“, ee) bei der biokatalytischen Reaktion zu erreichen, müssen die Reaktionsparameter dem jeweiligen Prozess angepasst werden. Dieser Aspekt wird im Folgenden näher beleuchtet.

1.3.2. Reaktionsbedingungen der biokatalytischen Synthese enantiomerenreiner Cyanhydrine

Der Einsatz von HNLs zur stereoselektiven Synthese von Cyanhydrinen erfordert Reaktionsbedingungen, bei denen die spontane (nicht-katalysierte) racemische Cyanhydrinbildung unterbunden wird. Diese unselektive Produktbildung wird insbesondere durch den pH-Wert, die Temperatur und den Wassergehalt des Reaktionsmediums beeinflusst und stellt ein besonderes Problem in der chiralen Cyanhydrin-Synthese dar. Liegt der pH-Wert oberhalb von pH 5,0 oder die Temperatur des Reaktionsmediums oberhalb von 20 °C, so wird diese nicht-selektive Nebenreaktion im wässrigen Milieu stark begünstigt.^[63] Dies ist in Abb. 16 beispielhaft für die MeHNL als Funktion des pH-Wertes gezeigt. Dabei wird deutlich, dass eine stereoselektive Cyanhydrinbildung durch Enzymkatalyse nur im sauren pH-Bereich möglich ist, während die racemische Produktbildung oberhalb von pH 5 exponentiell zunimmt, sodass der ee des gebildeten Produkts mit steigendem pH-Wert drastisch sinkt. Die Geschwindigkeit der racemischen Produktbildung in Abhängigkeit vom pH-Wert hängt jedoch stark von der eingesetzten Carbonylverbindung ab und muss jeweils bestimmt werden. In einzelnen Fällen gelingt dann sogar eine enantioselektive Umsetzung mit HNLs bei pH 6.^[94] Eine wichtige Voraussetzung für die enzymatische Cyanhydrinsynthese in wässrigen oder wässrig organischen Reaktionssystemen ist aber grundsätzlich eine hinreichende Enzym-Stabilität und Aktivität im sauren pH-Bereich.

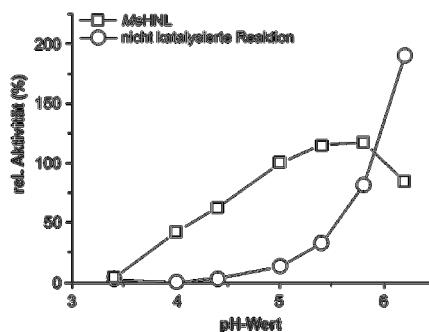


Abb. 16: Gegenüberstellung der stereoselektiven MeHNL-katalysierten (□) und der racemischen Substratumsetzung (○) von Benzaldehyd und HCN zu Mandelsäurenitril. Mit steigendem pH-Wert nimmt die nicht-katalysierte Produktbildung im wässrigen Milieu rapide zu. Modifiziert nach von Langermann.^[95]

Aufgrund der Variablen, die eine erfolgreiche biokatalytische Synthese mit hohen Enantiomerenüberschüssen zulassen, wurden bereits zahlreiche Reaktionssysteme beschrieben. Rein wässrige Reaktionssysteme (pH 3 - 4,5) erwiesen sich insbesondere bei der Umsetzung aromatischer Carbonylverbindungen aufgrund der geringen Löslichkeit der Substrate und Produkte als problematisch. Das Löslichkeitsproblem kann hingegen in reinen organischen Lösungsmitteln umgangen werden. Abgesehen davon haben solche Reaktionssysteme mit sehr geringem Wassergehalt den Vorteil, dass die nicht-selektive Nebenreaktion nahezu vollständig unterdrückt wird, wie z.B. die Synthese von (S)-2-hydroxy-4-phenylbutannitril, katalysiert durch die *HbHNL*, zeigt.^[96] Zudem ist die Produktaufarbeitung aus organischen Lösungsmitteln sehr einfach durch Evaporation des Lösungsmittels möglich.^[95] Von Nachteil ist jedoch, dass HNLs in organischen Lösungsmitteln oft instabil sind oder präzipitieren, wodurch ihre katalytische Aktivität reduziert wird.^[97, 98] Die Nutzung der Enzyme in solchen Reaktionssystemen erfordert daher zumeist die Stabilisierung mittels Immobilisierung.^[95, 99, 100] Einen erfolgreicher Kompromiss zwischen dem rein wässrigen und rein organischen Reaktionsmedium stellt ein stark durchmisches wässrig-organisches Zweiphasensystem dar, in dem das Enzym in gelöster Form in der sauren wässrigen Phase und das Substrat mit hoher Konzentration in einem nicht Wasser-mischbaren organischen Lösungsmittel (z.B. Diisopropylether oder Methyl-*tert.*-butylether) vorliegt. Durch die starke Durchmischung tritt das Substrat rasch bis zu seiner Löslichkeitsgrenze in die wässrige Phase über, wird dort durch die HNL umgesetzt und das gebildete Cyanhydrin löst sich anschließend wieder in der organischen Phase (Abb. 17). Dieses Reaktionssystem wird für industrielle Prozesse bevorzugt.^[101, 102]

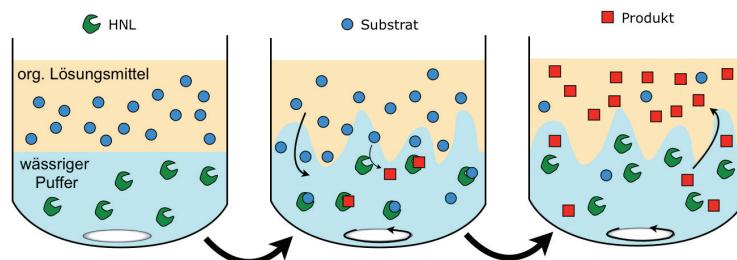


Abb. 17: Schematische Darstellung eines organisch-wässrigen Zweiphasensystems. Zu Beginn ist das schlecht wasserlösliche Substrat (blaue Kreise) im organischen Lösungsmittel (orange) und das Enzym (HNL, grün) in der wässrigen Phase gelöst. Durch starke Vermischung tritt das Substrat in die wässrige Phase über und wird dort enzymatisch umgesetzt. Das gebildete Produkt (rot) tritt wieder in die organische Phase über, da es dort löslicher ist.

Die Realisierung und Optimierung eines Reaktionssystems zur enzymatischen Cyanhydrinsynthese ist im Labormaßstab kein großes Problem, da der gesamte Versuchsablauf in geschlossenen Reaktionssystemen im Abzug durchgeführt werden kann. Problematisch ist jedoch die Anpassung der Prozesse an industrielle Maßstäbe, bei denen aufgrund der großen Blausäuremengen aufwändige Genehmigungsverfahren durchlaufen werden müssen.^[103] Die Verwendung von Satzreaktoren erwies sich dabei als der sicherste und praktikabelste Weg.^[104] Dabei wird aus Kostengründen vorzugsweise freie Blausäure eingesetzt. Alternativ kommen auch weniger toxische Cyanidquellen, wie Acetoncyanhydrin, Cyanformiat oder Trimethylsilylcyanid zum Einsatz.^[17]

Für die Synthese von Cyanhydrinen im industriellen Maßstab werden zumeist (nicht immobilisierte) teilgereinigte HNLs (bis ca. 65 % Enzymgehalt) verwendet, die nach der Reaktion entsorgt werden, wie das Beispiel der PaHNL zur Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril oder (*R*)-2-Chlormandelsäurenitril zeigt.^[17, 101] Bei einem industriellen Prozess muss kontinuierlich ausreichend Enzym zur Verfügung stehen. So werden beispielsweise durch den Einsatz von 11 mg PaHNL 6 g (*R*)-Mandelsäurenitril synthetisiert. Bei einem Produktionsvolumen von 400 g^{-d} werden ca. 70 mg teilgereinigte PaHNL täglich benötigt.^[17, 101]

1.3.3. Grundvoraussetzungen von HNLs für die enantioselektive Synthese von Cyanhydrinen im technischen Maßstab

Um eine ausreichende Verfügbarkeit der HNLs für den technischen Einsatz zu gewährleisten (Kapitel 1.2.3), werden sie optimalerweise mikrobiell erzeugt. Gute Beispiele hierfür sind die HNLs aus *Manihot esculenta*, *Hevea brasiliensis* und *Prunus amygdalus*, welche entweder prokaryotisch oder in Hefen im großen Maßstab hergestellt werden können.^[55, 105-107] Auch die HNL aus *Arabidopsis thaliana* kann problemlos mit guten Ausbeuten in *Escherichia coli* produziert werden und zeigt intrazellulär oder als lyophilisiertes gereinigtes Enzym eine gute Lagerfähigkeit. Jedoch war ihr Einsatz für die enantioselektive Synthese von Cyanhydrinen im wässrig-organischen Zweiphasensystem zu Beginn dieser Arbeit nicht möglich, da die AtHNL im wässrigen Medium unterhalb von 20 °C bei pH ≤ 5,0 keine ausreichende Enzymaktivität und Stabilität aufweist und der Einfluss von

organischen Lösungsmitteln nicht untersucht war.^[74, 86] Das Enzym sollte für den Einsatz im wässrig-organischen Zweiphasensystem eine ausreichende Toleranz gegenüber mindestens einem organischen Lösungsmittel aufweisen, da dieses für die Steigerung der Substratlöslichkeit im Reaktionsmedium notwendig ist.

Die S-selektiven struktur-analogen HNLs *MeHNL* und *HbHNL* zeigen eine hohe Stabilität gegenüber niedrigen pH-Werten, dem Einfluss von verschiedenen organischen Lösungsmitteln und sind auch bei niedrigen Temperaturen aktiv. Ihr erfolgreicher Einsatz sowohl in Puffer-gesättigten einphasigen organischen Lösungsmitteln, als auch in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen konnte bereits in vielen Beispielen gezeigt werden.^[86, 96, 108-111]

Auch die R-selektive HNL aus *Prunus amygdalus* zeigt als Pflanzenisolat eine Toleranz gegenüber verschiedenen organischen Lösungsmitteln und eine signifikante Enzymaktivität ab pH 2,5. Mittels heterologer Expression in *Pichia pastoris* und molekularer Modifikation konnte die *PaHNL* zudem bei niedrigen pH-Werten (ab pH 2,5) deutlich stabilisiert werden.^[55, 96]

1.4. Optimierung von HNLs für den technischen Einsatz

Technische Prozesse stellen durch die Verwendung niedriger pH-Werte, organischer Lösungsmittel, hoher Substrat- und Produktkonzentrationen, oft hohe Belastungen durch Röhren und Grenzflächenbildung, besondere Anforderungen insbesondere an die Stabilität von Enzymen.

Im Folgenden werden Konzepte zur Optimierung von HNLs durch Enzymimmobilisierung und mittels Enzymdesign kurz beschrieben.

1.4.1. Stabilisierung mittels Immobilisierung

Die Enzym-Immobilisierung steigert einerseits die Enzymstabilität und ermöglicht andererseits ein einfaches Abtrennen der Enzyme nach Beendigung der Reaktion (Filtration) und somit die Wiederverwendung des Biokatalysators. Nachteilig ist allerdings, der oftmals mit der Immobilisierung partielle Aktivitätsverlust der Enzyme. HNLs werden hauptsächlich für die Anwendung in einphasigen organischen Lösungsmitteln immobilisiert. Dies verhindert ihr Präzipitieren, welches meist zu einer

Reduktion der Enzymaktivität führt. Die Immobilisierung der HNLs kann durch drei grundlegender Methoden erfolgen: Adsorption an einen zumeist porösen Träger, kovalentes Binden an einen Träger bzw. kovalentes Quervernetzen der Enzyme sowie den Einschluss der Enzyme in einer Gelmatrix.

1.4.1.1. Adsorptive Immobilisierung

Die (schwache) adsorptive Bindung von Enzymen an einen porösen Träger ist je nach Anwendungszweck für industrielle Prozesse nur bedingt verwendbar. Dabei ist die Interaktion zwischen Träger und Enzym rein physikalisch und wird durch hydrophobe Interaktion, van-der-Waals-Kräfte und ionische Wechselwirkungen bestimmt. Diese Form der Immobilisierung wird hauptsächlich in nicht wassermischbaren organischen Lösungsmitteln verwendet, da die Enzyme in wässrigen Medien vom (zumeist) hydrophilen Träger gewaschen werden.^[112] Als Träger können sowohl nicht wasserlösliche Biopolymere wie Cellulose, Stärke, Agarose und Proteine (z.B. Albumin oder Gelatin) oder synthetische Polymere wie beispielsweise Amberlite (Rohm and Haas Co., Philadelphia, USA), als auch anorganische Träger, wie Zeolite, mesoporöse Silikate oder Kieselgur (poröse Siliziumdioxidschalen von fossilen Kieselalgen) verwendet werden. Die Immobilisierung auf Kieselgur wird häufig durchgeführt, ist kostengünstig und wurde bereits mehrfach erfolgreich für HNLs eingesetzt.^[96, 110, 113] Generell konnte bei der absorptiven Immobilisierung gezeigt werden, dass bei porösen Trägern insbesondere die Porengröße und eine auf das Enzym abgestimmte hydrophobe Wechselwirkung für eine gute Enzymbindung ausschlaggebend sind. Die Porengröße sollte so gewählt werden, dass das verwendete Enzym hinein passt und nicht außerhalb an der Trägeroberfläche bindet, da sonst nur eine geringe Beladung des Trägers möglich ist und es aufgrund der geringen Bindungsstärke leicht von der Oberfläche herunter gewaschen werden kann.^[114, 115]

Zudem ist die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Träger und Enzymoberfläche maßgeblich für die Bindungsstärke des Enzyms an den Träger und beeinflusst zudem die Flexibilität und Aktivität des Enzyms.^[116, 117] So konnte bei der adsorptiven Bindung von Lipasen an einen hydrophoben Träger (Octyl-Agarose) eine beachtliche Steigerung der Enzymaktivität (20-fach) in wässrigen Lösungen erreicht

werden.^[118] Die Aktivitätssteigerung wird durch die Immobilisierung einer hydrophoben Deckelstruktur (*Lid*) an den Träger verursacht, da diese in einer hydrophilen Umgebung ansonsten den Eingang des aktiven Zentrums verdeckt. Die Öffnung des Deckels (*open lid*) macht das aktive Zentrum somit für Substrate einfacher zugänglich.

Zur Steigerung der Wechselwirkung zwischen Enzym und Träger kann die Trägeroberfläche mit organischen Bindemolekülen funktionalisiert werden, welche sowohl die Porengröße als auch die Hydrophobizität beeinflussen (z.B. Octyltrimthylsilane oder 3-Aminotrimethoxysilane). Mittels dieser Oberflächenfunktionalisierung konnten z.B. eine höhere Enzymsbeladungen des Trägers und eine Reduktion des Ausblutens von Enzym ins Reaktionsmedium bewirkt werden.^[119, 120] So bewirkte die Funktionalisierung eines mesoporen Silicats (SBA-15) mittels 3-Aminopropyltriethoxysilan eine 26 % höhere Enzymsbeladung des Trägers mit einer Penicillin-Acylase.^[121] Auch das Ausbluten von Pepsin wurde durch die Verringerung des Porendurchmessers erreicht.^[120]

1.4.1.2. Kovalente Immobilisierung

Die feste kovalente Bindung von Enzymen an einen Träger ist eine irreversible Form der Enzymimmobilisierung, die selbst industriellen Prozessen standhält. Durch die Bildung kovalenter Bindungen zwischen Enzym und Träger ist eine signifikante Erhöhung der Enzymstabilität gegenüber nicht optimalen pH-Werten und Temperaturen möglich.^[122-124] Jedoch ist diese Stabilitätserhöhung zumeist mit einer deutlichen Verringerung der Enzymaktivität, bedingt durch den Verlust der Enzymflexibilität und die Modifizierung katalytischer Reste, verbunden. Des Weiteren kann der mitunter kostenintensive Träger nach der Inaktivierung der gebundenen Enzyme nicht wiederverwendet werden.^[125] Als Träger werden sowohl synthetische Polymere wie Eupergrit® C (Röhm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Deutschland), Sepabeads® (Resindion S.l.r., Milan, Italien) oder mesoporöse Festschäume, als auch kostengünstige Träger wie beispielsweise aminierte poröse Silikate verwendet. Die kovalente Bindung von Enzymen geschieht durch das Quervernetzen der Aminogruppen auf dem Träger mit den an der Oberfläche von Enzymen befindlichen Aminogruppen mittels eines bifunktionalen Reagenzes (z.B. Glutardialdehyd). Somit

wird das Verwenden von Trägern mit großen Poren, die eine geringere Diffusionsbarriere für die Substrate und Produkte darstellen, ermöglicht.^[126] In jedem Fall bewirkt die Verwendung eines Trägers das Einbringen von mehr inaktivem Material als aktivem Enzym in das Reaktionsmedium.

Aus diesem Grund wurde dieträgerfreie Immobilisierung durch die direkte Quervernetzung von Enzymen entwickelt. Durch Zugabe von Glutardialdehyd werden Aminogruppen der Enzymoberflächen miteinander quervernetzt. Dabei führt die Quervernetzung von gelösten Enzymen, sogenannten CLEs (*Cross-linked enzymes*), zu starkem Aktivitätsverlust und schlechter Reproduzierbarkeit.^[127]

Ursprünglich mit dem Ziel der Stabilisierung von kristallinen Enzymen zur Untersuchung ihrer Röntgenstruktur wurden so genannte CLECs (*Cross-linked enzyme crystals*) entwickelt. Diese weisen neben ihrer hohen Thermostabilität und Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln ein beachtliches Maß an Enzymaktivität auf und wurden in den 1990er Jahren als industrieller Biokatalysator verwendet.^[128] Zwar sind CLECs mit sehr reinen Enzymen gut reproduzierbar, doch ist ihre Herstellung sehr komplex und erfordert aufwendige Kristallisierungsstudien.^[129] Einfacher ist die Erzeugung von CLEAs (*Cross-linked enzyme aggregates*). Hierbei werden gelöste Enzyme durch Zugabe eines Fällungsmittels (gesättigte Salzlösung, organisches Lösungsmittel oder Säuren) präzipitiert und anschließend quervernetzt (z.B. durch Glutardialdehyd).^[130] CLEAs weisen eine vergleichbare Stabilität und Aktivität zu CLECs auf. Sie sind jedoch auch mit nur teilgereinigten Enzymen herstellbar und somit einfacher, schneller und kostengünstiger zu produzieren. Die erforderlichen initialen Studien zur Präzipitierung und Quervernetzung der Enzyme sind aber ebenfalls komplex und zeitaufwendig.^[131] Durch die starke Quervernetzung der Enzyme kommt es im Regelfall zu einem beträchtlichen Aktivitätsverlust ($\geq 50\%$). Dieser Aktivitätsverlust wird häufig durch den Gewinn an Enzymstabilität und Wiederverwendbarkeit kompensiert.^[132, 133] In einzelnen Fällen konnte auch eine Steigerung der Enzymaktivität bei CLEAs in organischen Lösungsmitteln gegenüber dem nicht immobilisierten Enzym unter gleichen Reaktionsbedingungen beobachtet werden.^[134, 135]

Auch verschiedene HNLs wurden erfolgreich als CLEAs immobilisiert. Sie verloren zwar einen Großteil ihrer Enzymaktivität, zeichneten sich jedoch durch eine höhere Stabilität aus.^[132, 133, 136] Es konnte gezeigt werden, dass HNL-CLEAs auch in

trockenen organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden können, da sie ein hohes Maß an Feuchtigkeit enthalten, die für die katalytische Aktivität der HNL wichtig ist.^[111]

1.4.1.3. Immobilisierung durch Einschluss

Der Einschluss von Enzymen erfolgt häufig in Solgelen auf Siliciumalkoxidbasis (Si(OR)_4 oder RSi(OR)_3). Diese Methode wurde 1990 von D. Avnir *et al.* durch den Einschluss einer alkalischen Phosphatase in eine Polymermatrix aus Tetraethoxysilan (TEOS, $\text{Si(OCH}_2\text{CH}_3\text{)}_4$) etabliert.^[137] Der Vorteil dieser Solgele ist, dass sie individuell auf das zu immobilisierende Enzym z.B. bezüglich des Wassergehalts, pH-Werts, Hydrophobizität und der Ausformung ihrer Netzstruktur angepasst werden können.^[138] Das Solgel kann nach Abschluss des Gelierungsprozesses feucht als Aquagel (oder *wet gel*) gelagert oder getrocknet werden.^[138] Je nach verwendetem Polymer kann die Porenstruktur des Solgels beim Trocknungsprozess unter Vakuum - verursacht durch Kapillarwirkung - zu einem so genannten Xerogel schrumpfen, wodurch z.B. eingeschlossene Enzyme negativ beeinflusst werden. Ein Schrumpfen der Poren kann durch die Geltrocknung in einem superkritischen Medium (z.B. superkritisches CO_2) verhindert werden. Es entsteht ein so genanntes Aerogel.^[139] Einfacher ist jedoch die Verwendung einer Mischung von Si(OR)_4 (z.B. Tetraethoxysilane) und RSi(OR)_3 (z.B. Methyltrimethoxysilane), die zu einer belastbareren Poren- bzw. Netzstruktur führt und beim Trocknungsprozess unter Vakuum ein strukturstabiles Ambigel bildet.^[138] Je nach Trocknungsgrad des Gels sind die in den Porenstrukturen eingeschlossenen Enzyme von Pufferlösung umgeben, was ihre Aktivität und Stabilität positiv beeinflussen kann (Abb. 18).^[140]

Beim Einsatz Solgel-immobilisierter Enzyme in einphasigen organischen Lösungsmitteln können die Substrate problemlos durch die Gelmatrix diffundieren und von den eingeschlossenen Enzymen sehr schnell umgesetzt werden. Solgel-immobilisierte Lipasen zeigten beispielsweise eine Steigerung der Aktivität um das 10-Fache im Vergleich zum freien Enzym unter gleichen Reaktionsbedingungen.^[141, 142]

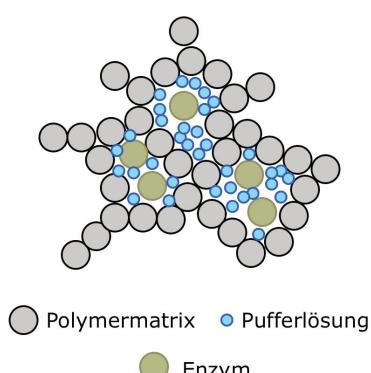


Abb. 18: Schematische Darstellung der Solgel Immobilisierung von Enzymen (Hydrogel). Das Enzym liegt in seiner gelösten Form in einer Siliciumalkoxid-Polymermatrix vor. Modifiziert nach Pierre.^[138]

Auch die *HbHNL* wurde bereits in einem Solgel immobilisiert, wobei sie durch die Bildung von Methanol beim Gelierungsprozess jedoch schnell inaktiviert wurde. Durch das Evaporieren des Methanols gelang die Immobilisierung des aktiven Enzyms, das zur Synthese verschiedener (S)-Cyanhydrine in einem einphasigem organischen Lösungsmittel (Diisopropylether) eingesetzt wurde.^[140]

Trotz der Vorteile ist jede Enzymimmobilisierung - abgesehen von der Reinigung - mit weiteren Präparationsschritten verbunden, um das Enzym auf oder in den Träger zu bringen. Um diese mitunter zeit- und kostenintensiven Schritte zu umgehen, kann auch versucht werden, eine Ganzzellbiotransformation ohne das vorherige Reinigen des Enzyms durchzuführen oder, falls dies nicht möglich ist, das Enzym molekularbiologisch an den industriellen Prozess anzupassen.

1.4.2. Ganzzellbiokatalyse

Bei der Ganzzellbiokatalyse wird die kosten- und zeitintensive Reinigung des mikrobiell exprimierten Enzyms umgangen und die Zellen der Expressionskultur als Biokatalysator in die Reaktion eingesetzt. Vorteilhaft ist die oftmals gesteigerte Stabilität der Enzyme im Cytoplasma der Zelle.^[143] Zudem liegt das exprimierte Enzym immobilisiert in der Zelle vor, sodass diese nach der Verwendung vom Reaktionsmedium, durch Zentrifugation oder bei der Verwendung eines wässrig-organischen Zweiphasensystems durch Separation der Phasen getrennt werden

kann. Dennoch muss das Substrat die Zellwand passieren, wodurch es zu einer Minderung der katalytischen Aktivität ganzer Zellen im Vergleich zum isolierten Enzym kommen kann. Dem kann durch eine gezielte Permeabilisierung der Zellwand entgegen gewirkt werden.^[144] Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Zellwandintegrität erhalten bleibt und lediglich niedermolekulare Substrate passieren können, um den Produktaufarbeitungsprozess zu vereinfachen.

Teilweise kann es bei der Ganzzellbiokatalyse zur Bildung von ungewollten Nebenprodukten bedingt durch Wirtsenzyme der Expressionskultur kommen. Sind diese Nebenprodukte analytisch identifizierbar, so können sie entweder durch eine Modifikation des Wirtsmetabolismus oder Verwendung von gereinigten Enzymen vermieden werden.

Eine Beschädigung der Zellwand, z.B. durch mechanische Einwirkung oder zu starke Permeabilisierung durch organische Lösungsmittel, kann mikroskopisch oder bei Verwendung fluoreszierender Proteine photometrisch nachgewiesen werden.^[145]

Die enantioselektive Synthese von Mandelsäurenitril und verschiedenen 3,4-substituierten Cyanhydrinen mittels Ganzzellbiokatalyse wurde Mitte der 1990er durch die Verwendung von entfettetem Pflanzenmehl der Mandel (*PaHNL*) und geblichemem Mehl aus Hirseskeimlingen in mit Puffer versetztem Diisopropylether untersucht. Hierbei konnten zumeist hohe Enantiomerenüberschüsse der gebildeten Cyanhydrate (*ee* > 90 %) erreicht werden, die Substratumsatzung verlief jedoch sehr langsam (14 – 528 h). Aus diesem Grund hat sich diese Methode nicht im industriellen Prozess etabliert.^[146, 147] Im Gegensatz zu Pflanzenmehlen konnten rekombinante *Escherichia coli* Zellen mit *HbHNL* erfolgreich für die industrielle Synthese von (S)-3-Phenoxybenzaldehydcyanhydrin etabliert werden (DSM, 10 t pro Jahr, *ee* ≥ 98 %). Die *E. coli*-Zellen werden dabei in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem (Pufferlösung und Methyl *tert.* Butylether) eingesetzt und können mehrfach wiederverwendet werden.^[17, 148] Die Verwendung ganzer Zellen könnte eine Anwendungsmöglichkeit auch für *AtHNL* darstellen, da das Zellmilieu die *AtHNL* stabilisieren könnte.

Weitergehende Optimierungen von HNLs, zur Steigerung katalytischen Aktivität beim Umsatz von nicht bevorzugten Substraten oder zur Stabilisierung, wurden bereits durch rationales Enzymdesign oder gerichtete Evolution erreicht.

1.4.3. Enzymoptimierung durch Proteindesign

Durch Modifikation der Aminosäuresequenz können Enzyme auf verschiedene Weise an industrielle Prozesse angepasst werden. So können sie zum einen mit typischen Sequenz-Tags N- oder C-terminal markiert werden, beispielsweise um sie nach der heterologen Expression ins Reaktionsmedium zu sekretieren, was die Enzymisolierung vereinfacht^[149, 150] oder sie können posttranslational modifiziert werden.^[151] Sie können auch mit typischen Affinitäts-Sequenzen wie dem Poly-His-Tag markiert werden, um eine Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie nach der Expression zu ermöglichen.^[152] Abgesehen davon gibt es mittlerweile zahllose Beispiele wie durch den zufälligen oder gezielten Austausch von Aminosäuren die Enzymeigenschaften an technische Prozesse angepasst werden können.^[10, 153, 154] Eine besondere Herausforderung stellt beim gezielten Enzymdesign die Stabilisierung von Enzymen dar, da sich Stabilitätsfaktoren meist nicht an einzelnen Aminosäureseitenketten festmachen lassen, die dann modifiziert werden können. In solchen Fällen liefert ein ungezielter Austausch von Aminosäuren durch gerichtete Evolution meist bessere Ergebnisse.^[155] Im Folgenden werden verschiedene Beispiele für die Optimierung von HNLs an industrielle Prozesse näher beschrieben.

1.4.3.1. Optimierung der *PaHNL* für den industriellen Einsatz

Um die aufwändige Reinigung der *PaHNL* aus Pflanzenextrakten der Mandel zu vermeiden, wurde das *Pa_hnl5* Gen aus *P. amygdalus* heterolog in *Pichia pastoris* exprimiert. Die pflanzliche Sekretionssequenz erlaubt die Sekretion der *PaHNL5* in das Expressionsmedium (250 mg pro Liter Expressionskultur). Das rekombinante Enzym zeigt eine zweifach höhere Enzymaktivität (295 ± 30 U/mg) und eine 26,5-fach gesteigerte pH-Stabilität bei pH 2,5 ($\tau_{1/2} = 530$ min) im Vergleich zum aus Pflanzenextrakten gereinigten Enzym auf. Durch den Austausch der ersten Aminosäure der *PaHNL5* Leu1Gln und den Austausch der pflanzlichen Sekretionssequenz gegen die Sekretionssequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde darüber hinaus eine 4,5-fache Steigerung der heterologen Produktion erreicht (1 g *PaHNL* pro Liter Expressionskultur).^[55]

Die *PaHNL5* (sowie der *PaHNL* Wildtyp) zeigt allerdings eine schlechte Akzeptanz gegenüber dem Substrat 2-Chlorbenzaldehyd zur Synthese von (*R*)-2-Chlormandelsäurenitril, einem wichtigen Intermediat eines oralen Gerinnungshemmers (Clopidogrel). Anhand von *Docking*-Untersuchungen von 2-Chlorbenzaldehyd in der Kristallstruktur des Enzyms konnte Ala-111 identifiziert werden, welches die Substratbindung sterisch behinderte. Durch den Austausch gegen die kleinere Aminosäure Glycin (Ala111Gly) konnte das Substrat korrekt im aktiven Zentrum binden und eine Versechsfachung des Umsatzes erreicht werden.^[55] Damit wurde der industriellen Einsatz *PaHNL5* (Leu1Gln, Ala111Gly) zur Synthese von (*R*)-2-Chlormandelsäurenitril möglich. Dieser Prozess wird von dem Unternehmen DSM mit 10 t pro Jahr durchgeführt.^[17]

Darüberhinaus wird die *PaHNL5* (Leu1Gln) z.B. von DSM zur Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril eingesetzt, welches zu der korrespondierenden Säure umgesetzt wird und Einsatz als chirales Hilfsmittel bei der Racematspaltung findet.^[17, 91]

1.4.3.2. Optimierung der *HbHNL*

Die *HbHNL* wird von DSM für die Synthese von (S)-Mandelsäurenitril, (S)-Phenoxybenzaldehydcyanhydrin und (R)-2-(2-furyl)-2-hydroxyacetonitril verwendet. (S)-Phenoxybenzaldehydcyanhydrin dient als Intermediat zur Herstellung von Insektiziden und (R)-2-(2-furyl)-2-hydroxyacetonitril wird für die Synthese des antiviralen Pyridoquinoxaline verwendet.^[148, 156] Um das katalytische Potential der *HbHNL* zu erweitern, wurde ein semi-rationaler Ansatz (eine Kombination von rationalem Enzymdesign und gerichteter Evolution) angewandt, der die Synthese sterisch anspruchsvoller Carbaldehydcyanhydrine ermöglichen sollte. Ausgehend von einer *HbHNL* Variante mit erweitertem Eingang zum aktiven Zentrum, der durch den Austausch der großen Aminosäure Tryptophan-128 zu der wesentlich kleineren Aminosäure Alanin (Trp128Ala) erzeugt werden konnte, wurde ein verbesserter Umsatz für 4-Oxocyclohexancarbaldehyd zu 2-Hydroxy-(4'-oxocyclohexyl)acetonitril erreicht. Jedoch verlor die Variante größtenteils ihre Enantioselektivität (ee 10 %). Diese Variante wurde mittels gerichteter Evolution weitergehend optimiert, wodurch zwei wesentlich aktivere Varianten (W128A, His103Leu/Gln215His) entstanden. Bei dem Einsatz von $1/_{10}$ bis $1/_{20}$ der ursprünglichen Enzymkonzentration kann mit ihnen ein annähernd vollständiger Substratumsatz mit einem bis auf 90 % gesteigerten ee des gebildeten Produkts erzielt werden.

1.4.3.3. Optimierung der *MeHNL*

Die heterologe Expression der Wildtyp *MeHNL* in *E. coli* führte zur übermäßigen Bildung von fehlgefaltetem, inaktivem Enzym (*inclusion bodies*). Die Optimierung der heterologen Expression konnte sowohl durch einen rationalen Ansatz, als auch durch eine gerichtete Evolution erreicht werden. Bei dem rationalen Ansatz wurden gezielt einzelne Lysinreste an der Enzymoberfläche, die aufgrund ihrer Protonierbarkeit und hohen Flexibilität zu einer Fehlfaltung der Polypeptidkette führen können, gegen unflexible hydrophile, nicht-protonierbare Proline ausgetauscht. Der Austausch beabsichtigte ursprünglich die Steigerung der Enzymstabilität durch die Reduktion der Schiff-Basen-Bildung von Lysinen und Aldehyden (Substrate). Jedoch bewirkte der Austausch der Lysine an Position 176, 199 und 224 eine signifikant höhere *in vivo* Löslichkeit der *MeHNL* und Steigerung der katalytischen Effizienz. Durch

gerichtete Evolution führte zudem der Austausch des hydrophilen His103 zu einer besseren Löslichkeit der *MeHNL*. Bei einer Sättigungsmutagenese der *MeHNL* an Position 103 konnte gezeigt werden, dass die hydrophoben Aminosäuren Leu, Ile, Val, Cys und Met in dieser Position zu einer höheren Löslichkeit des Enzyms und hydrophile Aminosäuren (Tyr, Trp, Phe, Pro) zu einer Verringerung der Löslichkeit der *MeHNL* führen.^[107]

In der Literatur ist der Einsatz dieser *MeHNL* Varianten oder des Wildtyp Enzyms nicht beschrieben, jedoch besitzen die Unternehmen Nippon Shokubai, Mitsubishi Rayon, DSM, BASF und weitere kleine Firmen ca. 40 Patente zur Nutzung und Modifikation S- und R-selektiver HNLs, was das wachsende Interesse am Einsatz von HNLs für industrielle Prozesse verdeutlicht.^[157-164]

KAPITEL 2

2. Motivation und Zielsetzung

Hydroxynitril-Lyasen katalysieren die enantioselektive Umsetzung von Carbonylverbindungen (Aldehyde oder Ketone) und Blausäure zu chiralen Cyanhydrinen, welche als vielseitige Synthesebausteine in der pharmazeutischen und chemischen Industrie Verwendung finden.

Das Ziel dieser Arbeit war, Wege für die technische Nutzung der AtHNL als *R*-selektiven Biokatalysator für die Synthese von Cyanhydrinen zu finden. Die AtHNL wurde im Jahr 2007 bei einem sequenzbasierten Screening als erste *R*-selektive HNL mit α/β -Hydrolasefaltung identifiziert. Sie zeigt eine hohe katalytische Aktivität und ein breites Substratspektrum, was das Enzym prinzipiell für technische Anwendungen interessant macht.^[74] Diese erfolgen aber üblicherweise in wässrig-organischen Zweiphasensystemen mit niedrigem pH in der wässrigen Phase zur Unterdrückung der nicht-enzymatischen racemischen Cyanhydrinsynthese. Aufgrund der geringen Stabilität der AtHNL im sauren pH-Bereich kann das Enzym daher bisher technisch nicht genutzt werden. Alternativ kann die die nicht-enzymatische Reaktion auch durch die Senkung des Wassergehalts, z.B. durch die Verwendung reiner oder Puffer-gesättigter organischer Lösungsmittel, vermieden werden.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit durch die Verfolgung zweier unterschiedlicher Lösungsansätze untersucht werden, wie die AtHNL für eine enantioselektive Synthese von (*R*)-Cyanhydrinen genutzt werden kann.

Dabei sollte einerseits durch Variation der Reaktionsparameter (pH-Wert, Temperatur und Wassergehalt) eine Unterdrückung der nicht katalysierten racemischen Substratumssetzung und zugleich eine hohe biokatalytische Effizienz erreicht werden. Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf der Stabilisierung des Enzyms unter den jeweiligen Reaktionsbedingungen gelegt werden.

Die erste Strategie umfasste die Evaluierung der Nutzung des Enzyms in einphasigen organischen Lösungsmitteln. Zur Verbesserung der Stabilität und der

Recyclierbarkeit sollten hierzu geeignete Methoden der Immobilisierung des isolierten Enzyms und die Untersuchung der Anwendbarkeit der Ganzzellbiokatalyse untersucht werden.

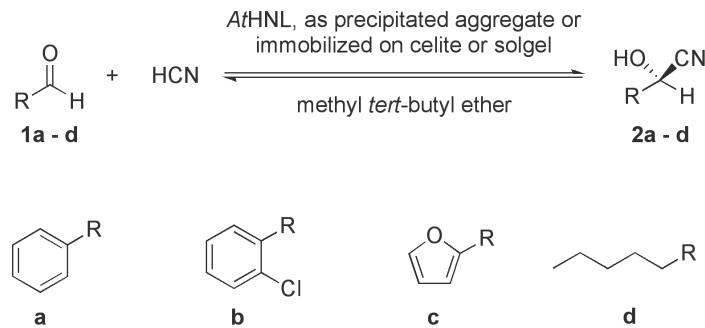
Bei dem zweiten Lösungsansatz sollte die geringe pH-Stabilität der *AtHNL* durch rationales Enzymdesign erhöht werden, sodass ihr Einsatz als gelöstes Enzym in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen ermöglicht wird. Grundlage dieser Strategie waren Ergebnisse aus vorherigen Arbeiten mit der *MeHNL* (Guterl *et al.*),^[53] die einen Zusammenhang zwischen deren höherer Stabilität und der Bildung höherer Assoziate in Lösung vermuten ließen.

KAPITEL 3

3. Publikationen

3.1. Publikation 1

Hydroxynitrile Lyase from *Arabidopsis thaliana*: Identification of Reaction Parameters for Enantiopure Cyanohydrin Synthesis by Pure and Immobilized Catalyst



D. Okrob, M. Paravidino, R. V. A. Orru,

W. Wiechert, U. Hanefeld, M. Pohl

Advanced Synthesis & Catalysis, 2011, 353: 2399-2408

DOI: 10.1002/adsc.201100199

Gedruckt mit der Genehmigung von John Wiley and Sons

License number: 2862510094098

FULL PAPERS

DOI: 10.1002/adsc.201100199

Hydroxynitrile Lyase from *Arabidopsis thaliana*: Identification of Reaction Parameters for Enantiopure Cyanohydrin Synthesis by Pure and Immobilized Catalyst

Daniel Okrob,^{a,b} Monica Paravidino,^b Romano V. A. Orru,^c Wolfgang Wiechert,^a Ulf Hanefeld,^{b,*} and Martina Pohl^{a,*}

^a Institute of Bio- and Geosciences, IBG-1: Biotechnology, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich, Germany
Fax: (+49)-2461-613870; phone: (+49)-2461-614388; e-mail: ma.pohl@fz-juelich.de

^b Laboratory of Biocatalysis and Organic Chemistry, Department of Biotechnology, Delft University of Technology, Julianalaan 136, 2628 BL Delft, The Netherlands
Fax: (+31)-15-278-1415; phone: (+31)-15-27-89304; e-mail: u.hanefeld@tudelft.nl

^c Department of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Vrije Universiteit Amsterdam, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam

Received: March 18, 2011; Revised: May 24, 2011; Published online: August 30, 2011

Abstract: The (*R*)-selective hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*) is a promising biocatalyst for the synthesis of a broad range of chiral cyanohydrins. However, the enantiomeric excess of the reaction is strongly compromised by a non-catalyzed side reaction resulting in racemic cyanohydrins besides the chiral product obtained by enzymatic catalysis. This reaction is influenced by the pH value, the temperature and the water content of the reaction medium. In aqueous media this side reaction can be suppressed at low pH (4–5) and by lowering the temperature. However both approaches are not possible with *AtHNL*, since the enzyme is rapidly inactivated below pH 5.4, which prevents its use in aqueous media or two-phasic aqueous-organic reaction systems. Alternatively the side reaction can be suppressed by lowering the water concentration in the reaction system as far as possible. This approach was successfully tested for *AtHNL* using buffer-saturated methyl *tert*-butyl ether (MTBE) as a reaction medium for the hydrocyanation of aromatic, hetero-

aromatic and aliphatic aldehydes. Here we compare the activity and stability of *AtHNL* immobilized on celite (celite-*AtHNL*) and in solgel (solgel-*AtHNL*) relative to the precipitated enzyme, which was directly used in the organic solvent. Surprisingly, *AtHNL* was activated (up to 10-fold) upon solgel immobilization, an effect that was up to now only described for solgel-immobilized lipases. In contrast to lipases, *AtHNL* is not stabilized by the solgel. Best results were obtained with *AtHNL* adsorbed on celite, which is an easy and efficient way of immobilization and shows good recyclability (>5 cycles), storability ($t_{1/2}=71$ days, 4°C) and excellent catalytic properties upon adjustment of a relative water content of 26% water per g celite-*AtHNL* as determined by thermogravimetry.

Keywords: asymmetric carboligation; cyanohydrins; enzyme catalysis; hydroxynitrile lyase; immobilization; oxynitrilase

Introduction

In organic chemistry the hydrocyanation of carbonyl compounds is an important carbon–carbon bond forming reaction. The chemical synthesis of enantio-enriched cyanohydrins as versatile intermediates for pharmaceuticals, fine chemicals and agrochemical products often requires harsh reaction conditions.^[1] For more than 100 years the production of chiral cyanohydrins is performed also using biocatalysis.^[2] Hydroxynitrile lyases (HNLs) were first identified in cyanogenic plants, where they catalyze the cleavage of

HCN from cyanohydrins during herbivore attacks as part of the plant defence system. In biocatalysis the reverse reaction is of interest, where HNLs catalyze the stereoselective formation of chiral cyanohydrins from hydrogen cyanide (HCN) and aldehydes or ketones under mild reaction conditions. Meanwhile, several studies have successfully demonstrated the potential of HNLs as industrial biocatalysts for the synthesis of enantiopure cyanohydrins.^[3]

Recently, a novel HNL from *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*) was identified. *AtHNL* is the first (*R*)-selective HNL with an α/β hydrolase fold and structurally

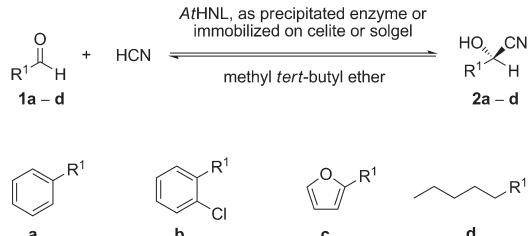
FULL PAPERS

Daniel Okrob et al.

related to the (S)-selective HNLs from *Hevea brasiliensis* (*Hb*HNL) and *Manihot esculenta* (*Me*HNL).^[4] The characterization of the broad substrate range and of key parameters, which influence the catalytic activity of *At*HNL, has recently been described.^[5] Furthermore, the crystal structure of *At*HNL was solved (pdb-code 3dqz). Whereas *At*HNL and *Me*HNL are very similar concerning substrate range and kinetic parameters, their stability especially toward weak acidic aqueous solvents is quite different and *At*HNL is rapidly deactivated below pH 5.^[5] However, the stability of HNLs toward acidic pH (≤ 4) is a prerequisite for their application in the formation of enantiopure cyanohydrins in aqueous media or aqueous-organic two-phase systems, since the non-catalyzed hydrocyanation, which results in racemic products, can efficiently be suppressed at low pH.^[6] An alternative approach to suppress this side reaction is to minimize the water concentration in the reaction system.^[6] As *At*HNL is irreversibly inactivated at pH < 5.4 within a few minutes, the pH-control of this chemical background reaction is impossible in this case. An attractive alternative to aqueous reaction media and aqueous-organic two-phase systems is the application of HNLs in monophasic organic solvents with a minimum of water to ensure HNL activity. In such microaqueous reaction systems the aromatic substrates and products are highly soluble and the spontaneous formation of racemic cyanohydrins is strongly reduced due to the low water concentration in the reaction medium.^[7] Nevertheless, the enzymatic activity and the enantiomeric excess (*ee*) of the reaction are affected by the pH of the aqueous buffer, the buffer concentration, the organic solvent, the enzyme stability and the enzyme concentration.^[6,8]

In pure organic solvents HNLs can be applied directly as precipitated aggregates or immobilized on supports. Whereas precipitated *Hb*HNL was described to be significantly inactivated in organic solvents and at high substrate concentrations,^[9] the enzyme's stability and performance benefit much from immobilization such as adsorption on mesoporous supports or entrapment in solgels. Furthermore, immobilized HNLs from *Manihot esculenta*, *Sorghum bicolor*, *Linum usitatissimum* and *Prunus amygdalus* have shown almost excellent substrate conversions and stereoselectivities, as well as improved stabilities compared to the precipitated enzyme in organic solvents.^[8a,10] Furthermore, immobilization simplifies separation of product and recycling of the biocatalyst, which can easily be achieved by for example, filtration.

Immobilization experiments with lipases, which also belong to the α/β hydrolase-superfamily have demonstrated a stabilizing and activity increasing effect by adsorption on mesoporous celite or by solgel entrapment caused by protection of the lipase from aggregation.



Scheme 1. *At*HNL-catalyzed hydrocyanation of model substrates (**1a-d**) in buffer-saturated mono-phasic methyl *tert*-butyl ether. Reactions were performed on a 1-mL scale using a solution of HCN (2 M) in MTBE with 0.5 mmol **1a-d**, respectively.

tion or denaturing effects and a “hyperactivated” structural change.^[11-13] As

In order to enable the synthetic application of *At*HNL we have investigated the hydrocyanation of benzaldehyde, 2-chlorobenzaldehyde, 2-furaldehyde and hexanal in buffer saturated mono-phasic MTBE with the direct use of precipitated *At*HNL (Scheme 1). Furthermore, we have studied these test reactions with *At*HNL adsorbed on celite and entrapped in solgels; as well as factors affecting the immobilization and the influence of the support on the enzyme's activity, stability and recyclability. Additionally, the influence of the support on the non-catalyzed racemic hydrocyanation was investigated.

Results and Discussion

Activity of Immobilized vs. Precipitated *At*HNL

Initial studies on the suitability of different organic solvents for *At*HNL-catalyzed reactions yielded buffer-saturated methyl *tert*-butyl ether (MTBE) as a preferred micro-aqueous reaction system (data not shown). Using this reaction system the enantioselective addition of HCN to benzaldehyde **1a**, 2-chlorobenzaldehyde **1b**, 2-furaldehyde **1c**, and hexanal **1d** was comparatively studied yielding optically pure cyanohydrins **2a-d** (Scheme 1). Purified *At*HNL was used either dissolved in a small volume of buffer (5 mg in 50 μ L) or immobilized, either adsorbed on celite R-633 particles (celite-*At*HNL) or entrapped in a methyltrimethoxysilane/tetramethoxysilane (MTMS/TMOS) solgel (solgel-*At*HNL).

First, purified *At*HNL (dissolved in phosphate buffer, 5 mg/50 μ L) was added to the reaction medium containing HCN and **1a**. Although *At*HNL precipitated within 3–5 min after addition to the buffer-saturated MTBE, the reaction was almost complete after 45 min. (conversion 97.9%) and **2a** was ob-

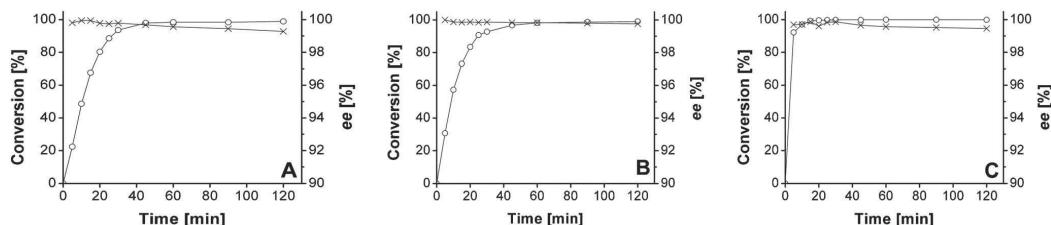
Hydroxynitrile Lyase from *Arabidopsis thaliana*: Identification of Reaction Parameters

Figure 1. The conversion (○) of benzaldehyde (**1a**) to (*R*)-mandelonitrile (**2a**) by precipitated *AtHNL* (**A**), celite-*AtHNL* (**B**) and solgel-*AtHNL* (**C**). 0.5 M **1a**, 1 mL 1.5–2 M HCN dissolved in MTBE. Conversion (○) and the enantiomeric excess (×) were determined by chiral GC (see Experimental Section).

tained with excellent enantiomeric excess (*ee*) of 99.7% [Figure 1 (**A**)]. Prolonged reaction times did not increase the yield further, but decreased the *ee* of **2a** to 99.3%. Although precipitated *AtHNL* shows a very good activity and stereoselectivity in monophasic buffer-saturated MTBE, separation of the biocatalyst by filtration and recycling was almost impossible. Therefore, *AtHNL* was immobilized on celite (celite-*AtHNL*) and in a solgel matrix (solgel-*AtHNL*), respectively.

Previous studies have demonstrated the moderate hydrophobicity of celite supports, which led to a good water transport to the adsorbed enzymes and correspondingly excellent activities inside the micro-aqueous reaction systems.^[7b,14] To determine an appropriate enzyme/support ratio, several ratios starting from 1:50 to 1:4 were tested. To obtain a measurable reaction rate as demonstrated in Figure 1 (**A**) an enzyme/support ratio of 1:4 was used. In order to compensate a potential loss of activity due to the immobilization step, in reactions with celite-*AtHNL* a 1.5-fold concentration of *AtHNL* (compared to precipitated *AtHNL*) was used. With this preparation a conversion of 96.8% of **1a** was reached in 45 min with an *ee* of 99.8% [Figure 1 (**B**)]. Prolonged reaction times (120 min) did not reduce the *ee* of the product **2a**. Thus, the application of celite-*AtHNL* increased the enantiopurity of the product **2a** although the reaction rate was slightly reduced (78%) compared to the precipitated enzyme.

Solgel-*AtHNL* containing an enzyme amount equal to the one applied with precipitated *AtHNL* [Figure 1 (**A**)] catalyzed the addition of HCN to **1a** significantly faster compared to precipitated *AtHNL* and celite-*AtHNL* and conversion of **1a** was almost complete (97%) within 10 min [Figure 1 (**C**)]. Monitoring the reaction over 120 min gave 99.9% conversion of **1a** with an *ee* of 99.5% for **2a**. As with precipitated *AtHNL* [Figure 1 (**A**)] a slight decrease of the *ee* of **2a** was observed after prolonged reaction times (99.7% after 10 min, 99.5% after 120 min) which might be due to a higher water concentration in this system compared to celite-*AtHNL* [Figure 1 (**B**)].

Due to the fast reaction rates, initial rates (<10% conversion) could not reliably be calculated. Thus, the relative enzyme activities of precipitated *AtHNL*, celite-*AtHNL* and solgel-*AtHNL* were estimated at 50% conversion of **1a** and normalized to the enzyme concentration in the reaction system. As demonstrated in Table 1 (**2a**), celite-*AtHNL* displays 78% residual activity compared to precipitated *AtHNL*, whereas the solgel-*AtHNL* preparation shows a clearly enhanced relative reaction velocity of 671%. Similar effects were also observed using **1b** or **1c** as carbonyl substrates. Whereas the conversion of 2-chlorobenzaldehyde (**1b**) to **2b** was more than 10-fold faster catalyzed by the solgel-*AtHNL* compared to precipitated *AtHNL*, this effect was much less pronounced (1.76-fold) with 2-furaldehyde (**1c**). While all aromatic products (**2a–c**) were obtained with very good stereoselectivity using all three preparations of *AtHNL*, the enantioselectivity for **2d** was impaired with both immobilized *AtHNL*-preparations. The reduced enzymatic activity of celite-*AtHNL* with respect to the conversion of substrates **1a–c** might be caused by enzyme inactivation during immobilization, reduced enzyme flexibility and diffusion limitations inside the highly loaded celite particles, as was reported previously in similar studies.^[8a,15] In contrast, the strongly

Table 1. Relative activity of precipitated *AtHNL*, celite-*AtHNL* and solgel-*AtHNL* at 50% conversion of **1a–d** to their respective chiral cyanohydrins **2a–d**.

50% Enzymatic formation of	Relative <i>AtHNL</i> activity in % ^[a]	Precipitated <i>AtHNL</i> (<i>ee</i>)	Celite- <i>AtHNL</i> (<i>ee</i>)	Solgel- <i>AtHNL</i> (<i>ee</i>)
2a (R)	100 (>99)	78 (>99)	671 (>99)	
2b (R)	100 (>99)	86 (>99)	1036 (>99)	
2c (S)	100 (>99)	76 (>98)	176 (>99)	
2d (R)	100 (>95)	57 (>86)	83 (>58)	

^[a] *AtHNL* concentration was adapted in all reactions. Standard reaction rate was defined as reaction rate of 5 mg precipitated *AtHNL* by hydrocyanation of 0.5 mmol of **1a–d** to **2a–d**.

FULL PAPERS

Daniel Okrob et al.

enhanced activity observed with solgel-*AtHNL* seems not to be influenced by these factors. Similar enhanced enzyme activities upon solgel-entrapment were reported for HNLs from *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta* and *Prunus amygdalus*^[10a] and various lipases by Reetz et al.^[12a] HNLs from the α/β hydrolase superfamily (*MeHNL*, *HbHNL*) were most active and displayed an up to 8-fold enhanced conversion rate toward **1a** compared to the free enzyme in a biphasic reaction system.^[10a] However, diffusion limitations of both reaction systems differ extremely and prevented a direct comparison of the relative enzyme activities.

Our results with solgel-*AtHNL* demonstrate similar enhanced activities under identical reaction conditions as reported for lipases, which underlines the suggested protection of the enzyme from aggregation, but contradicts the “lid-opened” theory caused by the “alkyl-effect” in solgels.^[12] An alternative explanation for the activation of *AtHNL* could be that the entrapped buffer inside the solgel matrix supports a native and flexible form of the enzyme, which results in a highly active biocatalyst. Nevertheless, the local water concentration in the solgel is low enough to prevent the non-catalyzed side reaction at least in the case of the aromatic cyanohydrins **2a–c** (Table 1).

However, the concentration of aqueous buffer inside the solgel is most probably the reason why the hydrocyanation of hexanal (**1d**) yielded **2d** with an *ee* of only 58% (Table 1). As *AtHNL* prefers aromatic aldehydes, aliphatic aldehydes are only slowly converted.^[4a] As a consequence, the velocity of the non-catalyzed reaction becomes competitive to biocatalysis and the resulting stereoselectivity of the product is significantly lower. Precipitated *AtHNL* displays the highest enzymatic activity and thus the lowest non-enzymatic background reaction (95% *ee*) for the hydrocyanation of **1d** to **2d**. In contrast, the reaction rate with celite-*AtHNL* was clearly reduced to 57% relative activity and yielded only 86% *ee* for **2d**. As the solgel is assumed to contain by far the highest water content among the tested reaction systems, the very low stereoselectivity for **2d** obtained with solgel-*AtHNL* can most probably be explained therewith. In order to investigate the impact of the carrier, the non-catalyzed reaction using substrate **1d** was monitored in the presence of celite and solgel without *AtHNL* under identical reaction conditions. With pure celite 18% racemic **2d** were formed within 120 min, whereas pure solgel converted 50% of **1d** to racemic **2d** in the same time. These results clearly demonstrate a significant impact of the water concentration in the carrier on the hydrocyanation of aldehydes, which is most pronounced if the enzymatic reaction is slow. In conclusion, immobilization of *AtHNL* on celite and in solgel resulted in highly active enzyme preparations. In order to further evaluate the potential of both meth-

ods for the application in organic syntheses the recyclability and the stability of the immobilized enzyme preparations were studied.

Generally, enzyme immobilization facilitates filtration and recycling of the biocatalyst. Therefore, a sufficiently strong binding of the biocatalyst to the support under the respective reaction conditions is required. To analyze the potential leakage of active *AtHNL* from the carrier material into the reaction medium two identical samples of celite-*AtHNL* and solgel-*AtHNL* were prepared and packed into fine woven nylon mesh “tea-bags”, respectively. Such “tea-bags” allow the simple removal of the biocatalyst from the reaction medium. Subsequently, the synthesis of **2b** was followed over 60 min in four parallel reactions; in one reaction set-up the celite-*AtHNL* or solgel-*AtHNL*, respectively, was removed from the reaction medium after 8 min. But the conversion in all four reactions was monitored over 60 min. As demonstrated in Figure 2 (A) and (B), the continuous celite-

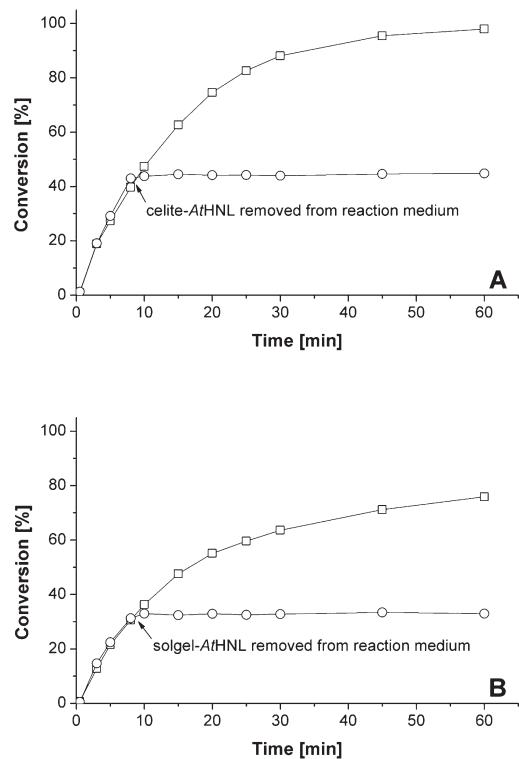


Figure 2. Test for leakage of active *AtHNL* from the celite (A) and solgel (B) support into the reaction medium (buffer saturated MTBE). Standard reaction (□) and reaction where the immobilized *AtHNL* were removed from the reaction medium (○).

AtHNL and solgel-*AtHNL* reaction displayed the expected course of conversion, whereas the aborted reactions of both, celite-*AtHNL* and solgel-*AtHNL*, stopped directly after removing the immobilized catalyst from the reaction medium. This observation demonstrates that no leakage of active catalyst occurs in either reaction systems.

Recyclability of Immobilized *AtHNL*

The same set-up using celite-*AtHNL* and solgel-*AtHNL* packed into “tea-bags” was applied to study the recyclability of the immobilized enzyme preparations. These *AtHNL* “tea-bags” were applied in five consecutive hydrocyanations of **1a**, including intermediate washing steps with pure MTBE. As demonstrated in Figure 3 (A), celite-*AtHNL* displayed excellent recyclability. A moderate decrease in enzyme activity was observed, but in all reaction cycles almost complete conversion (> 95%) was reached with a constant *ee* > 98% for **2a**. Similar recycling studies with solgel-*AtHNL* demonstrated complete conversion of **1a** to **2b** only in the first cycle, whereas a rapid loss of activity was observed in the next reaction cycles. Nevertheless, the stereoselectivity of cycles 1–3 was very good, > 98% *ee* [Figure 3 (B)].

However, the stereoselectivity was progressively reduced with every further recycling step. Efforts to reduce the inactivation rate by washing solgel-*AtHNL* with phosphate buffer, pH 6.5, instead of MTBE between each cycle resulted in improved reaction rates only for the 4th and 5th cycles. However, this was accompanied by a significant drop of *ee* (cycles 4 and 5: 82% *ee*), probably caused by the incremental deactivation of *AtHNL*, and an increased water concentration in the reaction medium [Figure 3 (C)] due to the washing steps with phosphate buffer.

To verify this hypothesis, two identical solgel-*AtHNL* samples were prepared in “tea-bags” and preincubated in MTBE for 60 and 120 min, respectively. This preincubation time is equivalent to 1 or 2 reaction cycles as described in the recycling studies. Addition of HCN to **1a** was performed after preincubation and 80% relative activity was observed for the 60 min preincubated sample, whereas only 52% residual activity was found for the 120 min preincubated sample. In conclusion, the loss of activity is similar to the 2nd and 3rd reaction cycles of Figure 3 (B/C) and is related to the enzyme inactivation caused by MTBE, which permeates into the solgel over time. Thus, *AtHNL* is not stable in solgels, which is in contrast to related studies with lipases.

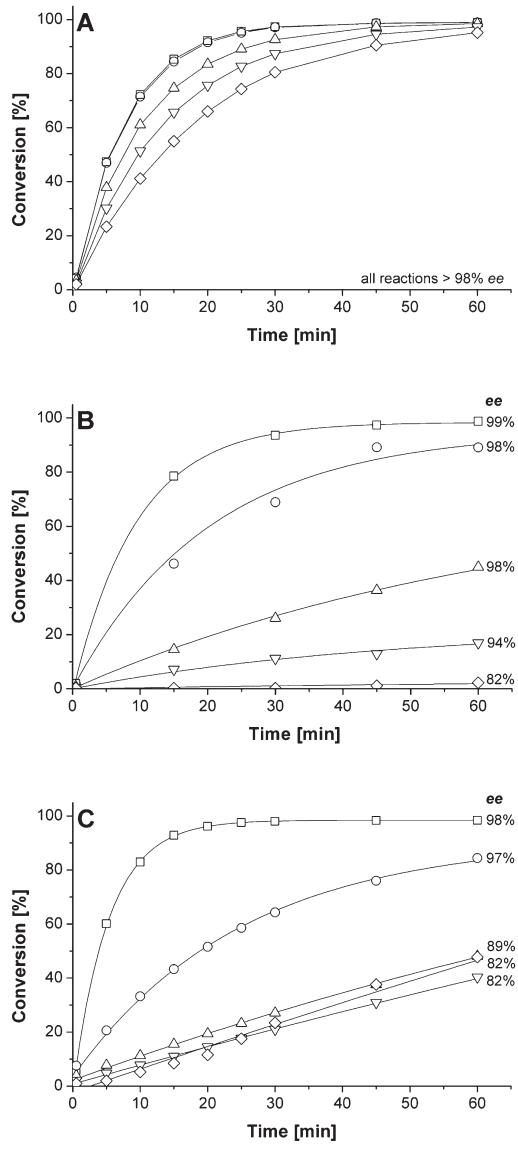


Figure 3. Recycling of celite-*AtHNL* and solgel-*AtHNL* using benzaldehyde and HCN as substrates. In (A) celite-*AtHNL* was washed with pure MTBE after each cycle. In (B) solgel-*AtHNL* was washed with MTBE and in (C) solgel-*AtHNL* was washed with 50 mM phosphate buffer pH 6.5. Cycle 1 (□), cycle 2 (○), cycle 3 (△), cycle 4 (▽), cycle 5 (◇).

Storability of Immobilized AtHNL

In order to characterize the storability of the immobilized enzyme, adequate amounts of celite-AtHNL and solgel-AtHNL were prepared and transferred into a screw cap glass vial and stored at 4°C. Over a period of 31 days equal amounts of immobilized AtHNL were withdrawn and residual activity was assayed by following the synthesis of **2a** under identical reaction conditions. The relative activity was determined by comparing the substrate conversion of **1a** to **2a** for a defined reaction time. For celite-AtHNL an unexpected doubling of enzyme activity was observed over the

first 7 days, which decreased slightly again in the following 14 days. Extrapolation of this slow inactivation process led to a theoretical half-life of 71 days [Figure 4 (A)]. The initial rise in activity observed in the first days might be related to the water concentration inside the reaction medium. As the experimental set-up was based on only one storage sample of celite-AtHNL, the frequent opening and closing of the screw cap vial during sampling might have progressively increased the water content in the celite-AtHNL preparation, which in turn might have enhanced the enzyme activity. After about 14 days celite-AtHNL particles were probably saturated by air moisture and enzyme activity reached a plateau.

In order to test this hypothesis, activities of celite-AtHNL prepared as described before [dried over silica gel; 3% (w/w) water] and of four celite-AtHNL preparations containing increasing weight percentages of water [5–26% (w/w)] were compared [Figure 4 (B)]. Thereby, the sample with the lowest water content [also used for the storage test, Figure 4 (A)] showed the lowest relative activity in the hydrocyanation of **1a**, compared to the samples with higher water concentrations. Interestingly, the observed increase of activity with increased water concentration did not lead to a decrease of enantioselectivity. This indicates a limitation of enzyme activity by a lack of water inside the reaction medium. Celite-AtHNL samples containing 10% or 26% water displayed the highest activities, whereas a water content of 26% (w/w) led to an only 3% higher activity compared to the sample containing 10% (w/w) water. This indicates that 10% (w/w) water inside celite-AtHNL is close to the minimal water amount, which is necessary for optimal enzymatic activity.

In contrast to celite-AtHNL, solgel-AtHNL displayed a clearly visible loss of activity starting from the first day of incubation at 4°C with a half-life of

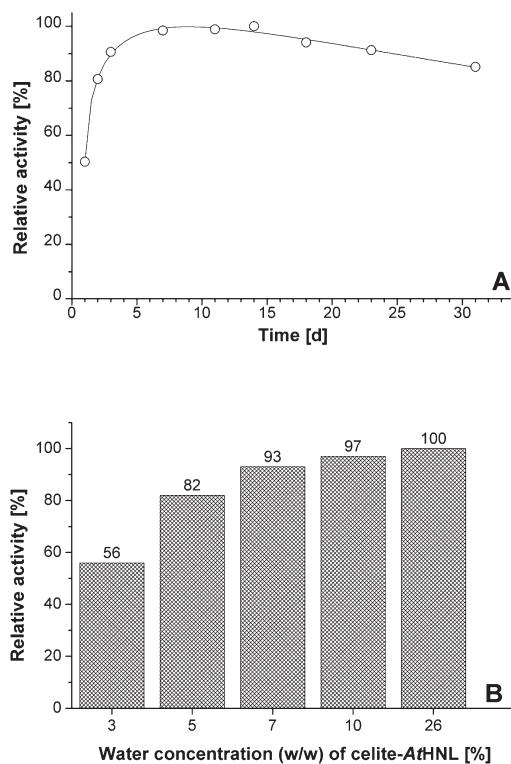


Figure 4. (A) Storability of dry celite-AtHNL at 4°C. Comparison of conversion rates of the hydrocyanation of **1a** using different samples of the same batch over 31 days. (B) Influence of weight percentage (w/w) of water on enzyme activity of celite-AtHNL. Preparations of celite-AtHNL were incubated over silica gel [3% (w/w) water] and over different saturated salt solutions [5–26% (w/w) water] for 16 h prior to activity measurements. Activity was assayed by following the hydrocyanation of **1a**. Relative enzyme activities were calculated by comparing substrate conversion at a defined point of time (all reactions yielded > 98% ee). The final water content was determined using TGA.

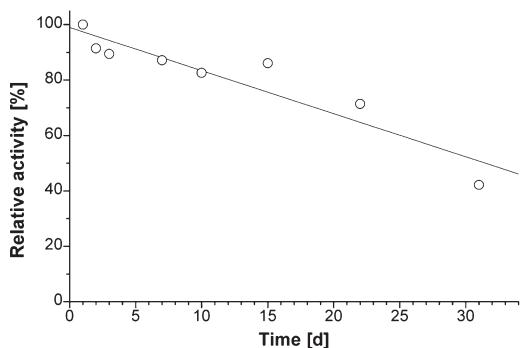


Figure 5. Storability of solgel-AtHNL at 4°C. Residual activity (velocity of hydrocyanation of **1a**) was assayed from samples taken at the indicated time points.

about 29 days (Figure 5). This rapid loss of activity seems to be due to the progressive inactivation of *AtHNL* inside the moist environment and is probably further accelerated by the methanol remaining from the gelling process of the solgel.^[10b]

Conclusions

The use of precipitated *AtHNL* for the hydrocyanation of aromatic, heteroaromatic and aliphatic aldehydes in monophasic buffer-saturated MTBE is an efficient alternative to the hydrocyanation reaction in aqueous media at low pH. Using this approach *AtHNL*, which is not stable even under weakly acidic conditions (<pH 5), can efficiently be used. The biotransformations of the tested substrates resulted in almost complete enzymatic conversion with excellent stereoselectivity. A further advantage of reaction systems with minimal water content is the efficient suppression of the non-catalyzed formation of racemic cyanohydrins and the better solubility of aromatic substrates and products. To improve the recyclability of *AtHNL*, the enzyme was entrapped in a solgel matrix and immobilized on celite.

Solgel-entrapped *AtHNL* displayed an up to 10-fold increase in activity with respect to the conversion of aromatic aldehydes; this is most probably due to the aqueous environment of the enzyme in the solgel, which results in a higher flexibility and turnover frequency. However, we observed a rapid loss of activity, probably caused by permeation of MTBE into the solgel, which led to reduced recyclability. Furthermore, the laborious preparation and poor storability make solgel-entrapped *AtHNL* less attractive.

With celite-adsorbed *AtHNL* a significant influence of the water content in the celite-*AtHNL* preparation on the enzyme activity was observed. With optimal humidity, the enzymatic activity was only slightly reduced relative to precipitated *AtHNL* (76–86%) for the aromatic substrates (Table 1). Furthermore, celite-*AtHNL* shows excellent recyclability and storability; together with the cheap, rapid and simple preparation method, these features make the celite-*AtHNL* extremely attractive for biocatalytic applications. The advantage of both non-covalent immobilization methods is the high preserved activity since no side chains essential for activity are negatively influenced. However, non-covalent immobilization methods are less stable than multipoint covalent support attachment of the enzyme. Therefore, further studies concerning covalent immobilization as well as stabilization by enzyme engineering are currently performed.

Experimental Section

CAUTION: Sodium cyanide and HCN are highly poisonous. Procedures involving sodium cyanide or HCN were performed in a well-ventilated lab-hood equipped with a calibrated HCN detector. Neutralization of HCN-containing wastes was performed with commercial bleach (14% sodium hypochlorite solution). The wastes were then stored over a large excess of bleach for disposal. For safety reasons reactions were performed in closed reaction vessels on a 1-mL scale by using a solution of HCN (2M) in MTBE with 0.5 mmol **1a–d**, respectively.

Chemicals

Celite (0.2–0.5 mm) was purchased from World Minerals Inc. (Santa Barbara, USA). Methyltrimethoxysilane (MTMS, 98%), tetramethoxysilane (TMOS, 98%), benzaldehyde (99%), furaldehyde (99%), hexanal (98%), 2-chlorobenzaldehyde (99%), dodecane (anhydrous, ≥ 99%), pyridine (99%), magnesium nitrate hexahydrate and sodium cyanide (97%) were purchased from Aldrich (St. Louis, USA). Acetic anhydride (p.a.), lithium chloride and magnesium chloride hexahydrate were purchased from Fluka (St. Louis, USA). Methyl *tert*-butyl ether (MTBE, p.a.), potassium sulfate and sodium chloride were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Dichloromethane was purchased from KMF (St. Augustin, Germany). Purified mandelonitrile was purchased from Jülich Fine Chemicals (Jülich, Germany) and stored at –20°C. Benzaldehyde, 2-chlorobenzaldehyde, 2-furaldehyde and hexanal were freshly distilled and stored under argon atmospheres.

Analytical Methods

Synthesis reactions were followed by chiral gas chromatography on a Shimadzu gas chromatograph GC-14B or on an Agilent Technologies gas chromatograph 6890N, both equipped with an FID detector and a beta-cyclodextrin column (CP-Chirasil-Dex CB 25 m × 0.25 mm). Identical GC methods as described in the literature were used.^[10b] Samples (30 µL aliquots) of the reaction were taken at defined time points, dissolved in 1.7 mL dichloromethane and derivatized by addition of 40 µL pyridine and 40 µL acetic anhydride for at least 3 h. Conversion rate and *ee* were calculated from the relative peak areas of the aldehyde and the cyanohydrin derivative.

Preparation of 2M HCN Solution in MTBE

Sodium cyanide (4.9 g, 0.1 mol) was dissolved in a magnetically stirred mixture of water (10 mL) and MTBE (25 mL) at 0°C. The biphasic system was stirred vigorously for 15 min and 30% aqueous HCl (10 mL) was added slowly. This mixture was allowed to warm slowly to room temperature (at least 25 min). The phases were separated and 7 mL MTBE were added to the organic layer. The combined organic phases were stirred and residual water was separated. This procedure was repeated with another 7 mL of MTBE. The 2M standard HCN solution was kept over citrate phosphate buffer (50 mM, pH 5.5) in the dark. Determination of HCN concentration was performed as described in literature.^[16]

FULL PAPERS

Daniel Okrob et al.

Cultivation and Purification of AtHNL

BL21(DE3) pAtHNL^[5] were cultivated using a standard fed-batch fermentation protocol.^[17] From a 15 L cultivation 1.75 kg cells were harvested, containing a total activity of 2 GU (mandelonitrile cleavage assay). 15 g BL21-(DE3)-pAtHNL cells were slowly suspended in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) at 0°C and disrupted by sonication [4×5 min at 70W/cm²] on ice with an ultrasonic processor UP200S and a sonotrode S14D (Dr. Hielscher GmbH). After ultracentrifugation (35,000×g, 4°C, 45 min), the resulting crude extract (ca. 50 mL) was desalted by gel-filtration on Sephadex G-25 [1 L bed volume, 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)]. Subsequently, anion exchange chromatography on a Q-Sepharose column (90 mL bed volume) was performed, which was equilibrated with 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5). After elution of non-bound proteins, AtHNL containing fractions were eluted with a linear NaCl gradient at 150 mM. Combined fractions with HNL activity were desalted using a Sephadex G-25 column [1 L batch volume, 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)] and subsequently lyophilized. Protein determination was performed according to Bradford (1976).^[18] Purified AtHNL (90% purity) exhibits a specific cleavage activity of 70–90 U/mg toward mandelonitrile (pH 5.8) according to the activity assay (see below).

Standard Preparation of Celite-Immobilized AtHNL

Lyophilized AtHNL was re-dissolved in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) and protein determination was performed (Bradford). Enzyme solution with an appropriate enzyme concentration (enzyme/support ratio 1:4–1:50) was added to the celite support (celite R-633). The preparation was dried for at least 12 h under vacuum (20 mbar) in a desiccator over silica gel and molecular sieves. The standard celite-AtHNL preparation contained 0.25 mg AtHNL/mg celite. Celite-AtHNL transferred into dense screw cap vials and stored at 4°C.

Preparation of Solgel-Entrapped AtHNL

For solgel entrapment MTMS/TMOS was chosen. A precursor solution was prepared under mild conditions, where alkoxy silanes were almost completely hydrolyzed by acid-mediated hydrolysis and the released methanol was removed by evaporation.^[19b]

Solgel precursor preparation: Acidic water (690 μL, pH adjusted to 2.85 by addition of HCl) was added to a mixture of MTMS (1.05 g, 7.7 mmol), TMOS (4.54 g, 28.25 mmol) and distilled water (5.2 mL) and stirred in a 50-mL round bottom flask until a homogenous solution was obtained. Formed methanol was removed using a rotary evaporator (20–30 mbar, 40°C) until the characteristic odours of MTMS, TMOS and methanol were no longer detectable. The solution was cooled to 0°C and used immediately for the entrapment of AtHNL.

Entrapment of AtHNL: Lyophilized AtHNL was dissolved in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.35) and protein concentration was adjusted to 50 mg AtHNL mL⁻¹. The same volume of cooled solgel precursor solution and AtHNL solution were mixed by magnetic stirring until the mixture gelled completely. The prepared solgel-AtHNL was

submerged in 3 equiv. 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) and aged for at least 16 h at 4°C. Afterwards, the solgel-AtHNL was filtered, washed with distilled water, ground into fine powder and stored in a dense closable screw cap vial at 4°C.

AtHNL Activity Assay (Mandelonitrile Cleavage)

The increase of the benzaldehyde concentration was measured continuously at 280 nm in quartz glass cuvettes. 700 μL citrate phosphate buffer (50 mM, pH 5.8) was mixed with 100 μL enzyme in potassium phosphate buffer (10 mM, pH 6.0) at 25°C. The reaction was started by addition of 200 μL mandelonitrile solution (67 mM mandelonitrile in citrate phosphate buffer, pH 3.5) and monitored for 1 min. Subsequently, the activity was calculated using the molar extinction coefficient of benzaldehyde ($\epsilon_{280\text{nm}} = 1376 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). One unit of HNL activity is defined as the amount of enzyme, which converts 1 μmol mandelonitrile per minute in citrate phosphate buffer, pH 5.8, 25°C. All measurements were performed at least as triplicates; References with all components except AtHNL were always determined twice.

Synthesis of Cyanohydrins by Precipitated AtHNL

5 mg AtHNL were dissolved in 50 μL potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.35). Under an argon atmosphere 1 mL 1.5–2 M HCN solution in MTBE, 0.5 mmol aldehyde, 0.1 mmol dodecane (internal standard) were mixed thoroughly by magnetic stirring. A sample for the point of origin (30 μL) was taken. Synthesis was started by addition of 50 μL AtHNL in potassium phosphate buffer (pH 6.5). Reaction was monitored by chiral GC over 60–120 min while the reaction flask was stirred at room temperature.

Synthesis of Cyanohydrins by Celite-AtHNL or Solgel-AtHNL

Celite or solgel containing 5–7.5 mg AtHNL, respectively, was transferred into the closed reaction vessel and aerated with argon. 1 mL HCN (1.5–2 M) solution in MTBE saturated with citrate phosphate buffer (pH 5.5) (see preparation of 2 M HCN solution in MTBE) and 0.1 mmol dodecane (internal standard) were added and mixed by strong magnetic stirring. The reaction was started by addition of 0.5 mmol aldehyde under continuous stirring. Aliquots were taken at defined time points and the continuous reaction was monitored by chiral GC over 60–120 min while the reaction mixture was stirred at room temperature.

Comparison of Relative Activity at 50% Substrate Conversion for Precipitated AtHNL and Immobilized AtHNL

Hydrocyanation of **1a–d** was catalyzed by precipitated AtHNL, celite-AtHNL and solgel-AtHNL, respectively, and monitored by chiral GC. The AtHNL concentration in each experiment was adjusted such that >95% substrate conversion was observed within 90 min. The time when 50% conversion was reached by 5 mg precipitated AtHNL was set as 100% activity. Relative activities of immobilized AtHNL were calculated relative to the activity with precipitated

AtHNL and considering the enzyme concentration in the respective immobilisate.

Example: When the same amount of immobilized enzyme achieved 50% substrate conversion within 1/5 of time, relative to the precipitated enzyme, its relative activity is 500%.

Recycling of Celite-*AtHNL* or Solgel-*AtHNL*

Celite or solgel containing 3–5 mg *AtHNL* was sealed into an organic solvent-resistant, fine-woven nylon mesh “tea-bag” [nylon net, pore size 0.4 µm; sealing unit: Polystar 100 GE-GS (Rische + Herfurth, Germany)] for easy removal from the reaction medium by filtration. Five consecutive hydrocyanation reactions (substrate: **1a**) were performed over 60 min with the celite-*AtHNL* “tea-bag” and the solgel-*AtHNL* “tea-bag”, respectively, as described for immobilized *AtHNL*. The “tea-bags” were washed between each reaction cycle with pure MTBE or potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.0) to remove remaining product and refresh the immobilisate. Chiral GC was used to monitor the reactions.

Investigation of Potential Leakage of Active *AtHNL* from Immobilisates

Two identical celite-*AtHNL* or solgel-*AtHNL* samples, shrink-wrapped in a nylon mesh “tea-bag”, were prepared. Each sample was used for addition of HCN to benzaldehyde **1a** as described in the synthesis protocol for immobilized *AtHNL*. In one reaction the “tea-bag” containing the immobilized *AtHNL* was inside the reaction medium for the whole reaction time while it was removed from the reaction medium after 8 min in the parallel reaction. Both samples were monitored over 60 min by chiral GC. After removal of the “tea-bag” the reaction should be aborted, when no active enzyme leaks into reaction medium.

Investigation of Storability of Celite-*AtHNL* and Solgel-*AtHNL*

One batch containing an adequate amount of celite- or solgel-immobilized *AtHNL* was prepared as described in the standard protocols and transferred into a dense closable screw cap vial. Over a period of 31 days the vial was stored at 4°C. From time to time equal amounts of immobilized *AtHNL* were taken from the batch and residual activity was assayed by measuring the hydrocyanation of **1a** under identical reaction conditions. All reactions were monitored by chiral GC. Relative activity was calculated by comparing the substrate conversion at a defined reaction time (celite-*AtHNL*: 25 min; solgel-*AtHNL*: 5 min).

Investigation of the Influence of Water Concentration (w/w) on the Activity of Celite-*AtHNL*

One adequate batch of celite-*AtHNL* was prepared as described above. The batch was split into 5 aliquots (A–E). Sample A was directly transferred into a dense closable screw cap vial and stored at 4°C. Samples B–E were transferred into four desiccators and incubated over a saturated salt solution of $Mg(NO_3)_2$ $a_w=0.54$, $MgCl_2$ $a_w=0.33$, $NaCl$ $a_w=0.75$ or K_2SO_4 $a_w=0.95$ to adjust a specific humidity (water activity a_w) in each desiccator for at least 16 h (room

temperature), before they were transferred into a dense closable screw cap vial and stored at 4°C. The activity was finally assayed by following the hydrocyanation of **1a** under identical reaction conditions. All reactions were monitored by chiral GC. Relative activities were calculated by comparing the substrate conversion at a defined reaction time (30 min). Water bound to celite-*AtHNL* was measured by thermogravimetry using a Perkin-Elmer TGA7 thermogravimetric analyzer. The measurements were performed under nitrogen atmosphere in the range of 25–625°C at a heating rate of 10°C min⁻¹. The initial sample mass was always in the range 4–12 mg.

Acknowledgements

D.O. thanks Roger A. Sheldon for establishing contact with the TU Delft – Biocatalysis & Organic Chemistry Group. This work was financial supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft in frame of the research training group “BioNoCo” GK 1166 and NWO/ACTS (project no. 053.63.304). M.P. thanks Dr. Menno Sorgedrager for fruitful discussion and the IBOS program of NWO/ACTS (project no. 053.63.304) for financial support.

References

- [1] a) M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kesseler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 806–843; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788–824; b) R. Gregory, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3649–3682; c) J. Wang, W. Wang, W. Li, X. Hu, K. Shen, C. Tan, X. Liu, X. Feng, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11642–11659; d) M. North, D. Usanov, C. Young, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 5146–5226.
- [2] a) J. Holt, U. Hanefeld, *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 15–37; b) L. Rosenthaler, *Biochem. Z.* **1908**, *14*, 238–253.
- [3] a) J. N. Andexer, J. V. Langermann, U. Kragl, M. Pohl, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 599–607; b) R. Hatti-Kaul, U. Törnvall, L. Gustafsson, P. Börjesson, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 119–124; c) D. Pollard, J. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 66–73.
- [4] a) J. Andexer, J. von Langermann, A. Mell, M. Bocola, U. Kragl, T. Eggert, M. Pohl, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8833–8835; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8679–8681; b) P. Carr, D. Ollis, *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 1137–1148.
- [5] J. Guterl, J. Andexer, T. Sehl, J. von Langermann, I. Frindi-Wosch, T. Rosenkranz, J. Fitter, K. Gruber, U. Kragl, T. Eggert, *J. Biotechnol.* **2009**, *141*, 166–173.
- [6] J. von Langermann, J. Guterl, M. Pohl, H. Wajant, U. Kragl, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2008**, *31*, 155–161.
- [7] a) G. Lin, S. Han, Z. Li, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 3531–3540; b) E. Wehtje, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, *36*, 39–46.
- [8] a) D. Costes, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 384–391; b) M. Paravidino, M. Sorgedrager, R. Orru, U. Hanefeld, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7596–7604.
- [9] D. Costes, G. Rotcenkovs, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Biocatal. Biotransform.* **2001**, *19*, 119–130.

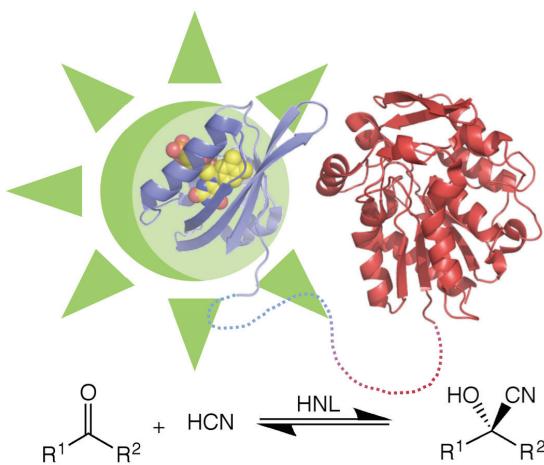
FULL PAPERS

Daniel Okrob et al.

- [10] a) F. L. Cabriol, U. Hanefeld, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1645–1654; b) L. Veum, U. Hanefeld, A. Pierre, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10419–10425; c) F. L. Cabriol, P. L. Tan, B. Tay, S. Cheng, U. Hanefeld, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2329–2338.
- [11] a) M. Hartmann, D. Jung, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 844–857; b) U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453–468.
- [12] a) M. T. Reetz, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 943–954; b) M. Reetz, P. Tielmann, W. Wiesenhöfer, W. Könen, A. Zonta, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 717–728.
- [13] a) R. Fernandez-Lafuente, P. Armisen, P. Sabuquillo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 185–197; b) C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463.
- [14] E. Wehtje, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *41*, 171–178.
- [15] R. Barros, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *59*, 364–373.
- [16] L. M. van Langen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 828–831.
- [17] D. J. Korz, U. Rinas, K. Hellmuth, E. A. Sanders, W. D. Deckwer, *J. Biotechnol.* **1995**, *39*, 59–65.
- [18] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

3.2. Publikation 2

Synthesis of chiral cyanohydrins with recombinant *Escherichia coli* cells in a micro-aqueous reaction system



K. E. Scholz, D. Okrob, B. Kopka, A. Grünberger,

M. Pohl, K.-E. Jäger, U. Krauss

Applied and Environmental Microbiology,

Manuskript eingereicht (Februar 2012)

NOTE: Journal Section: Biotechnology

Synthesis of chiral cyanohydrins with recombinant *Escherichia coli* cells in a micro-aqueous reaction system

Kathrin Emmi Scholz¹, Daniel Okrob², Benita Kopka¹, Alexander Grünberger²,
Martina Pohl², Karl-Erich Jaeger¹ and Ulrich Krauss^{*1}

¹*Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf and
Forschungszentrum Jülich, D-52426 Jülich, Germany*

²*Institut für Bio- und Geowissenschaften, IBG-1, Forschungszentrum Jülich, D-
52426 Jülich, Germany*

*Corresponding author: Ulrich Krauss

Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,
Forschungszentrum Jülich, D-52426 Jülich, Germany

email: u.krauss@fz-juelich.de

phone: ++49 2461 61 2939

Fax: ++49 2461 61 2490

Running head: biocatalytic synthesis of chiral cyanohydrins

Abbreviations: LOV: light, oxygen, voltage; FbFP: flavin-based fluorescent reporter; MTBE: methyl *tert*-butyl ether; HCN: hydrogen cyanide; HNL: hydroxynitrile lyase, ee: enantiomeric excess

Keywords: hydroxynitrile lyase, cyanohydrin synthesis, whole-cell biotransformation, fluorescent reporter techniques

Abstract

Synthesis of chiral cyanohydrins is performed in a mono-phasic micro-aqueous reaction system using whole recombinant *Escherichia coli* cells expressing the *Arabidopsis thaliana* hydroxynitrile lyase (*AtHNL*). Microscopy studies employing a fusion of *AtHNL* with a flavin-based fluorescent reporter (FbFP) reveal that the cells remain intact in the reaction system.

The synthesis of enantiopure cyanohydrins from aldehydes or ketones and hydrogen cyanide (HCN) catalysed by HNLs represents an industrially important biocatalytic route (Fig. 1)(4). Cyanohydrins serve as valuable building blocks in synthetic chemistry and the pharmaceutical industry(9). HNLs are usually applied in aqueous-organic two-phase systems at pH values equal to or below 4.5 in order to suppress the non-catalytic side reaction yielding racemic products(2).

<Figure 1>

However, such low pH-values are not always tolerated by the enzymes. E.g. the (*R*)-selective HNL from *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*) is unstable at low pH values(8), which severely limits its application in conventional aqueous-organic reaction systems. Application of the HNLs in organic solvent, with a minimal water activity, represents an attractive alternative which has recently been explored using precipitated and immobilised enzyme preparations(11). The organic solvent system facilitates the solubility of aromatic substrates and products and suppresses the non-catalytic side reaction due to the low water content. However, the precipitated enzyme cannot be recycled and the preparation of recyclable immobilizates requires additional steps and results in a partial loss of enzyme activity. In this respect, the use of whole cells in a mono-phasic micro-aqueous reaction system(5) would essentially eliminate all the aforementioned problems and thus represent a cost efficient alternative to the use of purified and/or immobilized enzyme preparations.

In order to test the applicability of such a system for the synthesis of chiral cyanohydrins, whole recombinant *E. coli* cells expressing the *AtHNL* are used here

as a whole-cell biocatalyst in a mono-phasic organic solvent. Cells and solvent can be recycled and the product can easily be recovered from the solvent. Despite the significant potential of such an approach, only a few studies have so far been reported on the application of whole cells in mono-phasic organic solvents⁽⁵⁾. Most of these studies focus on the stereoselective reduction of ketones by alcohol dehydrogenases using lyophilized yeast cells^(5, 12). To the best of our knowledge, only two studies have been published on the use of whole recombinant *E. coli* cells in water-free or micro-aqueous reaction systems. In one study, lyophilized *E. coli* cells overexpressing an alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber* were used in a micro-aqueous system with 99% (v/v) isopropanol⁽⁵⁾. A related strategy has recently been described, where lyophilized *E. coli* cells heterologously expressing the *Candida parapsilosis* carbonyl reductase were used in a reaction system containing only neat substrates, without addition of an explicit solvent⁽¹⁰⁾.

The feasibility of a mono-phasic micro-aqueous whole-cell reaction system for the production of chiral cyanohydrins was initially tested by the synthesis of (*R*)-mandelonitrile from benzaldehyde and hydrogen cyanide (HCN). The reaction was carried out in buffer saturated methyl *tert*-butyl ether (MTBE) (Fig. 2). MTBE is widely used in biocatalysis and has previously been shown to be advantageous for the use with free and immobilized *AtHNL* preparations⁽¹¹⁾. To recycle the cells, fresh or frozen *E. coli* BL21(DE3) cells expressing wild-type *AtHNL* were placed into a nylon-mesh. Thus, the cells can easily be removed from the reaction vessel facilitating easy cell recycling. After each conversion, the cells were washed with MTBE, placed in a new vessel and MTBE and fresh substrates were added. Both freshly prepared and

frozen cells displayed very similar conversion rates and enantioselectivities over several reaction cycles (Fig. 2 and Supplementary Fig. 1). Recycling of whole cells resulted in slightly slower initial reaction rates and final conversion yields in subsequent conversion rounds, however, without loss of enantioselectivity.

Cyanohydrin synthesis was further studied with different aldehyde substrates in order to evaluate the applicability of our reaction set-up in more detail (Table 1). Fresh (wet) cells showed good conversion rates but gave only moderate ee values with substituted benzaldehydes (**2**, **3**). By contrast, furfural (**4**) was only poorly converted (50 %) with low enantioselectivity (30 % ee).

< Figure 2>

<Table 1>

The difference between enzymatic and non-enzymatic reaction rates for the respective aldehydes may provide a reasonable explanation for the reduced enantioselectivities which were observed as compared to the conversion of **1**. It has previously been demonstrated that e.g. for **2** and **3**, the non-enzymatic side reaction in an aqueous reaction system is much faster than for **1**(1). Consequently, when dry *AtHNL* immobilizes were used for the conversion of **2** and **4**, excellent ee values (> 98 %) could be obtained(11). Therefore, it appears that the water content in the MTBE washed cell pellet (or in the *E. coli* cells) compromises the enantioselectivity in our whole-cell reaction system. To elucidate this possibility, the respective *E. coli* cells were lyophilized and used for the conversion of **1-4**. Not surprisingly, conversion was reduced compared to the use of fresh cells, however, ee values for all substrates

increased significantly. In particular **4** could be converted with an ee value of 88 % (Table 1) Likewise, **2** that was previously converted with a moderate ee of 70 % by fresh (wet) cells was now converted with an ee of 90 % by lyophilized cells.

Bacterial cells are evolved to be stable in an aqueous environment. Hence, the impact of prolonged incubation in MTBE remains unclear. In order to evaluate the influence of the reaction system on cell integrity, a translational fusion of a flavin-based fluorescent protein (FbFP) with the *AtHNL* was generated. In the fusion construct, nFbFP-*AtHNL*, the FbFP module is attached N-terminally to the *AtHNL* by molecular biological methods. FbFPs were initially derived from the sensor domain of plant and bacterial light-oxygen-voltage (LOV) photoreceptors⁽⁶⁾. They represent a promising new class of fluorescent reporter proteins with high potential for biotechnological and cell biological application^(3, 6, 7, 13, 14). The resulting fluorescent cells, expressing the fusion enzyme, can be used similarly to the *AtHNL* expressing *E. coli* cells for cyanohydrin synthesis. However, the use of a fluorescent whole-cell biocatalyst allows the application of fluorescence microscopy and spectroscopy to track the fate of the cells in the reaction system. With respect to (*R*)-mandelonitrile synthesis and cell recycling, nFbFP-*AtHNL* expressing *E. coli* cells behave identical to the wild-type *AtHNL* expressing cells (Fig. 3 A). Fluorescence microscopy revealed cell shrinkage by about 20 % during three consecutive reaction cycles in MTBE (Fig. 3, B and C). Remarkably, this small change in cell morphology does coincide with a slightly decreased overall biocatalytic performance in the next cycle (Fig. 3, A).

<Figure 3>

The fluorescence signal of the fused reporter protein, however, remained stable during several hours of incubation (Supplementary Fig. 2), indicating proper reporter protein integrity within the cell. Despite the observed cell shrinkage during incubation in MTBE, cellular integrity was essentially retained. Mechanistically, the reduced conversion rate during recycling may thus be due to limited leakage of the enzyme from the cells, the loss of cell material from the nylon mesh during washing and recycling steps, or could be caused by partial inactivation of the intracellular enzyme by the substrate.

Conclusions

Standard *E. coli* BL21(DE3) cells, expressing the *Arabidopsis thaliana* HNL, were used as whole-cell biocatalyst for the synthesis of chiral cyanohydrins in mono-phasic micro-aqueous MTBE. The use of lyophilized cells makes this approach also suitable for the conversion of aldehydes showing a fast non-catalyzed racemic product formation in aqueous systems. Due to its simplicity (use of whole cells, no protein purification, mono-phasic organic solvent), this novel process for the production of chiral cyanohydrins could be an interesting alternative also for industrial applications. In general, the application of whole-cell biotransformations in pure organic solvents represents a promising alternative to conventional biotransformations in aqueous media. The use of mono-phasic microaqueous organic solvents may particularly be interesting when poor substrate or product solubility limit their application or when substrates and/or products are unstable in water. Our approach should be directly transferable to any HNL that can be expressed in *E. coli*.

Moreover, our microscopic analyses revealed that standard *E. coli* cells do not lose their cellular integrity when incubated in MTBE. Hence, it can be expected that the transfer of the presented whole-cell biotransformation approach to other enzymatic systems could open up new biocatalytic routes even for the synthesis of novel products which are currently not accessible by biocatalysis.

Likewise, the use of fluorescent reporter techniques in such studies allows an *in situ* monitoring of the respective biocatalytic system. In this respect, we currently evaluate the potential of FbFPs and other fluorescent proteins as reporters for further biotechnological applications including solvent-screening and localization of enzymes in immobilization carrier materials and micellar systems.

Acknowledgements

This work was funded by the DFG research training group GK1166 “Biocatalysis in non-conventional media” (BioNoCo).

References

1. **Andexer, J., J. von Langermann, A. Mell, M. Bocola, U. Kragl, T. Eggert, and M. Pohl.** 2007. An R-selective hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* with an α/β -hydrolase fold. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**:8679-8681.
2. **Buhler, H., F. Effenberger, S. Forster, J. Roos, and H. Wajant.** 2003. Substrate specificity of mutants of the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta*. *Chembiochem* **4**:211-216.
3. **Chapman, S., C. Faulkner, E. Kaiserli, C. Garcia-Mata, E. I. Savenkov, A. G. Roberts, K. J. Oparka, and J. M. Christie.** 2008. The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:20038-20043.
4. **Dadashipour, M., and Y. Asano.** 2011. Hydroxynitrile Lyases: Insights into Biochemistry, Discovery, and Engineering. *Acs Catalysis* **1**:1121-1149.
5. **de Gonzalo, G., I. Lavandera, K. Faber, and W. Kroutil.** 2007. Enzymatic reduction of ketones in "micro-aqueous" media catalyzed by ADH-A from *Rhodococcus ruber*. *Organic Letters* **9**:2163-2166.
6. **Drepper, T., T. Eggert, F. Circolone, A. Heck, U. Krauss, J. K. Guterl, M. Wendorff, A. Losi, W. Gärtner, and K. E. Jaeger.** 2007. Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol* **25**:443-445.
7. **Drepper, T., R. Huber, A. Heck, F. Circolone, A. K. Hillmer, J. Büchs, and K. E. Jaeger.** 2010. Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins

outperform green fluorescent protein-like proteins as quantitative *in vivo* real-time reporters. *Appl Environ Microbiol* **76**:5990-5994.

8. **Guterl, J. K., J. N. Andexer, T. Sehl, J. von Langermann, I. Frindi-Wosch, T. Rosenkranz, J. Fitter, K. Gruber, U. Kragl, T. Eggert, and M. Pohl.** 2009.

Uneven twins: comparison of two enantiocomplementary hydroxynitrile lyases with α/β -hydrolase fold. *J Biotechnol* **141**:166-173.

9. **Hatti-Kaul, R., U. Tornvall, L. Gustafsson, and P. Borjesson.** 2007.

Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals--a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol* **25**:119-124.

10. **Jakoblinnert, A., R. Mladenov, A. Paul, F. Sibilla, U. Schwaneberg, M. B. Ansorge-Schumacher, and P. D. de Maria.** 2011. Asymmetric reduction of ketones with recombinant *E. coli* whole cells in neat substrates. *Chemical Communications* **47**:12230-12232.

11. **Okrob, D., M. Paravidino, R. V. A. Orru, W. Wiechert, U. Hanefeld, and M. Pohl.** 2011. Hydroxynitrile Lyase from *Arabidopsis thaliana*: Identification of Reaction

Parameters for Enantiopure Cyanohydrin Synthesis by Pure and Immobilized Catalyst. *Advanced Synthesis & Catalysis* **353**:2399-2408.

12. **Rotthaus, O., D. Kruger, M. Demuth, and K. Schaffner.** 1997. Reductions of keto esters with baker's yeast in organic solvents - A comparison with the results in water. *Tetrahedron* **53**:935-938.

13. **Shu, X., V. Lev-Ram, T. J. Deerinck, Y. Qi, E. B. Ramko, M. W. Davidson, Y. Jin, M. H. Ellisman, and R. Y. Tsien.** 2011. A genetically encoded tag for

correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. PLoS Biol **9**:e1001041.

14. **Tielker, D., I. Eichhof, K. E. Jaeger, and J. F. Ernst.** 2009. Flavin mononucleotide-based fluorescent protein as an oxygen-independent reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell **8**:913-915.

Tables and Figures

Table 1: Conversion of different aldehydes by whole *E. coli* cells expressing wild-type *AflHNL*^a.

substrates

 reaction no.		fresh (wet) cells		lyophilized cells	
		conv (%)	ee (%)	conv. (%)	ee (%)
R= H-	1	100	>98	45	>98
= o-Cl-	2	80	>70	43	>90
= o-F-	3	85	>90	33	>98
	4	50	>30	67	>88

^aAll conversions were carried out using 350 mg of fresh (wet) cells or the corresponding amount of lyophilized cells in buffer-saturated MTBE containing 2 M HCN and 0.5 mmol of the respective aldehyde. Reactions were stopped after 1 h and conversion rates were determined by GC.

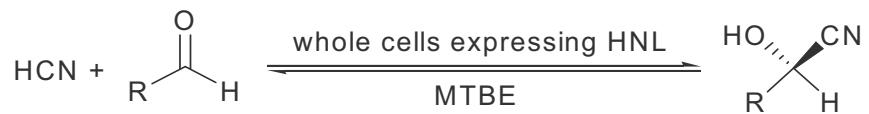


Fig. 1. HNL-catalyzed hydrocyanation reaction in mono-phasic micro-aqueous methyl *tert*-butyl ether (MTBE).

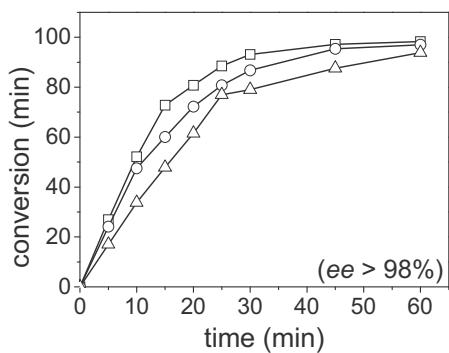


Fig. 2. Conversion of benzaldehyde and HCN to (R)-mandelonitrile by whole *E. coli* BL21(DE3) cells expressing wild-type AtHNL. All reactions were performed using in buffer-saturated MTBE with 350 mg of wet cells placed in a nylon mesh (pore-size 0.4 μ m). After each conversion round, the cells in the nylon mesh were washed with MTBE, placed in a fresh reaction vessel, and the subsequent conversion was started by the addition of new substrates. I. conversion (\square), II. conversion (\circ), and III. conversion (Δ). During all conversion rounds the ee exceeded 98%

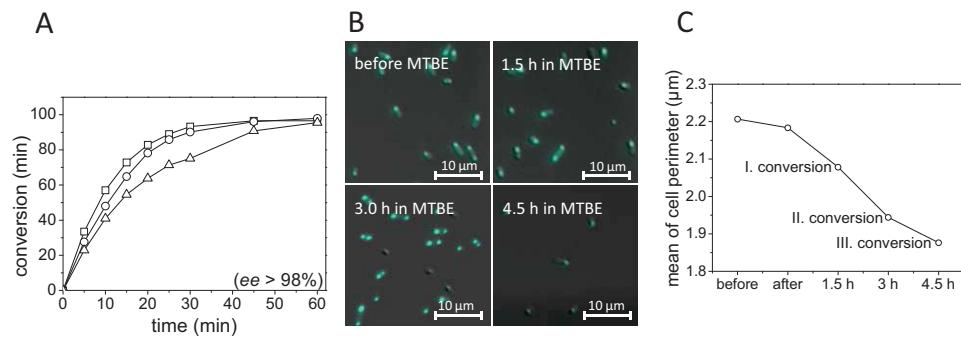
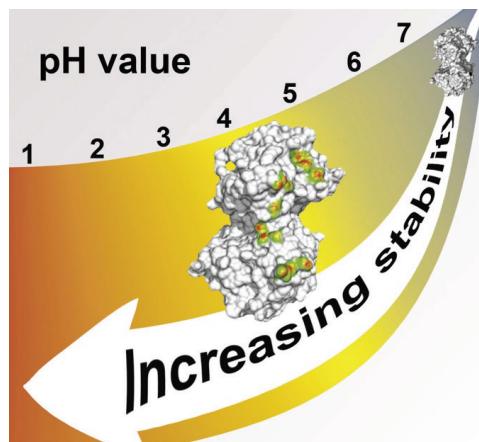


Fig. 3. (A) Conversion of benzaldehyde and HCN to (R)-mandelonitrile by whole *E. coli* BL21(DE3) cells expressing nFbFP-AfHNL. (B) *E. coli* cells expressing nFbFP-AfHNL imaged with fluorescence microscopy. Cells were incubated in buffer-saturated MTBE for up to 4.5 hours. Samples were taken at time points corresponding to the respective conversion cycle. (D) Change in relative *E. coli* cell perimeter during incubation in MTBE. Data were derived from statistical evaluation of microscopy pictures (see supplementary materials for details).

3.3. Publikation 3

Tailoring a stabilized variant of hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana*



D. Okrob, J. Metzner,

W. Wiechert, K. Gruber, M. Pohl

ChemBioChem, Februar 2012

DOI: 10.1002/cbic.201100619

Gedruckt mit der Genehmigung von John Wiley and Sons

License number: 2862510540383

FULL PAPERS

DOI: 10.1002/cbic.201100619

Tailoring a Stabilized Variant of Hydroxynitrile Lyase from *Arabidopsis thaliana*

Daniel Okrob,^[a] Julia Metzner,^[a] Wolfgang Wiechert,^[a] Karl Gruber,^[b] and Martina Pohl^{*[a]}

Dedicated to Professor Maria-Regina Kula on the occasion of her 75th birthday

The *R*-selective hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* (AtHNL) cannot be applied for stereoselective cyanohydrin syntheses in aqueous media because of its limited stability at pH < 5, which is required in order to suppress the uncatalyzed racemic cyanohydrin formation. To stabilize AtHNL we designed a surface-modified variant incorporating 11 changes in the amino acids on the protein surface. Comparative characterization of the variant and the wild-type enzyme showed a broadened pH optimum towards the acidic range, along

with enhancement of activity by up to twofold and significantly increased pH- and thermostabilities. The effect can most probably be explained by a shift of the isoelectric point from pH 5.1 to 4.8. Application of the variant for the synthesis of (*R*)-cyanohydrins in an aqueous/organic two-phase system at pH 4.5 demonstrated the high stereoselectivity and robustness of the variant relative to the wild-type enzyme, which is immediately inactivated under these conditions.

Introduction

Hydroxynitrile lyases (HNLs, EC 4.1.2.x) belong to an industrially important group of enzymes catalyzing highly stereospecific additions of HCN to aldehydes or ketones.^[1] The resulting chiral cyanohydrins are versatile building blocks for the production of fine chemicals, pharmaceuticals, and agrochemicals.^[2]

The HNL from *Arabidopsis thaliana* (AtHNL) was identified as the first *R*-selective HNL with an α/β -hydrolase fold, which is structurally related to the *S*-selective HNLs from *Manihot esculenta* (MeHNL) and *Hevea brasiliensis* (HbHNL).^[3] In our previous studies, we solved the crystal structure of the dimeric AtHNL (PDB ID: 3dqz)^[4] and identified similarities between MeHNL and AtHNL with regard to their broad substrate ranges and kinetic parameters. In contrast with MeHNL's high stability in the acidic pH range (pH \leq 4), AtHNL is inactivated by aggregation within minutes below pH 5.^[5] However, for the enzymatic synthesis of chiral cyanohydrins in aqueous or aqueous/organic two-phase systems, a pH of 4 or below (at 20 °C) is a prerequisite to suppress the non-enzymatic hydrocyanation, which results in racemic cyanohydrins.^[6] Alternatively, the formation of racemic products can also be avoided by using micro-aqueous reaction systems.^[7] We recently successfully demonstrated this by using precipitated and immobilized AtHNL for the synthesis of different chiral cyanohydrins in buffer-saturated methyl *tert*-butyl ether (MTBE).^[8]

In parallel studies we developed an alternative approach to stabilizing AtHNL by enzyme engineering, targeting the enzyme's surface, to optimize its properties also for application in aqueous/organic two-phase systems.

Our previous studies had demonstrated MeHNL to be the most stable HNL with an α/β -hydrolase fold.^[5] Its higher stability was assumed to result from the enzyme's property of forming weak tetramers from two stable dimers. A comparison of

the surface amino acid residues of the potential tetramer interface of MeHNL with the corresponding positions in AtHNL revealed high diversity of the surface residues, which could explain the dimeric state of AtHNL. In order to stabilize AtHNL, these sequence differences were taken as a starting point for a rational protein engineering approach. The aim was the modification of the surface–environment interaction, as well as the introduction of a potential interface area, which might enable weak tetramer formation in the AtHNL variant.

Here we present the development of a surface-modified AtHNL variant (surfmod-AtHNL), which features changes of 11 amino acids to the corresponding amino acids in MeHNL. We describe a comparative characterization of wild-type AtHNL and the surfmod variant, focusing on differences in initial rate activities, pH optima, pH stabilities, and thermostabilities, as well as differences between the quaternary structures and the isoelectric points. Furthermore, application of the variant in an aqueous/organic two-phase system was tested in order to demonstrate its potential for the synthesis of chiral cyanohydrins.

[a] D. Okrob, J. Metzner, Prof. Dr. W. Wiechert, Prof. Dr. M. Pohl
Institute of Bio- and Geosciences, IBG-1: Biotechnology
Forschungszentrum Jülich GmbH
52425 Jülich (Germany)
E-mail: ma.pohl@fz-juelich.de

[b] Dr. K. Gruber
Institute of Molecular Biosciences, University of Graz
Humboldtstrasse 50/3, 8010 Graz (Austria)

Supporting information for this article is available on the WWW under
<http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201100619>.

Results and Discussion

Analysis of the 3D structure of MeHNL and construction of the surfmmod-AtHNL variant

The crystal structure of MeHNL (PDB ID: 1dwp)^[9] was analyzed with the aid of the PQS-server^[10] and a tetramer was generated (by application of a crystallographic twofold axis) as described by Guterl et al.^[5] An analysis of this tetrameric MeHNL structure model with the aid of the PDBePISA-server [protein interfaces, surfaces, and assemblies service (PISA) at the European Bioinformatics Institute]^[11] yielded dimer interfaces (interface 1) between monomers A/B and C/D and tetramer interfaces (interface 2) between monomers A/C and B/D as shown in Figure 1. Interface 1 was found to have an interaction area of 876 Å² involving 26/27 amino acid interactions, which correlates with an estimated complexation energy of $-14.0 \text{ kcal mol}^{-1}$. In contrast, interface 2 was found to have an interaction area of 438 Å² involving 13/14 amino acid interactions with a lower complexation energy of $-2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$, supporting the idea that MeHNL might form a weak tetramer.

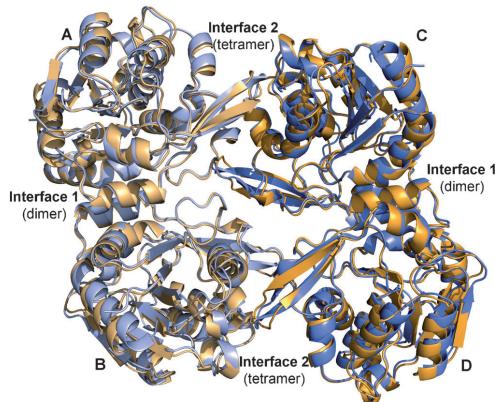


Figure 1. Structural alignment of the tetrameric structure of MeHNL (blue) generated by rotation about a crystallographic twofold axis and the tetrameric AtHNL (orange). PISA. Interface 1: conserved interaction area 876 Å², estimated complexation energy $-14.0 \text{ kcal mol}^{-1}$. Interface 2: interaction area for tetramer formation. MeHNL: 438 Å², estimated complexation energy $-2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$. AtHNL with optimized surface: 378 Å², estimated complexation energy $-5.0 \text{ kcal mol}^{-1}$.

An analogous analysis of the AtHNL structure (PDB ID: 3dqz) yielded a dimer interface with an interaction area and conserved amino acid composition similar to those of interface 1 of MeHNL (for further details see the Supporting Information), whereas the amino acids corresponding to MeHNL's interface 2 are highly divergent and do not allow formation of a tetramer (Table 1). For a direct comparison of structural differences, a tetrameric model of AtHNL was generated and aligned to the tetrameric MeHNL model. The modeled interface 2 of the AtHNL tetramer contains several unfavorable side-chain interactions,

Table 1. Nonconserved amino acids of MeHNL's interface 2 and comparison with the equivalent positions in AtHNL. Exchanges (marked in gray) of the 11 residues in AtHNL for the corresponding residues in MeHNL resulted in the highest complexation energy.

MeHNL	AtHNL	MeHNL	AtHNL	MeHNL	AtHNL
47 Gln	48 Pro	66 Glu	67 Lys	136 Phe	137 His
49 Glu	50 Gln	92 Arg	93 Ile	137 Thr	138 Glu
50 Gln	51 Ala	93 Tyr	94 Phe	138 Asn	139 Thr
52 Asn	53 Glu	95 Asp	96 Ala	139 Ile	140 Arg
59 Glu	60 Lys	133 Tyr	134 Phe	141 Thr	141 Asn
63 Thr	64 Glu	134 Phe	135 Ser	142 Glu	142 Gly
64 Phe	65 Thr	135 Thr	136 Ser	187 Arg	187 Lys
				188 Pro	188 Glu

resulting in a positive complexation energy ($1.6 \text{ kcal mol}^{-1}$) as calculated with the aid of the PDBePISA server. A stepwise optimization of AtHNL's interface 2 was performed by an *in silico* exchange of amino acids for the corresponding residues in MeHNL. Unfavorable contacts were eliminated first, followed by exchanges of neighboring amino acids. After each *in silico* amino acid exchange, the PDBePISA analysis displayed changes in the interaction area and the complexation energy. The residues in positions 65, 134, 135, 136, 187, and 188 showed no interaction with the other dimer in the tetrameric AtHNL model and were not exchanged. Exchanges of the amino acids in positions 94, 96, 137, 139, and 142 to the corresponding amino acids in MeHNL resulted in unfavorable complexation energies and so these exchanges were also not carried out.

Finally, the best *in silico* fit was observed with exchange of eleven amino acids in wild-type AtHNL to the corresponding residues in MeHNL (Table 1), yielding an optimized interface 2 with an interaction area of 378 Å² and a predicted complexation energy of $-5.0 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Afterwards, the corresponding gene for this surfmmod-AtHNL variant was synthesized, cloned into a pET28 expression vector system, and overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) and the purified variant was comparatively characterized relative to the wild-type enzyme (for further information see the Supporting Information).

pH-dependent initial rate activities and stabilities of wild-type AtHNL and surfmmod-AtHNL

Initial rate activities of purified wild-type AtHNL and the surfmmod variant were determined for the cleavage of mandelonitrile over the pH range from 4.00 to 6.50 (Figure 2).

Wild-type AtHNL starts to be active at pH 4.75 (12.2 U mg⁻¹) and reaches its highest activity of 133.6 U mg⁻¹ at pH 6.00. In contrast, the surfmmod variant exhibits a broader pH optimum, starting with 23.6 U mg⁻¹ at pH 4.50 and reaching an almost twofold enhanced maximum activity of 227 U mg⁻¹ at pH 5.75 (Figure 2). The influence of the pH on surfmmod-AtHNL's stability was determined under assay conditions (incubation at 25 °C) focusing on the pH range between 4.50 and 6.00. With increas-

FULL PAPERS

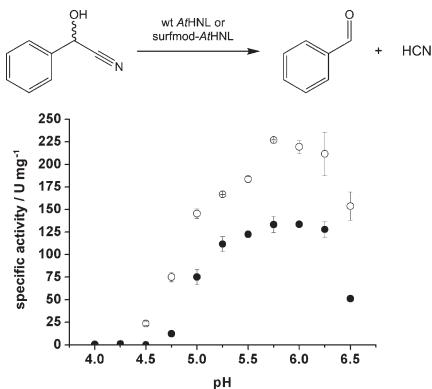
Hydroxynitrile Lyase from *A. thaliana*

Figure 2. pH-dependent initial rate activities of wild-type AthNL (●) and surfmod-AthNL (○) for the cleavage of mandelonitrile measured in citrate phosphate buffer (50 mM, 25 °C) at pH 4.00–6.50.

Table 2. Half-lives of wild-type AthNL and surfmod-AthNL at different pH values (4.5–6.0) in citrate phosphate buffer (50 mM, 20 °C).		
pH	wild-type AthNL ^[a]	Half-life [h]
4.50	0.00	0.22
5.00	0.16	2.23
5.40	2.00	3.40
5.80	>24.00	13.74
6.00	60.00	52.17

[a] Half-lives of wild-type AthNL according to Guterl.^[12]

ing pH, AthNL's half-life increases exponentially from 0.16 h at pH 4.50 to 28.11 h at pH 6.00 (Table 2).

The influence of the pH on surfmod-AthNL's stability was determined at 20 °C with a focus on the pH range between 4.50 and 6.00. With respect to the half-life of the wild-type enzyme the surfmod variant shows an increased stability below pH 5.80 and a 14-fold higher stability at pH 5.00. At pH ≥ 5.80 the two enzyme variants display comparable stabilities (Table 2).

For stereoselective hydrocyanation of aldehydes or ketones in aqueous or aqueous/organic two-phase systems, the enzyme's stability below pH 5.00 is important.^[6] In addition to pH, the second important parameter capable of influencing the enantiomeric excess (ee) of the reaction is temperature. Temperature also has an important impact on the stability of the enzyme and is a key parameter for process development, which motivated us to study the thermostability of surfmod-AthNL in more detail.

Thermostabilities of wild-type AthNL and surfmod-AthNL at pH 5.00

The thermostability of the surfmod variant in citrate/phosphate buffer (50 mM, pH 5.00) between 0 °C and 50 °C was monitored

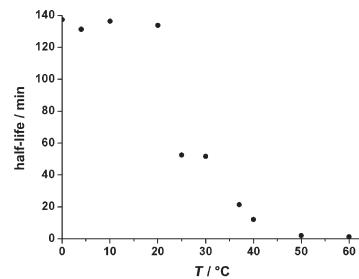


Figure 3. Half-lives of surfmod-AthNL in citrate/phosphate buffer (50 mM, pH 5.00) between 0 and 50 °C. Surfmod-AthNL was incubated at each temperature for a maximum of 4 h. Initial rate activities for the cleavage of mandelonitrile were determined over time and related to the activity of the untreated enzyme.

over a period of 4 h. As shown in Figure 3, the enzyme is reasonably stable up to 20 °C, reaching half-lives of about 2 h. Higher temperatures cause rapid decreases in stability.

Surfmod-AthNL is up to 14 times more stable than wild-type AthNL, which displays fairly constant half-lives of 21.5 min (average) below 10 °C and only 10 min at 20 °C (Table 3).

Obvious possible reasons for surfmod-AthNL's enhanced pH- and thermostabilities could be multimer formation and/or an altered isoelectric point (IP), shifting the environmental optimum of the surfmod variant to lower pH values.

Table 3. Half-lives of wild-type AthNL and surfmod-AthNL between 0 °C and 50 °C in citrate/phosphate buffer (50 mM, pH 5.00).

T [°C]	Half-life [min]	
	wild-type AthNL	Surfmod-AthNL
0	18.1	137.5
4	23.1	131.4
10	23.6	136.5
20	9.6	133.8

Native quaternary structures and isoelectric points of the two AthNL variants

In order to elucidate potential changes in the enzyme variants' native quaternary structures, a comparative analysis of the native molecular masses of wild-type AthNL and the surfmod-variant was performed by size-exclusion chromatography (SEC).

Both variants displayed molecular masses of 29.2 kDa for each monomeric subunit (257 amino acids). SEC of the wild-type enzyme was performed with freshly purified enzyme at pH 7.50, which was necessary for adequate enzyme stability, revealing a molecular mass of 58 kDa. As had already been determined by Guterl et al.,^[5] wild-type AthNL is a dimer in solution at pH 7.50. For surfmod-AthNL, SEC was performed under identical conditions and yielded a molecular mass of 55 kDa, which also indicates a dimeric state for the variant. SEC for the surfmod-AthNL was thus additionally performed at pH 5.00,

but no change in molecular mass was noted. Consequently, the reason for the higher stability of surfmod-AhNl is not a change in the quaternary structure.

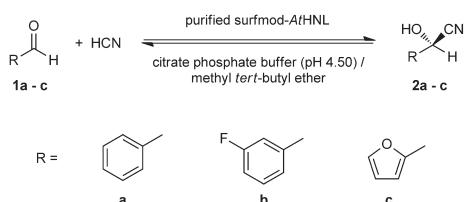
Subsequent determination of the isoelectric points demonstrated that the IP of the surfmod variant (pH 4.80) is shifted by 0.30 pH units towards the acidic range relative to the wild-type enzyme (pH 5.1). This effect can easily be explained because the eleven mutations include several charged amino acids (Table 1). This pH shift is in the same range as the pH-dependent activity shift between the two enzymes (Figure 2), which demonstrates that the surfmod-AtHNL is structurally more stable at pH 5.00, whereas the wild-type enzyme is starting to unfold rapidly (at least partially) under these conditions.^[5]

Surfmod-AtHNL-catalyzed synthesis of cyanohydrins in an aqueous/organic two-phase system

Because the development of the surfmod variant had been motivated by the stereoselective synthesis of cyanohydrins in aqueous/organic two-phase systems, we representatively tested its potential in hydrocyanations of benzaldehyde (**1a**), 3-fluorobenzaldehyde (**1b**), and 2-furfural (**1c**) in an aqueous/organic two-phase system (Scheme 1).

In order to determine the optimal reaction parameters, the pH- and temperature-driven uncatalyzed side reaction was investigated first for the synthesis of mandelonitrile (**2a**) in the two-phase system (without enzyme) at pH 5.00 (aqueous phase) and 20 °C. As shown in Figure 4A, a constant conversion of **1a** was detected, yielding racemic **2a** (37%) after 120 min. Reduction of the temperature to 0 °C reduced the conversion of **1a** to 4.2% after 120 min (Figure 4A). Hence, an enzymatic reaction with an enantiomeric excess of 96–97% should be possible in a two-phase system at pH 5.00 and 0 °C. Beyond that, reduction of the pH should lead to further suppression of the side reaction.

The surfmod-ATHNL-catalyzed hydrocyanation of **1a** was therefore performed at pH 4.50 (0 °C). After 120 min the reaction was stopped and **1a** (70%) had been converted into the *R* enantiomer of **2a** with 99.3% ee (Figure 4B). In contrast, the same reaction was performed with wild-type AthNL and no enantioenriched product formation was detected, most likely because of the rapid deactivation of the enzyme at pH 4.50.



Scheme 1. Surfmol-AtHNL-catalyzed hydrocyanations of model substrates (**1a–c**) in an aqueous/organic reaction system at pH 4.50 (0 °C). Aqueous phase: citrate/phosphate buffer (pH 4.50, 50 mM, 1 mL). Organic phase: MTBE (1 mL). HCN (2 mmol). **1a–c** (0.5 mmol).

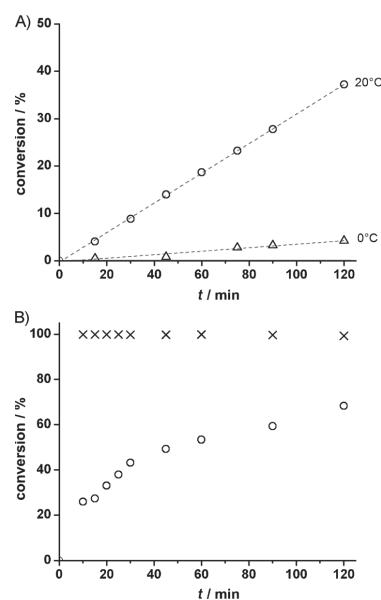


Figure 4. A) Results for the non-enzymatic racemic hydrocyanation of **1a** in an aqueous/organic two-phase system at pH 5.00 and either 20 °C (○) or 0 °C (△). **B)** Conversion of **1a** (○) to **2a** by surmned-AtHNL (0.6 mg mL⁻¹) in a two-phase system at pH 4.50 and 0 °C. Reaction conditions: citrate/phosphate buffer (pH 5.00 or 4.50, 50 mM, 1 mL), HCN dissolved in MTBE (2 M, 1 mL), benzaldehyde (0.5 M). The reaction was stopped after 2 h. Conversions (○) and ee values (x) were determined by chiral GC (see the Experimental Section).

Subsequently, 3-fluorobenzaldehyde (**1b**) and 2-furfural (**1c**) were converted under identical reaction conditions, yielding conversions of 74% (**2b**) and 87% (**2c**) but slightly lower enantioselectivities ($ee \geq 92\%$ for **2b** and $ee \geq 95\%$ for **2c**). (For details see the Supporting Information.)

Rational protein engineering of AtHNL had thus resulted in a more active and more stable surfmod-AtHNL variant, which is now applicable in aqueous/organic two-phase systems.

Conclusions

We have successfully designed a significantly more stable variant of AtHNL, which is now applicable for the synthesis of chiral cyanohydrins in typical aqueous/organic two-phase systems.

The comparative characterization of the variant and the wild-type enzyme demonstrated improved stability and activity of the variant, especially in the acidic pH range. Whereas the wild-type enzyme is inactive at pH 4.50, the surfmod variant exhibits 23.6 U mg^{-1} initial rate activity (cleavage of mandelonitrile, Figure 2) and a half-life of about 13 h (20°C , Table 2). At pH 5.00 the activity of the variant (145 U mg^{-1}) is almost twice that of the wild-type enzyme (75 U mg^{-1}). Together with a half-life of about 50 min at 25°C , which can be enhanced to more

Hydroxynitrile Lyase from *A. thaliana*

than 2 h by lowering the temperature to 0–20 °C (Table 3), these properties make the surfmod variant an attractive catalyst for enzymatic cyanohydrin syntheses in aqueous/organic two-phase systems.

Investigations of surfmod-AtHNL's quaternary structure confirmed the dimeric nature of the variant, which indicates no change in its subunit assembly in relation to the wild-type enzyme. The significant stabilization of the variant is therefore most probably the result of a shift of the isoelectric point from pH 5.10 (wild type AtHNL) to pH 4.80 (surfmod variant).

Because all eleven amino acid exchanges involved only the surface of the enzyme, we did not expect a significant impact on its catalytic activity and stereoselectivity. However, the cleavage activity was enhanced by at least 1.7-fold relative to that of the wild-type enzyme (Figure 2). The synthesis of enantioenriched cyanohydrins in an aqueous/organic two-phase system (pH 4.50, 0 °C) is now possible for the first time thanks to this AtHNL variant, because the wild-type enzyme is not active or stable under these conditions. The suitability of the variant for the production of chiral cyanohydrins was demonstrated for the three different products **2a–c**, produced with good levels of conversion and high stereoselectivities.

The modifications on AtHNL's surface have established a variant that is sufficiently active and stable for application in the synthesis of enantioenriched cyanohydrins under acidic conditions in a two-phase system. This variant nicely complements the strategies we have used to stabilize AtHNL for the enantioselective hydrocyanation of aldehydes. Recently we described the successful immobilization of wild-type AtHNL on celite, which works very well in micro-aqueous systems, such as buffer-saturated monophasic MTBE.^[8] Celite-AtHNL cannot be applied in aqueous media, however, because the adsorptive binding on the celite support is not stable under these conditions. With the surfmod-AtHNL we now have two stabilized biocatalysts to hand: one for application in aqueous/organic media and one for application in micro-aqueous/organic reaction media. With regard to productivity in enzymatic cyanohydrin syntheses, AtHNL is currently not a viable alternative to the well-established *R*-selective HNL from almond, which shows a very high stability even at pH 2.6.^[2,17]

In ongoing studies the hydrocyanation activity of surfmod-AtHNL in monophasic MTBE is being investigated relative to that of the wild-type enzyme. Further studies will focus on additional stabilization of surfmod-AtHNL by immobilization to increase stability further.

Experimental Section

CAUTION: Sodium cyanide and HCN are highly poisonous. Procedures involving sodium cyanide or HCN were performed in a well-ventilated fumehood equipped with a calibrated HCN detector. Neutralization of HCN-containing waste was performed with commercial bleach (14% sodium hypochlorite solution). The waste was then stored over a large excess of bleach for disposal. For safety reasons, reactions were performed in closed reaction vessels on a 1 mL scale with use of a solution of HCN (2 M) in MTBE with 0.5 mmol aldehyde.

Chemicals: Benzaldehyde (99%), 3-fluorobenzaldehyde (99%), 2-furfural (99%), dodecane (anhydrous, ≥ 99%), pyridine (99%), and sodium cyanide (97%) were purchased from Aldrich. Acetic anhydride (p.a.) was purchased from Fluka. Methyl *tert*-butyl ether (MTBE, p.a.) was purchased from Merck. Dichloromethane was from KMF (St. Augustin, Germany). Purified mandelonitrile was purchased from Jülich Fine Chemicals (Jülich, Germany) and stored at –20 °C. Aldehydes were freshly distilled and stored under argon. HCN was freshly prepared by the procedure described below.

Analytical methods: Synthesis reactions were followed by chiral gas chromatography on a Shimadzu GC-14B gas chromatograph or on an Agilent Technologies 6890N gas chromatograph, each fitted with a FID detector and a β -cyclodextrin column (CP-Chirasil-Dex CB 25 m × 0.25 mm, Agilent, Waldbronn, Germany). GC methods used were identical to those described in the literature.^[13] Samples (30 μ L aliquots) of the reaction mixtures were taken at defined time points, dissolved in dichloromethane (1.7 mL) and derivatized by addition of pyridine (40 μ L) and acetic anhydride (40 μ L) over at least 3 h. Conversion rates and enantiomeric excesses were calculated from the relative peak areas of the aldehydes and the cyanohydrin derivatives.

In silico protein analysis of MeHNL and AtHNL: The crystal structure of MeHNL (PDB ID: 1dwp) was analyzed with the aid of the PQS server^[10] and a tetrameric structure was generated by the application of a crystallographic twofold axis. Interacting amino acids in MeHNL's tetrameric interface were identified by a PDBePISA (EBI) analysis.^[11] A tetrameric model of AtHNL was constructed by structural alignment of AtHNL (PDB ID: 3dqz) and the tetrameric MeHNL model. Differences between the MeHNL and AtHNL tetramer interface were analyzed by use of the molecular visualization tool PyMol together with the PyMol plug-in VASCo.^[14] For the stepwise exchange of different amino acids from MeHNL to AtHNL the molecular visualization tool PyMol was used. The PDBePISA server was used to determine the structural complexation energy after each amino acid exchange.

Cultivation and purification of wild-type and surfmod-AtHNL: BL21(DE3)_pAtHNL^[5] and BL21(DE3)_p-AtHNL (synthesized by Slonig, Puchheim, Germany) were cultivated by use of a standard batch or fed-batch fermentation protocol, respectively. In the case of AtHNL, cells (1.75 kg) with a total activity of 2 GU were harvested from a 15 L fed-batch cultivation. In the case of Surfmod-AtHNL, cells (245 g) with a total activity of 0.65 GU (mandelonitrile cleavage assay, pH 5.00) were harvested from a 9 L batch cultivation. BL21(DE3)_pAtHNL or BL21(DE3)_psurfmod-AtHNL cells (9 g), were slowly resuspended in potassium phosphate buffer (pH 7.50, 50 mM) at 0 °C and disrupted afterwards by sonication [4 × 5 min at 70 W cm^{–2} on ice with a UP200S ultrasonic processor and S14D sonotrode (Dr. Hielscher GmbH)]. After centrifugation (35 000 g, 4 °C, 45 min), the resulting crude extract (ca. 50 mL) was desalted by gel filtration on Sephadex G-25 [1 L bed volume, pH 7.50, potassium phosphate buffer (10 mM)]. Subsequently, anion-exchange chromatography was performed on a Q-Sepharose column (90 mL bed volume), which was equilibrated with potassium phosphate buffer (pH 7.50, 50 mM). After elution of unbound proteins, HNL-containing fractions were eluted with a linear NaCl gradient (0–150 mM). The pooled fractions with HNL activity were desalted with the aid of a Sephadex G-25 column [1 L batch volume, potassium phosphate buffer (pH 7.50, 10 mM)] and subsequently lyophilized. Protein determination was performed according to Bradford (1976).^[15] Both variants were prepared with a purity of 90%. Specific activities of wild-type AtHNL (70–90 U mg^{–1}) and of surfmod-AtHNL

(160 U mg⁻¹) toward mandelonitrile cleavage (pH 5.00) were determined (HNL activity assay, see below).

HNL activity assay (mandelonitrile cleavage): The increase in the benzaldehyde concentration was measured continuously at 280 nm in quartz glass cuvettes. Citrate phosphate buffer (pH 5.00, 50 mM, 700 µL) was mixed with enzyme solution [100 µL, citrate phosphate buffer (pH 6.00, 10 mM)] at 25 °C. The reaction was started by addition of mandelonitrile solution [mandelonitrile (67 mM, 200 µL) in citrate phosphate buffer (pH 3.50)] and monitored for 1.5 min. Subsequently, the activity was calculated by use of the molar extinction coefficient of benzaldehyde ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 1376 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). One unit of HNL activity is defined as the amount of enzyme that converts 1 µmol mandelonitrile per minute in citrate phosphate buffer (pH 5.00, 25 °C). All measurements were performed at least as triplicates.

Determination of the temperature- and pH-dependent initial rate activities: Temperature- and pH-dependent initial rate activities were determined with the mandelonitrile cleavage assay. All measurements were performed in triplicate. Controls for each pH value were measured in duplicates containing buffer instead of enzyme. The rate of this non-enzymatic reaction increased continuously with pH. Initial rate activities in the pH range of pH 4.00 to 6.50 were determined.

Determination of temperature- and pH-dependent stability: Stock solutions in citrate/phosphate buffer (10 mM, pH 6.00) were prepared from the lyophilized enzyme (0.75 mg mL⁻¹). Aliquots (diluted 1:10-1:50) were prepared with the corresponding reaction buffer (citrate/phosphate buffer, 50 mM) and incubated (up to 72 h) at different temperatures (0–60 °C, pH 5.00) or pH values (20 °C, pH 4.00–6.00). Temperature and pH were checked at the beginning and at the end of the incubation. Aliquots were removed at defined intervals and subjected to the standard assay (mandelonitrile cleavage, pH 5.00) to determine the residual activity.

Isoelectric focusing: Isoelectric points were determined with Novex isoelectric focusing gels (pH 3–10, Invitrogen) according to the supplier's instructions.

Determination of the native molecular mass: Native molecular masses of wild-type and surfmod-AtHNL were determined with an ÄKTA FPLC system and a HiLoad Superdex G200 gel filtration column (320 mL, GE Healthcare). For calibration, ribonuclease A (13.7 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), ovalbumin (44 kDa), conalbumin (75 kDa), aldolase (158 kDa), and blue dextran (2 MDa) were used according to the pH and buffer used for the corresponding experiment. The native molecular masses of wild-type (2 mg mL⁻¹) and surfmod-AtHNL (3 mg mL⁻¹) were analyzed at pH 7.50 in potassium phosphate buffer (50 mM) and KCl (150 mM). Determination of the native molecular mass of the surfmod-AtHNL at pH 5.00 was performed in citrate/phosphate buffer (50 mM) and NaCl (150 mM).

Preparation of HCN solution in MTBE (2 M): Sodium cyanide (4.9 g, 0.1 mol) was dissolved in a magnetically stirred mixture of water (10 mL) and MTBE (25 mL) at 0 °C. The biphasic system was stirred vigorously for 15 min and aqueous HCl (30%, v/v, 10 mL) was added slowly. This mixture was allowed to warm up slowly to room temperature (over at least 25 min). The phases were separated and MTBE (7 mL) was added to the organic layer. The combined organic phases were stirred and residual water was separated. This procedure was repeated with MTBE (7 mL). The 2 M standard HCN solution was kept over citrate/phosphate buffer (pH 5.50, 50 mM) in the dark. Determination of the HCN concentration was performed as described in the literature.^[16]

Formation of racemic mandelonitrile in a two-phase system: Citrate/phosphate buffer (pH 5.00, 50 mM, 1 mL) and dodecane (0.1 mmol, internal standard) were added under argon at 20 or 0 °C to HCN solution in MTBE (1.5–2 M, 1 mL) and mixed thoroughly by magnetic stirring. The uncatalyzed hydrocyanation was started by addition of benzaldehyde (0.5 mmol). The reaction was monitored by chiral GC over 120 min during which the reaction flask was stirred at the adjusted temperature.

Enantioselective synthesis of cyanohydrins in a two-phase system: Surfmod-AtHNL (0.6–1.0 mg) was dissolved in citrate/phosphate buffer (pH 4.50, 50 mM, 1 mL). HCN solution in MTBE (1.5–2 M, 1 mL), aldehyde (0.5 mmol), and dodecane (0.1 mmol, internal standard) were mixed thoroughly under argon by magnetic stirring. Synthesis was started by addition of surfmod-AtHNL in citrate/phosphate buffer (pH 4.50, 1 mL). The reaction was monitored by chiral GC over 120 min during which the reaction flask was stirred at 0 °C.

Acknowledgements

This project was financed by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) within the framework of the research training group "BioNoCo" GK 1166. D.O. thanks Robert Westphal for fruitful discussions.

Keywords: asymmetric carboligation • cyanohydrins • enzyme stabilization • lyases • protein engineering

- [1] J. Holt, U. Hanefeld, *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 15–37.
- [2] M. Dadashipour, Y. Asano, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1121–1149.
- [3] J. Andexer, J. von Langermann, A. Mell, M. Bocola, U. Kragl, T. Eggert, M. Pohl, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8833–8835; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8679–8681.
- [4] J. Andexer, *PhD Thesis*, University of Düsseldorf (Germany), **2007**, pp. 41–48.
- [5] J. Guterl, J. Andexer, T. Sehl, J. von Langermann, I. Frindt-Wosch, T. Rose-nkranz, J. Fitter, K. Gruber, U. Kragl, T. Eggert, *J. Biotechnol.* **2009**, *141*, 166–173.
- [6] J. von Langermann, J. Guterl, M. Pohl, H. Wajant, U. Kragl, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2008**, *31*, 155–161.
- [7] J. N. Andexer, J. von Langermann, U. Kragl, M. Pohl, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 599–607.
- [8] D. Okrob, M. Paravido, R. V. A. Orru, W. Wiechert, U. Hanefeld, M. Pohl, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2399–2408.
- [9] H. Lauble, K. Decanniere, H. Wajant, S. Förster, F. Effenberger, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1999**, *55*, 904–906.
- [10] K. Henrick, J. M. Thornton, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 358–361.
- [11] E. Krissinel, K. Henrick, *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 774–797.
- [12] J. Guterl, *PhD Thesis*, University of Düsseldorf (Germany), **2008**, pp. 101–103.
- [13] L. Veum, U. Hanefeld, A. Pierre, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10419–10425.
- [14] G. Steinkellner, R. Rader, G. G. Thallinger, C. Kratky, K. Gruber, *BMC Bioinf.* **2009**, *10*, 32.
- [15] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [16] L. M. van Langen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 828–831.
- [17] A. Glieder, R. Weis, W. Skranc, P. Poechlauer, I. Dreveny, S. Majer, M. Wubbolts, H. Schwab, K. Gruber, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4963–4966; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4815–4818.

Received: October 1, 2011

Published online on ■■■, 0000

KAPITEL 4

4. Diskussion

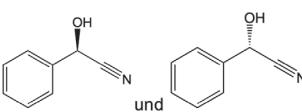
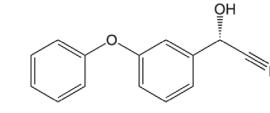
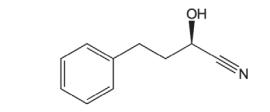
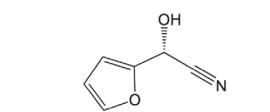
4.1. Die *At*HNL als potentieller technischer Biokatalysator

Enantiomerenreine Cyanhydrine sind wichtige Intermediate zur Synthese verschiedener Pharmazeutika, biologisch aktiven Substanzen und Feinchemikalien (Kapitel 1.3.1).^[16] Die HNL katalysierte Synthese dieser Cyanhydrine findet im industriellen Maßstab in wässrig-organischen Zweiphasensystemen in Rührkesselreaktoren statt.^[17] Derzeit werden hauptsächlich aromatische und heteroaromatische Cyanhydrine biokatalytisch im industriellen Maßstab produziert. Eine Übersicht dieser Produkte, der verwendeten HNLs sowie der erzielten Raum-Zeit-Ausbeuten und Jahresproduktion findet sich in Tab. 1. Patente weisen zudem auf weitere industriell produzierte Cyanhydrine (z.B. (S)-2-Chlormandelsäurenitril, (R)- und (S)-2-hydroxy-3-methylbutannitril) hin, die jedoch aufgrund unspezifischer Angaben zum verwendeten Enzym oder zur Produktivität nicht in die Tabelle aufgenommen wurden.^[158, 162, 164]

Bei derartigen Synthesen liegen die HNLs gelöst in der wässrigen Phase vor, die zur Unterdrückung der spontanen, nicht-stereoselektiven Substratumssetzung einen pH-Wert zwischen pH 3,5 – 4,5 hat (Kapitel 1.3.2).

Aufgrund der geringen pH-Stabilität der *At*HNL konnte diese nicht unter den industriell etablierten Reaktionsbedingungen im wässrig-organischen Zweiphasensystem verwendet werden (Kapitel 1.2.4.4.2). Daher wurden in dieser Arbeit zwei grundlegende Strategien zur Optimierung des Enzyms für die Synthese enantiomerenreiner Cyanhydrine entwickelt (Abb. 19).

Tab. 1: Wichtige Cyanhydrine, die als industrielle Intermediate verwendet werden. Die zur Synthese der Cyanhydrine verwendeten HNLs, die Hersteller und Produktivität der Prozesse sowie die Zielprodukte sind aufgeführt. Tabelle angefertigt nach Purkarthofer, 2007.^[17]

Intermediat	Enzym	Produktivität	Zielprodukt(e)
 (R)- und (S)-Mandelsäurenitril	$P_{a}\text{HNL}$ (heterolog in <i>P. pastoris</i> sekretiv produziert und aus dem Kulturmedium isoliert) $H_{b}\text{HNL}$ (heterolog intrazellulär in <i>E. coli</i> produziert; isoliert verwendet)	jeweils 400 g/L/d (DSM) Jahresproduktion unveröffentlicht (weitere Produzenten: BASF, Nippon Shokubai)	Diastereomere Salze ^a
(R)-2-Chlormandelsäurenitril	$P_{a}\text{HNL}$ (heterolog in <i>P. pastoris</i> sekretiv produziert und aus dem Kulturmedium isoliert)	250 g/L/d (DSM) 10 t jährlich (weitere Produzenten: BASF, Nippon Shokubai)	Blut Gerinnungshemmer ^b
 (S)-3-Phenoxybenzaldehydcyanhydrin	$H_{b}\text{HNL}$ (heterolog intrazellulär in <i>E. coli</i> produziert; als Ganzzellansatz verwendet)	1000 g/L/d (DSM) 10 t jährlich (weiterer Produzent: Nippon Shokubai)	Pyrethroide (Insektizide) ^c
 (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyronitrile	$P_{a}\text{HNL}$ (heterolog in <i>P. pastoris</i> sekretiv produziert und aus dem Kulturmedium isoliert)	200 g/L/d (DSM) 1 t jährlich (weitere Produzent: Nippon Shokubai)	ACE Inhibitoren ^d
 (R)-2-(2-furyl)-2-hydroxyacetonitrile	$H_{b}\text{HNL}$ (heterolog intrazellulär in <i>E. coli</i> produziert; isoliert verwendet)	Unbekannte Tagesvolumen (DSM) mehrere kg jährlich	antivirale Pyridoquinoxaline ^e

^aPurkarthofer^[17], ^bRoos^[165], ^cLiese^[148], ^dOsprian^[166], ^eStrohbach^[156]

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den drei Publikationen zusammenfassend auch im Kontext mit Resultaten aus dieser Arbeit diskutiert, die bisher keinen Eingang in die Publikationen fanden. In diesen Fällen sind experimentelle Details explizit ergänzt worden.

Publikation 1 befasst sich mit unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden der AtHNL für die Anwendung des Enzyms in Puffer-gesättigtem organischen Lösungsmittel (MTBE).

Publikation 2 zeigt, dass die AtHNL nicht nur als gereinigtes immobilisiertes Enzym als stabiler Biokatalysator, sondern auch im Ganzzellsystem für die Synthese chiraler Cyanhydrine in MTBE eingesetzt werden kann.

Publikation 3 beschreibt einen alternativen Ansatz zur Stabilisierung des Enzyms mittels rationalem Proteindesign, wodurch schließlich auch die Anwendung des Enzyms in wässrig-organischen Zweiphasensystemen möglich wird.

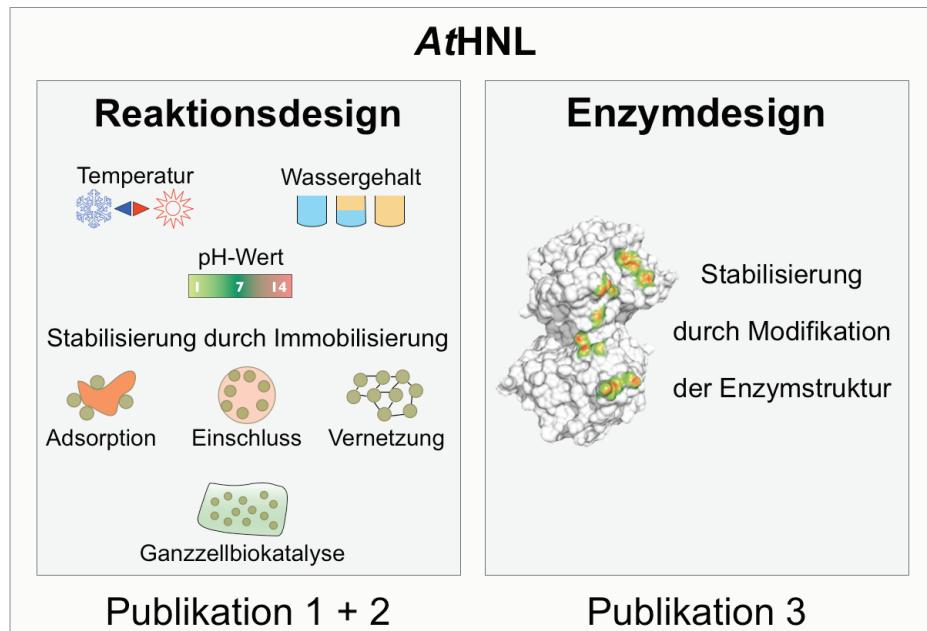


Abb. 19: Schematischer Überblick der Optimierungsstrategien der AtHNL zur Synthese enantiomerenreiner Cyanhydrate. Die in Fachzeitschriften veröffentlichten oder eingereichten Manuskripte sind den verfolgten Strategien zugeordnet.

4.2. Etablierung geeigneter Reaktionsparameter für die AtHNL

Die enantioselektive Synthese von Cyanhydrinen wird von einer nicht-katalysierten racemischen Produktbildung begleitet, die durch den pH-Wert, die Temperatur und den Wassergehalt des Reaktionsmediums beeinflusst wird (Abb. 19). Werden HNLs zur enantioselektiven Synthese von Cyanhydrinen in Reaktionsmedien mit hohem Wassergehalt eingesetzt, so kann die Unterdrückung der nicht-katalysierten Reaktion nur durch die Herabsetzung des pH-Wertes ($\leq 4,5$) und der Temperatur ($\leq 10^{\circ}\text{C}$) erreicht werden. Die nicht-katalysierte Nebenreaktion kann nur in Gegenwart von OH^- -Ionen ablaufen, die zur Deprotonierung der Blausäure (zum Cyanidion) führen. Diese Cyanidionen addieren dann nucleophil an die Carbonylkomponente unter Bildung eines Cyanhydrins. Im sauren Millieu ($\leq \text{pH } 4,5$) wird die Deprotonierung der Blausäure unterdrückt, sodass hauptsächlich die Enzym-katalysierte Reaktion abläuft. Die Reduktion des Wassergehalts, z.B. durch den Einsatz von organischen Lösungsmitteln ermöglicht ebenfalls die Reduktion der OH^- -Ionen innerhalb des Reaktionsmediums und stellt somit eine weitere Option zur enantioselektiven HNL-katalysierten Cyanhydrin-Synthese dar.

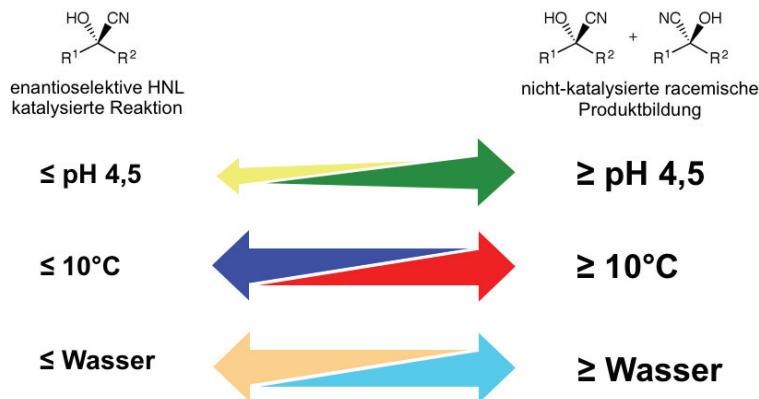


Abb. 20: Gegenüberstellung von Reaktionsparametern, die zur enantioselektiven bzw. racemischen Cyanhydrinbildung führen.

Die AtHNL zeigt bei pH 5,0 bereits eine sehr geringe Halbwertszeit von 10 min und kann aufgrund dessen nicht unterhalb von pH 5,0 eingesetzt werden. Wird eine Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril bei pH 5,0 und einer Temperatur von 20°C in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem durchgeführt, so sinkt aufgrund der

unter diesen Bedingungen begünstigten racemischen Produktbildung der Enantiomerenüberschuss (ee) des gebildeten (*R*)-Mandelsäurenitrils auf 78 % (Abb. 21).

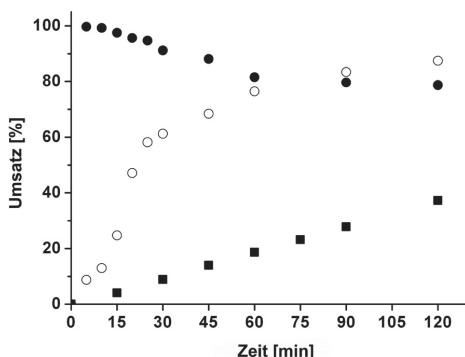


Abb. 21: AtHNL-katalysierte Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril (○) in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem bei pH 5,0. Wässrige Phase: 50 mM Citrat-Phosphatpuffer, 1,4 mg AtHNL; organische Phase: MTBE; Substrate: 0,5 mmol Benzaldehyd, 1,5 mmol HCN; Temperatur: 20°C. Enantiomerenüberschuss der Reaktion (●). Racemische Produktbildung durch die nicht enzymatische Nebenreaktion (■).

Wird der pH-Wert beibehalten und die Temperatur von 20 °C auf 0 °C gesenkt, so sinkt die racemische Produktbildung innerhalb des Messzeitraums (120 min) von 37 % auf 4,2 %. Trotz dieser Reduktion um 88 % ist der Anteil der nicht enzymatischen Reaktion aber noch zu hoch, um bei einer HNL-katalysierten Reaktion einen ee \geq 99 % zu erreichen. Ein Absenken des pH-Werts auf pH 4,5 bei 0 °C würde zu einer weiteren Reduktion der nicht-selektiven Reaktion auf \leq 1,8% Substratumsatz führen, wodurch bei einer HNL katalysierten Synthese ee-Werte \geq 99 % erreicht werden könnte (Abb. 22). Diese Reaktionsbedingungen sind jedoch mit der AtHNL aufgrund ihrer geringen pH-Stabilität nicht anwendbar.

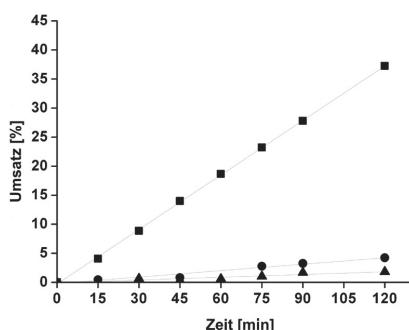


Abb. 22: Nicht enzymatische racemische Bildung von (R)-Mandelsäurenitril bei pH 5,0 und pH 4,5. Bei pH 5,0 kann die racemische Produktbildung von 37 % (20 °C, ■) auf 4,2 % durch das Absenken der Temperatur auf 0 °C (●) reduziert werden. Bei pH 4,5 und 0 °C wird die nicht-selektive Produktbildung auf 1,8 % (▲) reduziert.

Durch Austausch des wässrigen Puffers gegen ein Puffer-gesättigtes organisches Lösungsmittel kann die nicht enzymatische Reaktion nahezu vollständig unterbunden werden. Vorteilhaft ist, dass der pH-Wert des Puffers, mit dem das organische Lösungsmittel gesättigt wird und das zum Lösen des Enzyms verwendet wird sowie die Temperatur bei diesem Reaktionssystem nur sehr geringe Auswirkungen auf den Enantiomerenüberschuss des gebildeten Produkts haben (Kapitel 1.3.2). Ein geringer Wasseranteil im organischen Lösungsmittel ist dabei unerlässlich für den Erhalt der Hydrathülle des Enzyms und somit seine katalytische Aktivität und Selektivität.^[111]

Bei der Wahl geeigneter organischer Lösungsmittel für Arbeiten mit der *AtHNL* waren Erfahrungen mit der strukturell ähnlichen *HbHNL* wertvoll. Diisopropylether (DIPE) und Methyl-*tert*-butyether (MTBE), jeweils mit Citrat-Phosphatpuffer und HCN (0,5 - 2 mmol) versetzt, werden als optimal für eine hohe Enzymstabilität beschrieben.^[110] Im Gegensatz zu DIPE bildet MTBE keine explosiven Peroxide bei Kontakt mit Luft und weist zudem eine höhere Sättigungsgrenze mit Wasser bzw. wässrigem Puffer auf (~4 vol% Wasser oder Puffer sind löslich, ohne Bildung eines Zweiphasen-Systems), sodass MTBE als Reaktionsmedium ausgewählt wurde.

Der Umgang mit Blausäure ist aufgrund ihrer hohen Toxizität gefährlich und erfordert das permanente Arbeiten in geschlossenen Reaktionssystemen unter einem geeigneten Laborabzug. Um die Destillation von Blausäure (ausgehend von in saurem Wasser gelöstem Natriumcyanid) zu umgehen, wurde eine direkte Extraktion der Blausäure aus der wässrigen Phase in das als Reaktionsmedium fungierende

MTBE durchgeführt. Die erhaltene HCN-MTBE Lösung wies eine Blausäurekonzentration zwischen 1,5 und 2 M auf.

Aufgrund der hohen Flüchtigkeit von Blausäure sollte diese während der enzymatischen Reaktion in mindestens 2- bis 3-fachem Überschuss zur Carbonylkomponente eingesetzt werden, um deren vollständigen Umsatz zu erreichen. Aus diesem Grund wurde die Konzentration der frisch destillierten Carbonylkomponente auf 0,5 M festgelegt.

Die Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril zeigte, dass die gereinigte *AtHNL* zwar in dem einphasigen MTBE präzipitiert, jedoch eine enantiomerenreine Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril ($ee \geq 99,7\%$) bis zum nahezu vollständigen Substratumsatz ($\geq 98\%$) ermöglicht. Aufgrund der thermischen Instabilität des Produkts und einer fortschreitenden Inaktivierung des Enzyms sinkt der ee nach Erreichen des vollständigen Substratumsatzes um $0,3\% h^{-1}$. Dies könnte durch die Aufarbeitung des Produkts oder einer Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Aufarbeitung unterbunden werden.

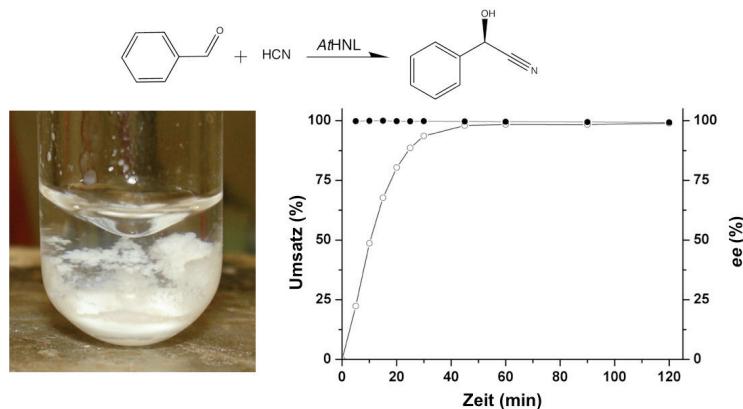


Abb. 23: *AtHNL*-katalysierte Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril in Puffer-gesättigtem MTBE. Links: Foto der präzipitierten *AtHNL* während der Reaktion (Reaktionsvolumen 1 ml). Rechts: Gemessener Substratumsatz (○) und Enantiomerenüberschuss (●). Ausgehend von 0,5 mmol Benzaldehyd und 1,5 mmol HCN wurde innerhalb von 45 min ein nahezu vollständiger Substratumsatz von 97 % zu (*R*)-Mandelsäurenitril mit einem $ee \geq 99,7\%$ mit 5 mg isolierter *AtHNL* (gelöst in 50 μ l 50 mM Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,5) erreicht. (Modifiziert nach Publikation 1, Fig. 1A)

Des Weiteren wurde geprüft, ob die enantioselektive Synthese von weiteren relevanten Cyanhydrinen möglich ist (Abb. 24). Dazu wurden Synthesen von (*R*)-2-Chlormandelsäurenitril, (*2S*)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitril und (*R*)-2-Hydroxyheptannitril, durchgeführt. Die beiden zuletzt genannten Cyanhydrine werden derzeit

nicht industriell genutzt, (2S)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitril stellt jedoch ein relevantes Intermediat zu Synthese der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-geschützten (2S,3S)-2-Hydroxy-3-Aminosäuren dar^[167] und (R)-2-Hydroxyheptannitril diente als aliphatisches Beispielsubstrat. In jedem Fall konnte ein vollständiger Substratumsatz erreicht werden. Der Enantiomerenüberschuss des gebildeten (R)-2-Chlormandelsäurenitrils und des (2S)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitrils lag bei $\geq 99\%$ und für (R)-2-Hydroxyheptannitril bei $\geq 95\%$.

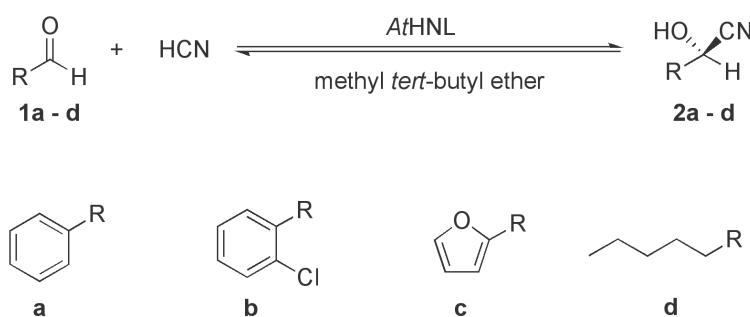


Abb. 24: AtHNL-katalysierte Synthese von industriell relevanten Cyanhydrinen. Ausgehend von Benzaldehyd, 2-Chlorbenzaldehyd, Furfural oder Hexanal wurde enzymatisch das jeweilige Cyanhydrin synthetisiert (Publikation 1: Scheme 1).

Nachdem geeignete Reaktionsparameter zur Synthese von enantiomerenreinen Cyanhydrinen identifiziert werden konnten, wurde das Augenmerk auf die Wiederverwendbarkeit einer Enzymcharge für mehrere Synthesezyklen gelegt. Zwar präzipitiert die AtHNL in aktiver Form in dem einphasigen MTBE, jedoch wird durch die Instabilität des Präzipitats ein Abfiltrieren, Waschen und Wiederverwenden des Enzyms erschwert. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von verschiedenen Immobilisierungsmethoden auf die AtHNL untersucht.

4.3. Synthese von industriell relevanten Cyanhydrinen mittels immobilisierter AtHNL

Technisch relevante HNLs, wie die *MeHNL*, *HbHNL* und *PaHNL* wurden bereits auf verschiedene Weise (hauptsächlich für Laborverfahren) immobilisiert, um sie in stabiler Form in einphasigen organischen Lösungsmitteln einsetzen zu können. Die verwendeten Methoden umfassten, wie in Kapitel 1.4.1 dargestellt, z.B. die adsorptive Bindung an Kieselgur (Celite), Cellulose und Nitrocellulose; das Quervernetzen von Enzymkristallen (CLECs) oder gefällten Enzymen (CLEAs); oder den Einschluss in Hydrogelen.^[96, 140, 168-171]

Um eine Wiederverwendung der AtHNL für mehrere Reaktionszyklen zu ermöglichen, wurde sie durch drei unterschiedlichen Methoden immobilisiert:

Die AtHNL wurde mittels adsorptiver Bindung an Celite R-633 Partikel gebunden (Celite-AtHNL; Publikation 1), in ein Solgel mit reduziertem Methanolgehalt eingeschlossen (Solgel-AtHNL; Publikation 1) und zu AtHNL-CLEAs quervernetzt (nicht veröffentlicht). Zudem wurde die Anwendbarkeit der Ganzzellbiokatalyse zur enantioselektiven Synthese von Cyanhydrinen mit rekombinanten *E. coli* Zellen untersucht (Publikation 2).

Im Folgenden werden die verschiedenen Immobilisierungsmethoden, deren Auswirkung auf die Enzymaktivität und Stabilität der AtHNL sowie die Produktivität aller Enzympräparationen vergleichend diskutiert.

4.3.1. Die Reinigung von HNLs und der Einsatz ganzer Zellen

Die Verwendung von isolierten Enzymen erfordert immer die Reinigung des Enzyms. Dabei kann eine schnell durchführbare Teilreinigung durch Fällung oder Ultrafiltration oder eine (nahezu) vollständige Reinigung unter Verwendung chromatographischer Verfahren durchgeführt werden. Die Sekretion von Enzymen ins Expressionsmedium, wie z.B. bei der heterologen Expression der *PaHNL* in *Pichia pastoris*, ermöglicht eine schnelle Teilreinigung durch die Trennung der Expressionszellen vom Kulturüberstand und eine anschließende Aufkonzentrierung des sekretierten Enzyms mittels Ultrafiltration.^[55] Bei der intrazellulären Expression kann eine Teilreinigung des Enzyms durch den Aufschluss der rekombinanten Zellen und die anschließende Abtrennung des HNL-haltigen Rohzellextrakts von den

Zelltrümmern erreicht werden. Für industrielle Maßstäbe werden aus Zeit- und Kostengründen nur teilgereinigte HNLs verwendet, sofern keine Nebenprodukte bei der Biokatalyse auftreten. Der Einsatz teilgereinigter *PaHNL* (65 % HNL) für die Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril ist bereits erfolgreich gezeigt worden.^[172] Für analytische Zwecke sollten die Enzyme jedoch in gereinigter Form mit mind. 90 % Reinheit vorliegen, um z.B. ihre katalytische Effizienz exakt bestimmen zu können.^[173] Hierzu sind entsprechende chromatographische Trennungsschritte erforderlich.^[174]

Für die Immobilisierungsuntersuchungen der *AtHNL* in dieser Arbeit wurde isoliertes Enzym mit 90 %iger Reinheit verwendet, um eine exakte Aussage über den Einfluss der angewendeten Immobilisierungsmethode auf die *AtHNL* geben zu können. Zwar ist die Verwendung dieser Enzympräparation für technische Zwecke nicht rentabel, jedoch liefert sie gute Anhaltspunkte für die mögliche spätere Etablierung eines technischen Verfahrens mit teilgereinigtem Enzym.

Im Gegensatz zur Enzymreinigung erfordert der Einsatz ganzer Zellen für einen biokatalytischen Prozess lediglich die Abtrennung der Zellen vom Kultivierungsmedium. Prozessabhängig kann dabei die Zellwand permeabilisiert werden, um eine Steigerung der katalytischen Effizienz zu erreichen (Kapitel 1.4.2). Die Ganzzellbiokatalyse stellt das kostengünstigste Verfahren dar und wurde aus diesem Grund ebenfalls mit *E. coli* Expressionszellen der *AtHNL* untersucht.

4.3.1.1. Vergleich der *AtHNL*-Präparationsmethoden

Ein direkter Vergleich der Präparationsmethoden zur Immobilisierung der *AtHNL* und der Aufarbeitung aus rekombinanten Zellen (als Ganzzellbiokatalysator) ermöglicht die Bewertung des Zeit- und Materialaufwands. Methoden mit hohem Zeit- und Materialaufwand sind kostenintensiver und sollten dementsprechend im Idealfall bei der späteren Anwendung der Enzympräparation zu einer höheren Langlebigkeit des Enzyms und somit zu einer Steigerung der Prozessrentabilität führen.

Beim Zeitaufwand sollte zudem die aktive Präparationszeit, d.h. die Zeit, in der Präparationsschritte manuell durchgeführt werden müssen, von der passiven Präparationszeit (z.B. Trocknungszeit) unterschieden werden.

Die in Tab. 2 zusammengestellten Methoden zur *AtHNL*-Präparation werden im Folgenden näher beschrieben. Dabei muss berücksichtigt werden, dass für die *AtHNL*-Immobilisierung isoliertes Enzym verwendet wurde und der Zeitaufwand für die Enzymreinigung in Tab. 2 nicht berücksichtigt wurde.

Tab. 2: Gegenüberstellung der Präparationsmethoden der *AtHNL*.

Methode	Reinheitsgrad der <i>AtHNL</i>	Material	Präparations-schritte	Zeitauf-wand
Celite Adsorption	gereinigt oder teilgereinigt in Pufferlösung	Celite R-633 (0,70 Euro pro kg) Exsikkator zur Trocknung	1. Benetzen der Partikel mit Enzymlösung; 2. Trocknen	Aktiv: 0,2 h Passiv: 16 h
Solgel Einschluss	gereinigt oder teilgereinigt in Pufferlösung	Tetramethoxysilane (170 Euro pro L), Methyltrimethoxysilane, (105 Euro pro L) Wasser (pH 2,85), Rotationsverdampfer, Laborabzug, Magnetrührer	1. Herstellung des Polymergemischs; 2. Verdampfen des Methanols; 3. Mischung von Enzymlösung und gelierendem Solgel 4. Lagerung bei 4 °C 5. Zermahlen des Solgels	Aktiv: 2 h Passiv: 16 h
CLEA Quervernetzung	gereinigt oder teilgereinigt in Pufferlösung	ges. Salzlösung oder org. Lösungsmittel, Glutardialdehyd, (160 Euro pro 100 ml) Magnetrührer, Zentrifuge, Eis bzw. Kühlaggregat, Exsikkator oder Lyophylle zur Trocknung	1. Fällung des Enzyms durch ges. Salzlösung oder org. Lösungsmittel 2. Trennung durch Zentrifugation 3. Quervernetzen 4. mehrfache Waschschritte 5. Trocknung	Aktiv: 3 h Passiv: 24-35 h
Ganzzell-ansatz	rek. <i>E. coli</i> /BL21(DE3)-Zellen	Zentrifuge, Laborabzug, org. Lösungsmittel	1. Zellpelletierung mittels Zentrifugation 2. Trocknung des Zellpellets durch Waschschritte in org. Lösungsmittel	Aktiv: 0,5 h Passiv: -

Die Präparation von adsorptiv an Celite-Partikel gebundener *AtHNL* ist durch das Benetzen der Celite Partikel mit in Puffer gelöster *AtHNL* und dem anschließenden Trocknen unter Vakuum sehr einfach. Diese Methode benötigt ca. 15 min aktiven Arbeitsaufwand, sowie ca. 16 h Trocknungszeit. Es werden keine giftigen Substanzen verwendet, sodass die Präparation keinen besonderen

Sicherheitsaufwand benötigt. Außerdem ist das Trägermaterial mit 70 Cent/kg sehr preiswert.

Die Präparation von in Solgel eingeschlossener *AtHNL* ist aufwändiger und erfordert den Einsatz von brandgefährlichen bzw. giftigen Ausgangsstoffen. Das Entfernen des giftigen Methanols (Rotationsverdampfung), welches bei der Polymerisation des Solgels freigesetzt wird, erfordert zudem besondere Vorsichtsmaßnahmen. Insgesamt werden ca. 2 h aktive Präparationszeit, sowie 16 h für einen Inkubationsschritt bei 4 °C beansprucht.

Das Quervernetzen von gefällter *AtHNL* zu CLEAs ist die aufwändigste Methode. Sie setzt zunächst die Etablierung eines geeigneten Präparationsprotokolls voraus, was mehrere Wochen in Anspruch nehmen kann und ist zudem durch viele Zentrifugations- und Resuspendierungsschritte fehleranfällig. Insgesamt werden ca. 3 h für die aktive Präparation und 24 – 35 h für Inkubationen und Trocknung benötigt. Gegenüber der Immobilisierung der *AtHNL* ist das Aufarbeiten rekombinanter *E. coli*-Zellen sehr einfach und innerhalb von 30 min durchführbar: Die Zellen einer Expressionskultur werden mittels Zentrifugation pelletiert und anschließend durch die mehrfache Resuspendierung in organischem Lösungsmittel (MTBE) weitestgehend getrocknet.

Im Folgenden wird zuerst die Auswirkung der Immobilisierung auf die Aktivität der *AtHNL* beschrieben und anschließend die Produktivität von isolierter und immobilisierter *AtHNL* sowie des Ganzzellansatzes verglichen.

4.3.2. Synthese von (*R*)-Cyanhydrinen mittels immobilisierter *AtHNL* und durch Ganzzellbiokatalyse

Die Aktivität der immobilisierten *AtHNL* wurde anhand der Synthesen von (*R*)-Mandelsäurenitril, (2S)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitril, (*R*)-2-Chlormandelsäure-nitril und (*R*)-2-Hydroxyheptannitril untersucht.

Vor dem Vergleich wurde die Enzymladung der Träger optimiert, sodass die Präparationen einen vergleichbaren Substratumsatz bei der Cyanhydrin-synthese zeigten. Anschließend wurden die relative Enzymaktivität und die Selektivität der immobilisierten *AtHNL* mit dem präzipitierten Enzym unter gleichen Reaktionsbedingungen verglichen. Ein Vergleich der Enzymaktivität konnte lediglich

zwischen präzipitierter und immobilisierten AtHNL durchgeführt werden, da beim Ganzzellansatz die eingesetzte (aktive) Enzymmenge nicht bestimmbar war.

4.3.2.1. Trägerbeladung und Etablierung der immobilisierten AtHNL

Um einen direkten Vergleich zur präzipitierten AtHNL durchführen zu können, wurde die Enzymsbeladung der Celite-Partikel und des Solgels optimiert, sodass Synthesen von (*R*)-Mandelsäurenitril mit vergleichbaren Substratumsätzen erzielt werden konnten. Die Enzymkonzentration wurde dabei so eingestellt, dass nach 120 min ein vollständiger Substratumsatz erreicht wurde.

4.3.2.1.1. Präparation von Celite-AtHNL

Für die Immobilisierung auf Celite erwies sich eine Trägerbeladung im Verhältnis 1 : 4 (Enzym : Träger) als geeignet, um beim Einsatz von 30 mg Celite-AtHNL (entspricht 7,5 mg AtHNL) einen vergleichbaren Substratumsatz und Enantiomerenüberschuss ($ee \geq 99\%$) zur präzipitierten AtHNL unter gleichen Reaktionsbedingungen zu erreichen (Abb. 25).

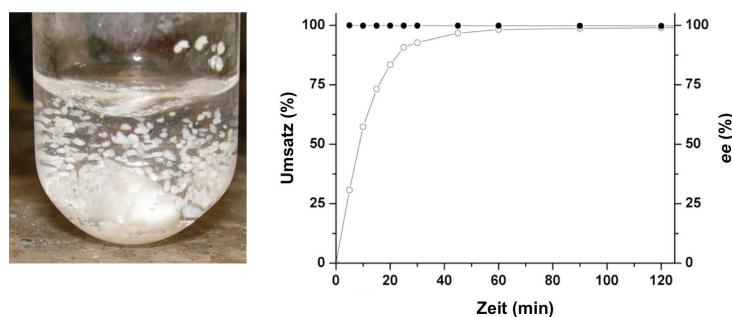


Abb. 25: Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril mittels Celite-AtHNL. Links: Foto des Reaktionsgefäßes (Reaktionsvolumen 1 ml). Rechts: Gemessener Substratumsatz (○) und Enantiomerenüberschuss (●). Ausgehend von 0,5 mmol Benzaldehyd und 1,5 mmol HCN wurde innerhalb von 45 min ein nahezu vollständiger Substratumsatz von 96 % zu (*R*)-Mandelsäurenitril mit einem $ee \geq 99,8\%$ mit 30 mg Celite-AtHNL (entspricht 7,5 mg isolierter AtHNL) erreicht. (Modifiziert nach Publikation 1, Fig. 1B)

4.3.2.1.2. Präparation von Solgel-AtHNL

Für den Solgel-Einschluss der AtHNL zeigte die Verwendung einer Enzymlösung mit 50 mg ml⁻¹ und ein Mischverhältnis von 1 : 1 (Solgel Ausgangsstoffe : Enzymlösung (v/v)) die besten Ergebnisse. Die Enzymkonzentration der Solgel-immobilisierten AtHNL variierte je nach Charge leicht, sodass zwischen 150 und 175 mg Solgel-AtHNL 5 mg isolierte AtHNL enthielten. Der Einsatz von Solgel-AtHNL führte bei der Synthese von (R)-Mandelsäurenitril zu einer sehr schnellen Substratumsetzung mit ee ≥ 99 % (Abb. 26).

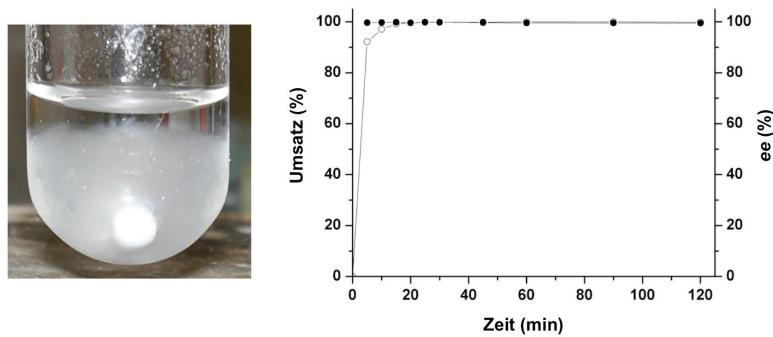


Abb. 26: Synthese von (R)-Mandelsäurenitril mittels Solgel-AtHNL. Links: Foto des Reaktionsgefäßes (Reaktionsvolumen 1 ml). Rechts: Gemessener Substratumsatz (○) und Enantiomerenüberschuss (●). Ausgehend von 0,5 mmol Benzaldehyd und 1,5 mmol HCN wurde innerhalb von 10 min ein nahezu vollständiger Substratumsatz von 97 % zu (R)-Mandelsäurenitril mit einem ee ≥ 99,5 % mit 165 mg Solgel-AtHNL (entspricht 5 mg isolierter AtHNL) erzielt. (Modifiziert nach Publikation 1, Fig. 1C)

4.3.2.1.3. Etablierung eines Herstellungsprotokolls für AtHNL-CLEAs

Die Etablierung eines Protokolls zur Herstellung von AtHNL-CLEAs mit einer hohen Restaktivität bedurfte einer mehrwöchigen Studie. Die Kombination aus verschiedenen organischen Lösungsmitteln bzw. gesättigten Salzlösungen zur Fällung der AtHNL und der Zugabe von 0,5 – 2,0 vol% des Vernetzungsreagens Glutardialdehyd zeigte, dass die Enzymfällung mittels ges. Ammoniumsulfatlösung und dem anschließenden Quervernetzen durch die Zugabe von 0,5 vol-% Glutardialdehyd zu AtHNL-CLEAs mit 29 % Restaktivität führt (Abb. 27). Eine

geringe enzymatische Restaktivität wurde zuvor auch bei *PaHNL*-CLEAs (9,6 % Restaktivität) und *HbHNL*-CLEAs (16 % Restaktivität) beobachtet.^[168, 171]

Problematisch bei der *AtHNL*-CLEA Präparation war der Trocknungsschritt, der zu unterschiedlichen Porengrößen führte und somit maßgeblich die Enzymaktivität beeinflusste. Trockneten die *AtHNL*-CLEAs zu einem porösen Granulat, so wurde eine Restaktivität von 27 – 29 % erreicht. In manchen Fällen trockneten in gleicher Weise präparierte *AtHNL*-CLEAs jedoch zu kompakten Partikeln, die eine Restaktivität von max. 10 % aufwiesen. Optimierungsversuche des Präparationsprotokolls führten zu keiner hinreichenden Reproduzierbarkeit, sodass lediglich Synthesen mit ausgewählten Substraten durchgeführt wurden.

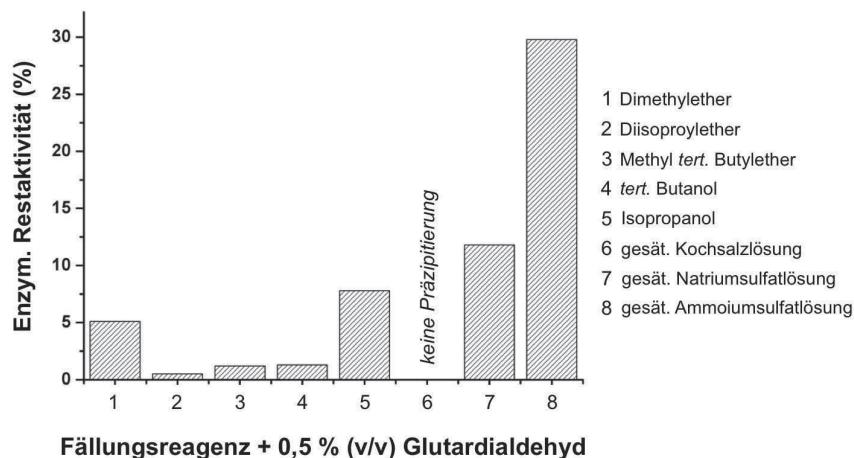


Abb. 27: Katalytische Restaktivität von präparierten *AtHNL*-CLEAs. Die katalytische Aktivität der *AtHNL* wurde vor und nach der Fällung anhand der Spaltung von Mandelsäurenitril bestimmt und in Relation zur Ursprungsaktivität der eingesetzten *AtHNL* gesetzt. Die *AtHNL* wurde durch Zugabe von 70 % (v/v) 1-9 präzipitiert und anschließend für 0,5 – 16 h mittels Glutardialdehyd (0,5 vol%) quervernetzt.

Die Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril unter Verwendung von 5 mg *AtHNL*-CLEAs führte zu keinem vollständigen Substratumsatz innerhalb von 120 min. Erst der Einsatz von 17 mg *AtHNL*-CLEA lieferte einen vergleichbaren Substratumsatz zur präzipitierten *AtHNL*, sodass die Quervernetzung offensichtlich zu einem starken Aktivitätsverlust jedoch mit gleichbleibender Enantioselektivität (*ee* ≥ 99 %) geführt hat (Abb. 28).

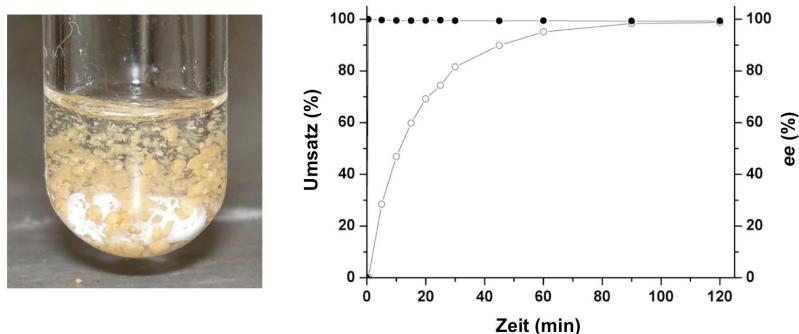


Abb. 28: AtHNL-CLEA katalysierte Synthese von (R)-Mandelsäurenitril in einphasigem MTBE. Links: Foto der AtHNL-CLEAs während der Reaktion (Reaktionsvolumen 1 ml). Rechts: Gemessener Substratumsatz (○) und Enantiomerenüberschuss (●). Ausgehend von 0,5 mmol Benzaldehyd und 1,5 mmol HCN wurde innerhalb von 90 min ein nahezu vollständiger Substratumsatz von 97 % zu (R)-Mandelsäurenitril mit einem ee $\geq 99,6$ % mit 17 mg AtHNL-CLEAs erreicht.

Die Berechnung der Enzymaktivität von immobilisierter AtHNL im Vergleich zur präzipitierten AtHNL erfolgte anschließend anhand der Synthesen verschiedener Cyanhydrine und wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

4.3.3. Gegenüberstellung der Enzymaktivität und Selektivität verschiedener AtHNL-Präparationen

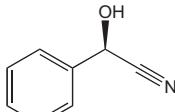
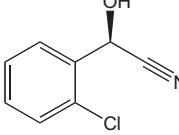
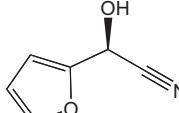
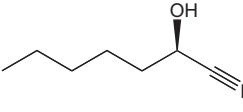
Die Immobilisierung von Enzymen hat Einfluss auf die Enzymflexibilität, wodurch z.B. die Aktivität und Selektivität verändert werden können. Zusätzlich wird auch die Diffusion der Substrate und Produkte beeinflusst, sodass z.B. eine reduzierte Enzymaktivität aufgrund einer schlechteren Substratverfügbarkeit oder einer Inhibierung durch akkumulierendes Produkt auftreten kann.

Der Vergleich der Effektivität von immobilisierter AtHNL zum präzipitierten Enzym wurde anhand der Synthesen von (R)-Mandelsäurenitril, (2S)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitril, (R)-2-Chlormandelsäurenitril und (R)-2-Hydroxyheptannitril durchgeführt. Dazu wurde die eingesetzte Enzymmenge auf 5 mg normiert und wegen des schnellen Substratumsatzes, der technisch eine Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit unmöglich machte, die Zeit bis zum Erreichen von 50 % Substratumsatz betrachtet. Die Reaktionszeit der präzipitierten AtHNL diente als Referenzwert (100 %).

4.3.3.1. Vergleichende Cyanhydrinsynthesen

In Tab. 3 sind die verschiedenen *AtHNL*-Präparationen bezüglich ihrer Effizienz zur Synthese verschiedener Cyanhydrine zusammengestellt. Anhand der Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril soll die Berechnung der relativen Aktivitäten im Folgenden kurz erläutert werden. (*R*)-Mandelsäurenitril konnte mit jeder Enzympräparation bis zum vollständigen Substratumsatz mit $\geq 99\%$ ee synthetisiert werden. Jedoch wurde ein Substratumsatz von 50 % mit präzipitierter *AtHNL* erst nach 9,0 min erreicht, wohingegen mit Solgel-*AtHNL* der gleiche Umsatz bereits nach 1,3 min erzielt wurde. Der Substratumsatz der Solgel-*AtHNL* verlief also 6,71-fach schneller (671 % Enzymaktivität im Vergleich zur präzipitierten *AtHNL*). Demgegenüber zeigen Celite-*AtHNL* (78 % Enzymaktivität) und *AtHNL*-CLEAs (27 %) eine reduzierte Enzymaktivität im Vergleich zum präzipitierten Enzym (Tab. 3).

Tab. 3: Relative Enzymaktivität von präzipitierter und immobilisierter AtHNL (Celite, Solgel und CLEA) bei der Synthese verschiedener Cyanhydrine. Die Enzymmenge ist auf 5 mg AtHNL normiert. 100 % entspricht der benötigten Zeit bis 50 % Substrat von der präzipitierten AtHNL zum entsprechenden Cyanhydrin umgesetzt wurden. Benötigt eine Präparation $\frac{1}{5}$ dieser Zeit, so beträgt die entsprechende Enzymaktivität 500 %. Der erzielte Enantiomerenüberschuss der Produkte ist in Klammern angegeben.

Cyanhydrin	Präzipitierte AtHNL	Celite-AtHNL	Solgel-AtHNL	AtHNL-CLEAs
 (R)-Mandelsäureenitril	100 (ee \geq 99 %)	78 (ee \geq 99 %)	671 (ee \geq 99 %)	27 (ee \geq 99 %)
 (R)-2-Chlormandelsäureenitril	100 (ee \geq 99 %)	86 (ee \geq 99 %)	1031 (ee \geq 99 %)	27 (ee \geq 99 %)
 (2S)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitril	100 (ee \geq 99 %)	76 (ee \geq 98 %)	176 (ee \geq 99 %)	6 (ee \geq 99 %)
 (R)-2-Hydroxyheptannitril	100 (ee \geq 95 %)	57 (ee \geq 86 %)	86 (ee \geq 58 %)	nicht bestimmt

Eine vergleichbare Relation der Enzymaktivitäten und ein gleichbleibend sehr guter Enantiomerenüberschuss ($\geq 98\%$) konnte bei der Synthese des aromatischen (R)-2-Chlormandelsäureenitril und des heteroaromatischen (2S)-Furan-2-yl(hydroxy)-ethannitril beobachtet werden (Tab. 3).

4.3.3.1.1. Solgel-AtHNL zeigt die höchste Enzymaktivität

Die höchste Enzymaktivität, mit einer 10-fach gesteigerten Aktivität, konnte bei der Synthese von (*R*)-2-Chlormandelsäurenitril mittels Solgel-AtHNL (relative Aktivität: 1031 %) erreicht werden. Der starke Aktivitätszuwachs relativ zum nicht immobilisierten Enzym wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal bei einer Solgel-immobilisierten HNL unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen beobachtet. Zuvor war eine Steigerung der Enzymaktivität lediglich bei immobilisierten Lipasen beobachtet worden, die vermutlich in einer hyperaktivierten Form mit geöffneter Deckelstruktur oberhalb des aktiven Zentrums (*open lid*) immobilisiert werden konnten.^[175] HNLs sind zwar strukturell mit Lipasen verwandt, weisen jedoch keine Deckelstruktur über dem Eingang des aktiven Zentrums auf, sodass die *open lid* Theorie nicht auf sie angewendet werden kann. Die Aktivitätssteigerung der Solgel-AtHNL wird vermutlich durch den Einschluss des in Puffer gelösten Enzyms und die damit einhergehende wesentlich höhere Enzymflexibilität in dieser mikro-wässrigen Umgebung verursacht. Zudem trägt die große Oberfläche des fein gemahlenen Solgels zu einer guten Diffusion der Substrate bei. Dabei scheint die Wasserkonzentration innerhalb des Solgels niedrig genug zu sein, sodass bei aromatischen Substraten die nicht-katalysierte racemische Produktbildung nicht auftritt. Bei den von der AtHNL nicht favorisierten aliphatischen Substraten wie Hexanal (Produkt: (*R*)-2-Hydroxyheptannitirl) wurde diese Steigerung der Enzymaktivität relativ zum präzipitierten Enzym nicht beobachtet.

4.3.3.1.2. Celite-AtHNL zeigt eine leicht reduzierte Enzymaktivität

Celite-AtHNL zeigte bei der Synthese der aromatischen bzw. heteroaromatischen Cyanhydrine mit 76 – 86 % nur eine geringfügig niedrigere Restaktivität als das nicht immobilisierte Enzym. Der leichte Aktivitätsverlust ist vermutlich auf Enzymaktivierung bei der Präparation der Celite-AtHNL, die geringere Enzymflexibilität und eine eventuell höhere Diffusionsbarriere zurückzuführen.

4.3.3.1.3. AtHNL-CLEAs verlieren viel Enzymaktivität und sind schlecht präparierbar

AtHNL-CLEAs zeigten die mit Abstand geringste Restaktivität bei der Umsetzung von aromatischen und heteroaromatischen Substraten. Dabei konnten die eingesetzten aromatischen Substrate (Benzaldehyd und 2-Chlorbenzaldehyd) mit einer Restaktivität von 27 % und das heteroaromatische Substrat (Furfural) mit 6 % Restaktivität im Vergleich zur präzipitierten AtHNL umgesetzt werden. Der starke Aktivitätsverlust ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die stark eingeschränkte Enzymflexibilität, bedingt durch die kovalente Quervernetzung, zurückzuführen. Aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit bei zugleich hohem Präparationsaufwand, wurde auf weitergehende Studien mit AtHNL-CLEAs verzichtet.

4.3.3.1.4. Bei der (*R*)-2-Hydroxyheptannitirl-Synthese ist der Einfluss der Enzympräparation besonders groß

Bei der Synthese des aliphatischen (*R*)-2-Hydroxyheptannitirils zeigte die präzipitierte AtHNL die höchste Enzymaktivität mit dem höchsten ee (95 %). Celite-AtHNL zeigte eine relative Enzymaktivität von 57 % mit einem ee von 86 %, wohingegen Solgel-AtHNL eine Enzymaktivität von 86 % mit dem niedrigsten ee ≥ 58 % aufwies (Tab. 3).

Der Grund für den geringeren Enantiomerenüberschuss des von der Celite- und Solgel-AtHNL katalysierten (*R*)-2-Hydroxyheptannitirl-Synthese konnte in einem Kontrollexperiment aufgeklärt werden: Das Trägermaterial und der Wassergehalt fördert die racemische Produktbildung. Dies wird im folgenden Kapitel näher beleuchtet.

4.3.4. Der Einfluss des Wassergehalts auf die Synthese von Cyanhydrinen

Der Wassergehalt innerhalb des einphasigen MTBEs hat in Abhängigkeit von der als Substrat verwendeten Carbonylkomponente unterschiedlichen Einfluss auf die Reaktion. Wie Andexer *et al.* 2007 zeigen konnten, verläuft die nicht-enzymatische Nebenreaktion mit sehr unterschiedlicher Geschwindigkeit.^[74] Für Hexanal und Cyclohexanon ist die nicht-enzymatische Reaktion besonders schnell. Somit ist bei diesen Substraten eine besonders starke Auswirkung des Wassergehalts auf die optische Reinheit der Cyanhydrine zu erwarten. Bei den verwendeten aromatischen Substraten hat der Wassergehalt hingegen einen deutlich geringeren Einfluss auf die nicht-enzymatische Reaktion. Der Wassergehalt sollte jeweils so eingestellt werden, dass die höchste Aktivität des Enzyms erreicht und die Nebenreaktion minimiert wird.

4.3.4.1. Einfluss des Wassergehalts auf den Enantiomerenüberschuss

Bei der Solgel-Immobilisierung der AtHNL wurde die in Puffer gelöste AtHNL in der Solgel-Polymermatrix eingeschlossen. Somit kann man den geringen ee von 58 % für (*R*)-Hydroxyheptannitril in diesem Fall mit dem hohen Wassergehalt innerhalb des Solgels erklären (Abb. 29). Dies konnte durch ein Kontrollexperiment bestätigt werden, in dem ein Solgel ohne AtHNL, jedoch mit dem gleichen Puffergehalt, präpariert und für die Synthese von Hydroxyheptannitril eingesetzt wurde. Abb. 29 zeigt, dass innerhalb von 120 min 50 % des Hexanals racemisch zu dem Cyanhydrin umgesetzt werden.

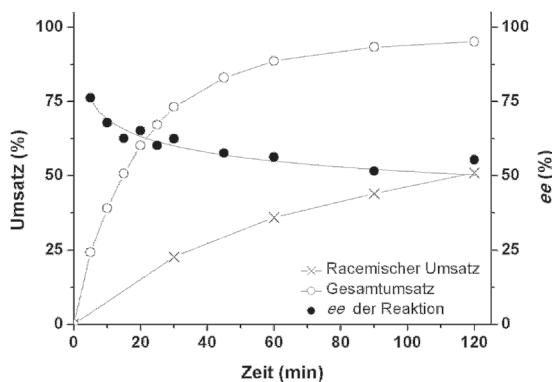


Abb. 29: Synthese von (R)-Hydroxyheptannitril mittels Solgel-AtHNL. Das Diagramm zeigt den Gesamtumsatz von Hexanal (○) und den Enantiomerenüberschuss (●) der Reaktion. Der Enantiomerenüberschuss wird aufgrund der hohen nicht-enzymatischen Substratumsetzung (x) reduziert.

Ein ähnlicher, wenn auch nicht so stark ausgeprägter Effekt konnte bei Celite Partikeln (ohne AtHNL) beobachtet werden, die innerhalb von 120 min 18 % Hexanal racemisch zu Hydroxyheptannitril umsetzen. Zudem konnte bei Celite-AtHNL beobachtet werden, dass bei der Synthese von aromatischen Cyanhydrinen der Wassergehalt einen starken Einfluss auf die katalytische Aktivität der AtHNL hat. Hierauf wird im Folgenden näher eingegangen.

4.3.4.2. Einfluss des Wassergehalts auf die Aktivität der Celite-AtHNL

Bei Untersuchungen von Celite-immobilisierter *HbHNL* wurde der Einfluss des Wassergehalts von einphasigem Dibutylether auf die Enzymaktivität und Enantioselektivität bei der Synthese des aromatischen Cyanhydrins (S)-2-Hydroxy-4-phenylbutyronitril beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein zu geringer (< 1%) oder zu hoher (> 2 %) Wassergehalt des Reaktionsmediums in erster Linie die Enzymaktivität drastisch verringert. Die Enantioselektivität des Enzyms wird hingegen nur geringfügig beeinflusst.^[96]

Im Fall der Celite-AtHNL ist der Wassergehalt des Puffer-gesättigten MTBEs bei der Verwendung von sehr trockenen Celite-AtHNL Präparationen (Wassergehalt 3 – 5 % (w/w)) für die Synthese von (R)-Mandelsäurenitril zu gering, um eine optimale

Enzymaktivität zu gewährleisten (Abb. 30). Feuchte Celite-AtHNL Präparationen (Wassergehalt $\geq 10\% \text{ (w/w)}$) zeigten eine deutlich höhere Enzymaktivität bei gleichbleibendem ee des gebildeten (*R*)-Mandelsäurenitrils. Bei der Verwendung von trockenen Celite-AtHNL Präparationen für die Synthese konnte durch die Zugabe von 10 μl Citrat-Phosphat Puffer (50 mM, pH 6,0) pro ml Reaktionsmedium eine Optimierung des Wassergehalts erreicht werden.

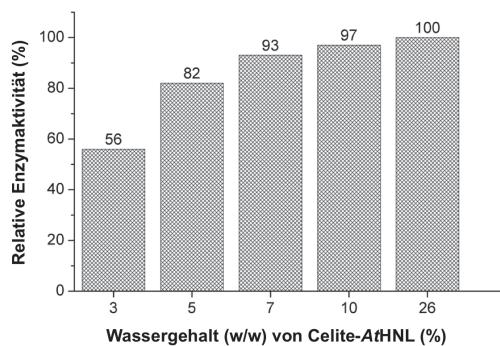


Abb. 30: Einfluss des Wassergehalts von Celite-AtHNL auf die Enzymaktivität. Fünf Celite-AtHNL Präparationen mit 3 – 26 % Wassergehalt (w/w) wurden unter gleichen Reaktionsbedingungen auf Enzymaktivität untersucht. In jeder Reaktion konnte ein ee $\geq 98\%$ gemessen werden. (Abbildung modifiziert nach Publikation 1, Figure 4B)

4.3.5. Ganzzellbiotransformationen zur Synthese von Cyanhydrinen

Der Einsatz ganzer Zellen stellt die Schritt-ökonomischste, kostengünstigste und effizienteste Form der Biokatalyse dar, wenn keine Nebenreaktionen durch andere zelluläre Enzyme auftreten. Ganzzellbiokatalyse wird üblicherweise in wässrigen Medien oder wässrig-organischen Zweiphasensystemen betrieben. Bisher gibt es nur wenige Beispiele, bei denen mit ganzen Zellen in organischen Lösungsmitteln bzw. reinen Substraten gearbeitet wurde.^[144, 146, 148] Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anwendung von *E. coli* Expressionszellen der AtHNL in der Ganzzellbiotransformation zur Synthese von (*R*)-Cyanhydrinen in einphasigem Lösungsmittel in Kooperation mit Kathrin Scholz im Rahmen deren parallel laufender Dissertation untersucht.

Mittels eines Fusionsproteins, bestehend aus der *AtHNL* und einem Fluoreszenzreporter-Protein der Light-Oxygen-Voltage Familie (LOV), konnte Kathrin Scholz MTBE als geeignetes organisches Lösemittel identifizieren, da es die Zellwand von *E. coli* intakt lässt, sodass weder fluoreszierendes Fusionsprotein noch der nicht kovalent gebundene Chromophor (FMN) in das Reaktionsmedium ausbluten (Abb. 31).

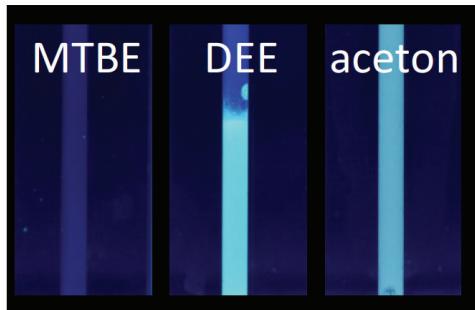


Abb. 31: Ausbluten des *AtHNL*-LOV-Fusionsproteins aus den *E. coli* Zellen ins Lösungsmittel. *E. coli* Expressionszellen des Fusionsproteins wurden in unterschiedlichen Lösungsmitteln (MTBE, Diethylether (DEE), Aceton) inkubiert und anschließend vom Lösungsmittel getrennt. Fluoreszenz des Lösungsmittels zeigte Ausbluten des Fusionsproteins oder des Chromophors.

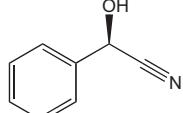
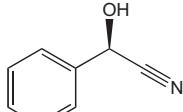
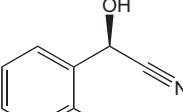
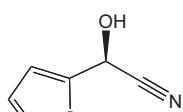
Zur enantioselektiven Synthese von Cyanhydrinen mussten die rekombinanten *E. coli* Zellen getrocknet werden. Dazu reichte zur Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril das Ernten der Zellen mittels Zentrifugation und das anschließende mehrfache Waschen der Zellfeuchtmasse in MTBE.

Durch den Einsatz von 350 mg in MTBE gewaschener *E. coli* Zellen konnte innerhalb von 60 min ein nahezu vollständiger Substratumsatz mit einem ee \geq 98 % für das gebildete (*R*)-Mandelsäurenitril erreicht werden. Der erzielte Enantiomerenüberschuss liegt nur leicht unter dem mit isoliertem bzw. immobilisierten Enzym erzielbaren (Abb. 23, ee \geq 99 %).

Bei der Synthese substituierter aromatischer Cyanhydride (Tab. 4) führte die Verwendung in MTBE gewaschener Zellfeuchtmasse zwar zu guten Substratumsätzen (80 – 85 %), jedoch nur zu moderaten Enantiomerenüberschüssen zwischen 70 und 90 %. Das heteroaromatische Furfural wurde hingegen nur zu 50 % mit einem ee \geq 30 % zu (2S)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitril umgesetzt. Der stark schwankende Enantiomerenüberschuss ist vermutlich auf den hohen Wassergehalt der Zellen zurück zu führen. Auch durch häufigeres Waschen

der Zellen in MTBE konnte der Wassergehalt nicht verringert werden. Aus diesem Grund wurde der Einsatz gefriergetrockneter Zellen untersucht. Die Verwendung der gleichen Zellmasse (350 mg Zellfeuchtmasse = 80 mg Lyophilisat) zeigte, dass die lyophilisierten Zellen zwar Enzymaktivität verlieren, sodass der Substratumsätze zwischen 33 – 67 % innerhalb von 60 min erreicht wurden, jedoch aromatische Cyanhydrine mit ee \geq 90 – 98 % und das heteroaromatische (2S)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitril mit 88 % Enantiomerenüberschuss gebildet wurden (Tab. 4).

Tab. 4: Synthese von verschiedenen Cyanhydrinen mittels Ganzzellbiokatalyse. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet und anschließend in MTBE gewaschen oder als Lyophilisat für 60 min in einphasigem Puffer-gesättigten MTBE zur Synthese eingesetzt. Reaktionsbedingungen: 1 ml Puffer-gesättigtes MTBE, 0,5 mmol Substrat, 1,5 mmol HCN, 350 mg Zellen (entspricht 80 mg Lyophilisat)

Cyanhydrin	Zellfeuchtmasse in MTBE gewaschen (3-fach)		Lyophilisierte Zellen	
	Substrat-umsatz (%)	ee (%)	Substrat-umsatz (%)	ee (%)
	98	≥ 98	45	≥ 98
(R)-Mandelsäurenitrit				
	80	≥ 70	43	≥ 90
(R)-2-Chlormandelsäurenitrit				
	85	≥ 90	33	≥ 98
(R)-2-Fluormandelsäurenitrit				
	50	≥ 30	67	≥ 88
(2S)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitril				

Auch bei der Ganzzellbiokatalyse konnte gezeigt werden, dass der Enantiomeren-überschuss stark von der eingesetzten Carbonylverbindung und dem Wassergehalt der Zellen abhängt.

Der Einsatz ganzer Zellen (MTBE gewaschen) macht bei der Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril Sinn, da ein vergleichbarer Substratumsatz und Enantiomeren-überschuss zum isolierten (bzw. immobilisierten) Enzym unter gleichen Reaktionsbedingungen erzielt werden kann. Das Lyophilisieren der *E. coli* Zellen verursacht zwar einen höheren Präparationsaufwand, der insgesamt bis zu 72 h (größtenteils Trocknungszeit) beansprucht, ist jedoch geeignet, die Enantioselektivität zu erhöhen. Bedingt durch den Aktivitätsverlust bei der Gefriertrocknung muss allerdings mehr Zellmaterial eingesetzt werden, um einen vollständigen Umsatz zu erreichen.

4.3.6. Vergleich der Produktausbeuten bei der Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril

Eine Gegenüberstellung von isolierter bzw. immobilisierter AtHNL, der Ganzzellbiotransformation und in der Literatur beschriebener Daten der PaHNL zur Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril sollte Aufschluss über die erzielbaren Maximalausbeuten mittels der jeweiligen AtHNL Präparation (inkl. Recyclierung) liefern und einen Bezug zu einem etablierten Prozess ermöglichen.

4.3.6.1. Recyclierbarkeit und Stabilität der immobilisierten AtHNL und des Ganzzellansatzes

Die Recyclierbarkeit der immobilisierten AtHNL (Celite, Solgel), sowie des Ganzzellansatzes, wurde durch fünf aufeinander folgende (*R*)-Mandelsäurenitril Synthesen (jeweils 60 min) unter Verwendung derselben Enzym- bzw. Zellpräparation untersucht. Dazu wurde der Versuchsaufbau leicht modifiziert und die jeweilige AtHNL Präparation in ein Lösungsmittel-beständiges feinmaschiges Nylongase-Säckchen verpackt, welches einen Waschschritt zwischen den Synthesezyklen (in MTBE) und den Transfer der Enzym- bzw. Zellpräparation in ein anderes Reaktionsgefäß ermöglichte (Abb. 32).

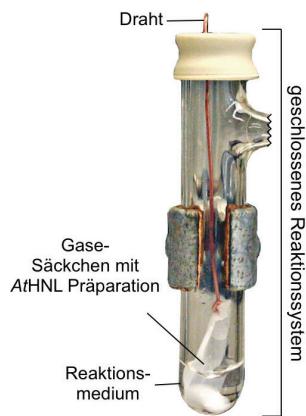


Abb. 32: Reaktionsaufbau zur Untersuchung Recyclierbarkeit von AtHNL Präparationen. Die AtHNL Präparation ist in einem Lösungsmittel-beständigen feinmaschigen Nylongase-Säckchen verpackt, welches die Entnahme sowie den Transfer des Biokatalysators ermöglicht.

Die Recyclierung der Celite-AtHNL zeigte eine gleichbleibend gute Enantioselektivität ($ee \geq 98\%$) und lediglich einen geringen Aktivitätsverlust ab dem dritten Reaktionszyklus, wohingegen die Solgel-AtHNL bereits nach dem ersten Reaktionszyklus deutlich Aktivität und Selektivität verlor (Abb. 33).

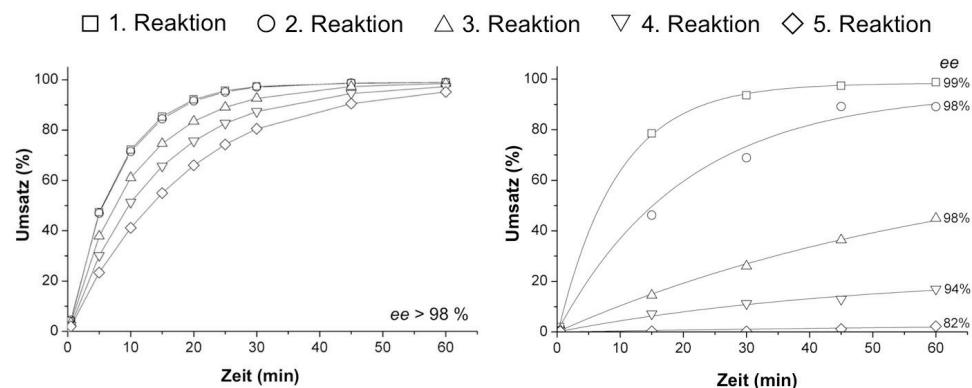


Abb. 33: Recyclierung von Celite-AtHNL (links) und Solgel-AtHNL (rechts) bei der Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril. In fünf direkt aufeinander folgenden Synthesen wurden 0,5 mmol Benzaldehyd und 1,5 mmol HCN von 5 mg immobilisierter AtHNL zu (*R*)-Mandelsäurenitril umgesetzt (30 mg Celite-AtHNL bzw. 161 mg Solgel-AtHNL). Zwischen den Reaktionszyklen wurde die immobilisierte AtHNL mit Puffer-gesättigtem MTBE gewaschen. (Abbildung modifiziert nach Publikation 1, Figure 3AB)

Die Recyclierung des Ganzzellansatzes verlief vergleichbar zur Celite-AtHNL mit gleichbleibender Enantioselektivität ($\geq 98\%$) und leichter Aktivitätsabnahme (Abb. 34).

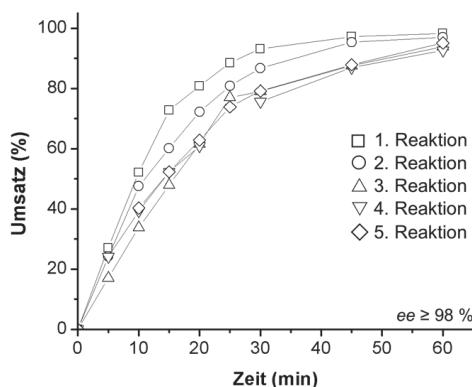


Abb. 34: Recyclierung des Ganzzellansatzes bei der Synthese von (R)-Mandelsäurenitril. In fünf direkt aufeinander folgenden Reaktionen wurden 0,5 mmol Benzaldehyd und 1,5 mmol HCN von 350 mg rekombinannten *E. coli*-Zellen (Zellfeuchtmasse) zu (R)-Mandelsäurenitril umgesetzt. Zwischen den Reaktionszyklen wurden die Zellen mit MTBE gewaschen. (Abbildung modifiziert nach Publikation 2, Figure 1)

Der moderate Aktivitätsverlust der Celite-AtHNL und des Ganzzellansatzes konnte auf Enzymaktivierung während der Reaktion zurückgeführt werden, da in beiden Fällen das Ausbluten von AtHNL ausgeschlossen wurde (Abb. 31, Abb. 36). Zudem wurde in beiden Untersuchungen im 5. Reaktionszyklus ein vollständiger Substratumsatz erreicht, sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls 6 - 8 Reaktionszyklen mit vollständigem Substratumsatz und gleichbleibend gutem Enantiomerenüberschuss möglich wären. Die hohe Stabilität beider Präparationen ist auch bei der Lagerung zu beobachten: Celite-AtHNL zeigte bei der Lagerung bei 4 °C (trocken) eine Halbwertszeit von 2,4 Monaten (Abb. 35) und geerntete Zellfeuchtmasse kann problemlos ≥ 6 Monate bei -20 °C gelagert werden. Vergleichbare Untersuchungen mit weiteren HNLs sind derzeit nicht beschrieben.

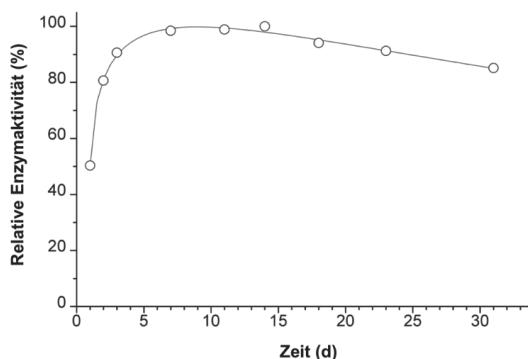


Abb. 35: Lagerung von Celite-AtHNL bei 4 °C über einen Zeitraum von 31 Tagen. 400 mg Celite-AtHNL wurden über 31 Tage bei 4 °C gelagert. Während des Versuchsverlaufs wurden jeweils 20 mg Celite-AtHNL der gelagerten Charge entnommen und Synthesen von (R)-Mandelsäurenitril unter gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Bestimmung der relativen Enzymaktivität erfolgte durch den Vergleich des Substratumsatzes nach 25 min Reaktionszeit. Innerhalb der ersten Versuchstage nahm Celite-AtHNL Luftfeuchtigkeit auf, sodass die Aktivität zunahm. Ab dem Scheitelpunkt wurde die Halbwertszeit der Enzymaktivität bestimmt: Sie beträgt 71 Tage (2,4 Monate). (Abbildung modifiziert nach Publikation 1, Figure 4A)

Der deutliche Aktivitätsverlust bei der Recyclierung der Solgel-AtHNL wurde nicht durch das Ausbluten der AtHNL verursacht (Abb. 36), sondern konnte auf die inaktivierende Wirkung des Puffer-gesättigten MTBEs zurück geführt werden.

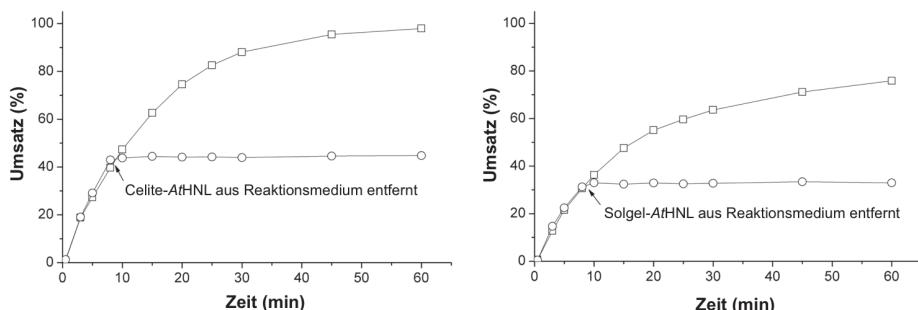


Abb. 36: Untersuchung zur Bindungsstärke von aktiver, immobilisierter AtHNL. Jeweils zwei (R)-Mandelsäurenitril-Synthesen mit Celite- (links) bzw. Solgel-AtHNL (rechts), bei der zum einen die immobilisierte AtHNL für 60 min im Reaktionsmedium verblieb (□) und zum anderen nach 8 min aus dem Medium entfernt wurde (○). Das Entfernen des Immobilisats führte zum Abbruch der Reaktion. (Abbildung modifiziert nach Publikation 1, Figure 2AB)

Wurde die Solgel-AtHNL für 60 bzw. 120 min in Puffer-gesättigtem MTBE (ohne Substrate) inkubiert und anschließend zur Synthese von (R)-Mandelsäurenitril verwendet, so verlief der Substratumsatz wie der 2. bzw. 3. Synthesezyklus bei der

Recyclierung (Abb. 33). Eine vergleichbare Untersuchung der Solgel-immobilisierten *HbHNL* zeigte bei der Recyclierung eine schwächere Enzymaktivierung durch das Waschen des Immobilisats in Pufferlösung.^[140] Die Waschschrifte in Pufferlösung führten bei der Solgel-*AtHNL* jedoch nur zu einer geringen Aktivitätsverbesserung, einhergehend mit deutlich niedrigeren Enantioselektivitäten aufgrund des höheren Wassergehalts im Reaktionsmedium (Abb. 37).

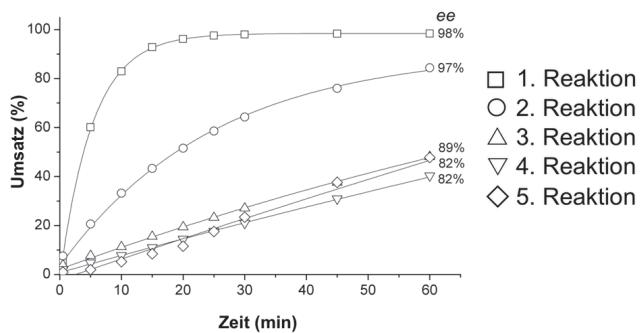


Abb. 37: Recyclierung von Solgel-*AtHNL* mit intermediären Waschschriften in Puffer. In fünf direkt aufeinander folgenden Reaktionen wurden 0,5 mmol Benzaldehyd und 1,5 mmol HCN zu (*R*)-Mandelsäurenitril umgesetzt. Zwischen den Reaktionszyklen wurde die Solgel-*AtHNL* mit Kalium-Phosphat Puffer (50 mM, pH 6,0) gewaschen. (Abbildung modifiziert nach Publikation 1, Figure 3C)

Neben der geringen Prozessstabilität weist Solgel-*AtHNL* bei 4 °C eine Halbwertszeit von 1 Monat auf (Abb. 38) und ist somit ebenfalls instabiler als Celite-*AtHNL* und die *AtHNL* in rekombinanten *E. coli*-Zellen.

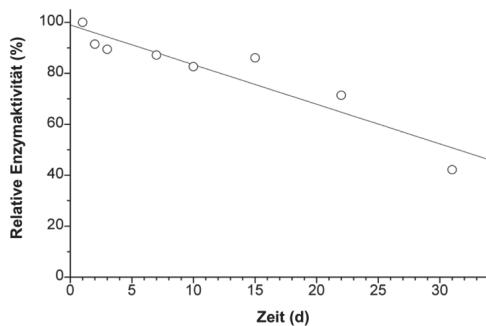


Abb. 38: Lagerung von Solgel-*AtHNL* bei 4 °C über einen Zeitraum von 31 Tagen. 2 g Solgel-*AtHNL* wurden über 31 Tage bei 4 °C gelagert. Während des Versuchsverlaufs wurden jeweils 100 mg Solgel-*AtHNL* der gelagerten Charge entnommen und Synthesen von (*R*)-Mandelsäurenitril unter gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Bestimmung der relativen Enzymaktivität erfolgte durch den Vergleich des Substratumsatzes nach 5 min Reaktionszeit. (Abbildung modifiziert nach Publikation 1, Figure 5)

Die Verwendung von Solgel-AtHNL ist aus diesem Grund lediglich für Experimente im kleinen Maßstab geeignet. Zwar zeigte Solgel-AtHNL eine wesentlich höhere Enzymaktivität im Vergleich zu den anderen AtHNL-Präparationen (Kapitel 4.3.3, Tab. 3), jedoch kann sie nur für zwei bis drei Reaktionszyklen wiederverwendet werden und der Präparationsaufwand ist vergleichsweise hoch (Tab. 2).

4.3.6.2. Produktivitätsvergleich der enzymatischen (R)-Mandelsäurenitril-Synthese

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die verschiedenen AtHNL-Präparationen hinsichtlich ihrer Produktivität zur Synthese von (R)-Mandelsäurenitril unter Berücksichtigung des Präparationsaufwandes und des Einsatzes vergleichbarer Enzym- bzw. Zellkonzentrationen gegenübergestellt (Tab. 5).

Die zuvor etablierten Reaktionsbedingungen sowie die Optimierung der AtHNL Präparation ermöglichen mit einem Synthesezyklus innerhalb von 60 min (mindestens) eine vollständige Umsetzung von 0,5 mmol Benzaldehyd zu (R)-Mandelsäurenitril (0,5 mmol, entsprechen 67 mg).

In Tab. 5 sind die in dieser Arbeit etablierten AtHNL-Präparationen, ihre maximale Recyclierbarkeit, das eingesetzte Trägermaterial, sowie die zur Synthese verwendeten AtHNL Konzentrationen und erzielten Produktausbeuten aufgelistet.

Tab. 5: Zusammenstellung der AtHNL Präparationen und der erzielbaren (R)-Mandelsäurenitrilausbeute pro g Zellmasse. Im Falle einer möglichen Recyclierung der verwendeten Enzym- bzw. Zellpräparation wurde die Produktausbeute mit den Synthesesyklen multipliziert. Zur Normierung der Produktausbeute pro g Zellfeuchtmasse wurde auf die aus 1 g Zellfeuchtmasse isolierbare AtHNL Menge (25 mg) bezogen. Reaktionsbedingungen: 1 ml Puffer-gesättigtes MTBE (50 mM Citrat-Phosphatpuffer, pH 6), 53 mg Benzaldehyd (0,5 mmol), 40,5 mg HCN (1,5 mmol). Vollständiger Substratumsatz führt zur Bildung von 67 mg (R)-Mandelsäurenitril (0,5 mmol).

Präparation	Recyclierung	Biokataly- sator	Produktausbeute inkl. Recyclierung (mg) ^a	Produktausbeute pro g Zellfeucht- masse ^b (mg) ^a
AtHNL (präzipitiert)	nicht untersucht	5 mg AtHNL	67	335
AtHNL-CLEA	nicht untersucht	17 mg AtHNL	67	120 - ?
Solgel-AtHNL	2- bis 3-mal	ca. 100 mg Solgel 3 mg AtHNL	134 - 200	1116 - 1666
Celite-AtHNL	6- bis 8-mal	30 mg Celite 7,5 mg AtHNL	400 - 536	1333 – 1786
Ganzzell- ansatz	6- bis 8-mal	350 mg <i>E. coli</i> Zellen	400 - 536	1200 – 1600

^aProduktausbeuten berechnet aus GC-Daten // ^bEntspricht 25 mg isolierter AtHNL

4.3.6.2.1. (R)-Mandelsäurenitrilsynthese mit präzipitierter AtHNL

Die nicht immobilisierte (präzipitierte) AtHNL konnte nicht recycelt werden, da der verwendete Versuchsaufbau (siehe Abb. 23) keine effiziente Filterung der präzipitierten AtHNL zuließ, wie es bei Celite oder Solgel immobilisierter AtHNL möglich war (siehe Abb. 32). Das vorsichtige Öffnen des Reaktionsgefäßes und anschließende Abschütten des Reaktionsansatzes hätte zum Ablösen des Präzipitats und zum Austritt gasförmiger Blausäure in gesundheitsgefährdenden Konzentrationen geführt. Aus diesem Grund wurde lediglich ein Reaktionszyklus durchgeführt, der bei vollständigem Benzaldehydumsatz zur Ausbeute von 67 mg (R)-Mandelsäurenitril unter Verwendung von 5 mg AtHNL führte. Bezogen auf die Produktausbeute pro g Zellfeuchtmasse (entspricht 25 mg AtHNL) konnten 335 mg (R)-Mandelsäurenitril synthetisiert werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit könnte eine

Recyclierung des präzipitierten Enzyms zu einer Steigerung der Produktivität führen. Dies wäre beispielsweise unter Verwendung eines Rührkesselreaktors, mit einem am Boden befindlichem Ablauf (mit feinporigen Sieb) möglich, sodass das präzipitierte Enzym beim Abpumpen des Reaktionsmediums im Reaktor verbleibt und recycelt werden kann.

4.3.6.2.2. (R)-Mandelsäurenitrilsynthese mit AtHNL-CLEAs

Eine Methode zur Produktion von AtHNL-CLEAs wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert, jedoch zeigten die AtHNL-CLEAs einen starken Aktivitätsverlust ($\leq 27\%$ Restaktivität) und schlechte Reproduzierbarkeit unter zugleich hohem Präparationsaufwand (Kapitel 4.3.2.1). Aus diesem Grund wurde keine Recyclierung durchgeführt, sodass nur ein Reaktionszyklus unter Verwendung von 17 mg AtHNL-CLEA einen vollständigen Substratumsatz lieferte und somit die Produktion von 120 mg (R)-Mandelsäurenitril pro g Zellfeuchtmasse ermöglichte. CLEAs weisen in der Regel eine hohe Prozessstabilität auf. So zeigten z.B. Nitrilhydratase-CLEAs nach 36 Reaktionszyklen und Lipase-CLEAs nach 10 Reaktionszyklen lediglich einen geringen Aktivitätsverlust.^[176] In Anbetracht des hohen Aktivitätsverlusts bei der Präparation der AtHNL-CLEAs müssen mehr als 3 Recyclierungen durchgeführt werden, um eine mit der nicht immobilisierten AtHNL vergleichbare Produktivität zu erreichen. Hinzu kommt der hohe Präparationsaufwand, der AtHNL-CLEAs für den technischen Einsatz ungeeignet macht.

4.3.6.2.3. (R)-Mandelsäurenitrilsynthese mit Solgel-AtHNL

Solgel-immobilisierte AtHNL zeigte bei der Umsetzung von aromatischen Substraten eine überraschend hohe Aktivität im Vergleich zu den anderen Enzympräparationen (Kapitel 4.3.3, Tab. 3). Untersuchungen der Recyclierbarkeit und Stabilität der Solgel-AtHNL ergaben jedoch einen rapiden Aktivitätsverlust bei der Recyclierung und eine nur mäßige Lagerfähigkeit. Somit konnte durch den Einsatz von 3 mg immobilisierter AtHNL 134 – 200 mg (2 bzw. 3 Recyclierungen mit vollständigem Substratumsatz) (R)-Mandelsäurenitril synthetisiert werden. Die Produktausbeute pro g Zellfeuchtmasse beträgt dementsprechend 1116 – 1666 mg (R)-Mandelsäurenitril.

In Anbetracht des Präparationsaufwands, der Handhabung der z.T. toxischen Substanzen und des Preises der Solgel-Komponenten ist die Solgel-Immobilisierung eher für Untersuchungen im Labormaßstab geeignet.

4.3.6.2.4. (R)-Mandelsäurenitrilsynthese mit Celite-AtHNL

Celite-AtHNL konnte lediglich ein geringer Aktivitätsverlust bei der Synthese von aromatischen Cyanhydrinen nachgewiesen werden. Zudem machen die sehr geringen Materialkosten des Celites (0,72 Euro/kg) und die einfachen Präparation der adsorptiv an den Träger gebundenen AtHNL seine Anwendung attraktiv. Aufgrund der guten Stabilität ermöglicht der Einsatz von 7,5 mg immobilisierter AtHNL (entspr. 30 mg Celite-AtHNL) bei einer 6- bis 8-maligen Recyclierung die Synthese von 400 – 536 mg (R)-Mandelsäurenitril. Somit konnte eine maximale Produktausbeute von 1333 – 1786 mg (R)-Mandelsäurenitril pro g Zellfeuchtmasse erreicht werden. Neben (R)-Mandelsäurenitril wurden weitere technisch relevante aromatische und heteroaromatische Cyanhydrine mit ee \geq 98 % synthetisiert (Tab. 3), allerdings wurden bisher mit diesen Substraten noch keine Recyclierungsstudien durchgeführt, die die Produktivität weiter verbessern würden. Celite-AtHNL könnte mit hoher Wahrscheinlichkeit im größeren Maßstab zur effizienten Synthese verschiedener aromatischen Cyanhydrinen eingesetzt werden.

4.3.6.2.5. (R)-Mandelsäurenitrilsynthese mittels Ganzzellbiokatalyse

Die Verwendung von mit MTBE gewaschener Zellfeuchtmasse zeigte lediglich bei der Synthese von (R)-Mandelsäurenitril vollständige Substratumsätze mit hohem Enantiomerenüberschuss (ee \geq 98 %, Tab. 4). Durch eine 6- bis 8-fache Recyclierung von 350 mg Zellfeuchtmasse ist die Synthese von 400 – 536 mg (R)-Mandelsäurenitril und somit eine Produktausbeute von 1200 – 1600 mg pro g Zellfeuchtmasse möglich. Aufgrund des geringen Präparationsaufwandes ist die Ganzzellbiokatalyse die effizienteste und günstigste Methode zur Synthese von (R)-Mandelsäurenitril. Enantiomerenüberschüsse \geq 88 % konnten bei der Synthese von

substituierten aromatischen bzw. heteroaromatischen Cyanhydrinen mittels lyophilisierter Zellen erzielt werden (Tab. 4). Das Lyophilisieren der Zellen führt zwar zu einem signifikanten Aktivitätsverlust, jedoch steigt die Stereoselektivität der Hydrocyanierung deutlich, da durch den verringerten Wassergehalt die nicht enzymatische Nebenreaktion unterdrückt wird. Nebenprodukte konnten bei den hier untersuchten Biotransformationen nicht festgestellt werden. Dies muss jedoch für verschiedene Carbonylverbindungen und *E. coli*-Expressionsstämme jeweils überprüft werden, ehe die Ganzzellbiotransformation erwogen wird. Besonders hervorzuheben ist jedoch, dass die Ganzzellbiotransformation zur Cyanhydrinsynthese in Minimalwasser-Systemen, wie Puffer-gesättigtem MTBE, möglich ist. Dies erleichtert die Produktaufarbeitung erheblich.

4.3.7. Vergleich der Produktivität der AtHNL-Präparationen zur etablierten PaHNL

Durch den Einsatz von 1 g Zellfeuchtmasse bzw. 100 mg Celite-AtHNL (entspricht 25 mg isolierter AtHNL) kann eine Ausbeute von ca. 1,6 g (*R*)-Mandelsäurenitril erreicht werden. Ein Vergleich mit der entsprechenden Produktivität der für die Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril etablierten PaHNL zeigt, dass die AtHNL momentan noch keine technische Alternative darstellt. So können beispielsweise durch den Einsatz von 11 mg PaHNL (teilgereinigt, 65 % PaHNL) in einem organisch-wässrigen Zweiphasensystem 6 g (*R*)-Mandelsäurenitril synthetisiert werden, was einer 8,5-fach höheren Produktivität im Vergleich zur AtHNL entspricht.^[101] Eine Steigerung der katalytischen Effizienz, sowie Enzymstabilität der AtHNL könnte durch eine Mutagenese (rational oder ungerichtet) erreicht werden.

Im Folgenden werden Ergebnisse zur Stabilisierung der AtHNL mittels rationalem Enzymdesign zum Einsatz des Enzyms im wässrig-organischen Zweiphasensystem beschrieben.

4.4. Stabilisierung der AtHNL durch rationales Enzymdesign

Das Grundkonzept zur Stabilisierung der AtHNL basierte auf der Identifizierung signifikanter molekularer Unterschiede zwischen der sehr stabilen MeHNL und der wesentlich labileren AtHNL. Die Stabilität wird vermutlich vom unterschiedlichen Oligomerisierungszustand beider Enzyme beeinflusst (Kapitel 1.2.4.4.1-2). Die Ausarbeitung relevanter Abweichungen auf Sequenz- und Strukturebene ergab Anhaltspunkte für eine mögliche Stabilisierung der AtHNL durch den Einsatz von rationalem Enzymdesign. Bei einer computergestützten Modellierung einer AtHNL Variante wurde durch den gezielten Austausch von Aminosäuren der AtHNL zu den korrespondierenden Aminosäuren der MeHNL versucht, eine Dimer-Dimer Interaktionsfläche zu konstruieren, die zu einer Tetramerisierung der AtHNL Variante führt. Die Entwicklung und Charakterisierung der AtHNL Variante relativ zum Wildtyp-Enzym wird in Publikation 3 beschrieben.

4.4.1. Sequenzieller und struktureller Vergleich von AtHNL und MeHNL

Die Aminosäuresequenzen der AtHNL und MeHNL weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit von 68 % mit einer Sequenzidentität von 46 % auf. Insbesondere die Aminosäuren der Monomer-Monomer Kontaktfläche, die zur Bildung des Dimers führt, sind stark konserviert (Abb. 39, gelb hinterlegt). An dem potentiellen Tetramerinterface der MeHNL sind 22 Aminosäuren beteiligt (Abb. 39, grau hinterlegt). Diese 22 Aminosäuren sind größtenteils nicht konserviert. Die AtHNL kann aufgrund der abweichenden Aminosäuresequenz in diesem Bereich, die bei einer Tetramerisierung zu zahlreichen ungünstigen Wechselwirkungen führen würden, sicher kein Tetramer bilden. Demgegenüber ist eine Tetramerbildung der MeHNL auf der Basis der nachfolgend beschriebenen *in silico* Analysen durchaus möglich. Dies wird durch die mittels Größenausschlusschromatographie beobachteten höheren Assoziationszustände der MeHNL belegt.^[86]

A	HNL	MERKHHFVLVHNAYHGAIWYKLKPILLESAGRVTAVELAASGIDPRPIQAVETVDEYSKPLIET	65
M	HNL	-MTVAHFVLIHTICHGAWIWHKLKPALERAGHKVTALDMAASGIDPRQIEQINSFDEYSEPLLTF	64
		*****+* *****+***** * * *****+*****+*****+* + + .*****+***	
A	HNL	LKSLPENEELVLFVGSFGGINIALAADIFPAKIKVLVFLNAFLPDTHVPSHVLKYMEMPGGLG	130
M	HNL	LKLPQGEKVIIVGESCAGLNIAIAADRYVDKIAAGVFHNSLLPDVTVHSPTSYTVEKLLESFPDWR	129
		*+ * * +*****+* * +*****+*** + * * * * + *****+* *+ +*** +*	
A	HNL	DCEFSSHETRNG-TMSLLKMGPKFMKARLYQNCPIEDYELAKMLHROGSFTTEDLSKKEKFSEEG	194
M	HNL	DTEYFTFTNITGETITMMLKGFVLLRNLENFTCTDGEYELAKVMRKGSLFQNVAOREKFTEP	194
		* + * + * + +*+ +**+ +* + * +*****+* +*****+* + +*** +***+*	
A	HNL	YGSVQRVYVMSSEDKAIPCDFIRWMIDNFNVSKVYEIDGGDHMVMLSCKPQKLFDLSLAIATDY	258
M	HNL	YGSIKKVKIYIWTQDKIFLPDFQRWQIANYKPDKVYQVQGGDHKLQLTKTEEVAHILQEVADAY	258
		*****+*+ + +** * * * + +*****+* + +** + +* * + +*	

Abb. 39: Alignment der Aminosäuresequenzen von AtHNL und MeHNL. Die konservierten Aminosäuren sind mit einem Stern (*) und ähnliche Aminosäuren mit einem Plus (+) markiert. Aminosäuren am Dimerinterface sind gelb markiert. Aminosäuren, die an der möglichen Tetramerbildung der MeHNL beteiligt sind, sind grau hinterlegt.

Die hohe Sequenzähnlichkeit von *AtHNL* und *MeHNL* resultiert in einer sehr hohen strukturellen Ähnlichkeit, wie in Abb. 40 gezeigt.

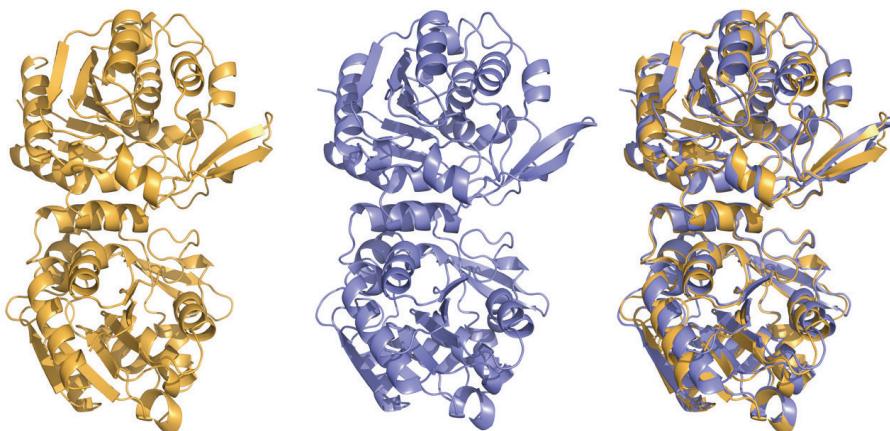


Abb. 40: Vergleich der Rückgratstruktur des A⁺HNL- und MeHNL-Dimers. Links: Rückgrat der A⁺HNL (orange). Mitte: Rückgrat der MeHNL (blau). Rechts: Strukturalignment der A⁺HNL und MeHNL.

Ein Zusammenhang zwischen Oligomerisierungszustand und Enzymstabilität konnte bisher hauptsächlich bei Proteinen aus thermophilen Organismen nachgewiesen werden. Bei dem Vergleich homologer Proteine aus mesophilen und thermophilen Organismen konnte gezeigt werden, dass die höhere Thermostabilität dieser Proteine oft auf einen höheren Oligomerisierungszustand zurückgeführt werden konnte.^[177] Dieses Prinzip wurde zudem bereits mehrfach experimentell bestätigt.^[178]

Durch den gezielten Austausch von Aminosäuren der Interaktionsfläche von Proteinuntereinheiten wurde z.B. bei einer Triosephosphatisomerase aus Hefe eine Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkung erzielt, die eine Steigerung der Thermostabilität bewirkte.^[179] Ebenso konnte bei einer Malatdehydrogenase aus *C. aurantiacus* durch den Austausch einer Aminosäure der Dimer-Dimer-Interaktionsfläche eine Steigerung der Thermo- und der pH-Stabilität erreicht werden.^[180]

Es ist denkbar, dass die höhere pH-Stabilität der MeHNL ebenfalls durch den höheren Oligomerisierungszustand hervorgerufen wird. Durch den Transfer der entsprechenden Aminosäuren der MeHNL-Dimer-Dimer-Interaktionsfläche auf die AtHNL sollte geprüft werden, ob der Assoziationszustand und die Stabilität der AtHNL beeinflusst werden können. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit beider Enzyme und der oberflächlichen Lage der Aminosäuren könnte der Austausch ohne Enzymaktivitätsverlust möglich sein. Vor der Herstellung entsprechender Mutanten, wurden die Mutationen zunächst *in silico* modelliert.

4.4.2. Modellierung einer tetrameren AtHNL und Optimierung der Dimer-Dimer-Interaktion

Die als Dimer im Kristall vorliegende MeHNL wurde an ihrer Drehachse vertikal gespiegelt, um ein Strukturmodell der tetrameren MeHNL zu erhalten (Kapitel 1.2.4.4.1, Abb. 10). Durch ein Strukturalignment, basierend auf der tetrameren MeHNL, wurde anschließend ein Modell der tetrameren AtHNL erzeugt, welches eine nicht optimierte Dimer-Dimer Interaktionsfläche (Interface 2) mit positiver Komplexierungsenergie ($\Delta G = 1,6 \text{ kcal mol}^{-1}$) aufwies (Abb. 41). Die positive Komplexierungsenergie führt zur Abstoßung der Dimere und unterstützt die experimentellen Beobachtungen, bei denen im Kristall und in Lösung bisher nur AtHNL-Dimere nachgewiesen werden konnten. Um eine Tetramerisierung zu ermöglichen, müssen die interagierenden Aminosäuren ausgetauscht werden, um eine negative Komplexierungsenergie zu erreichen.

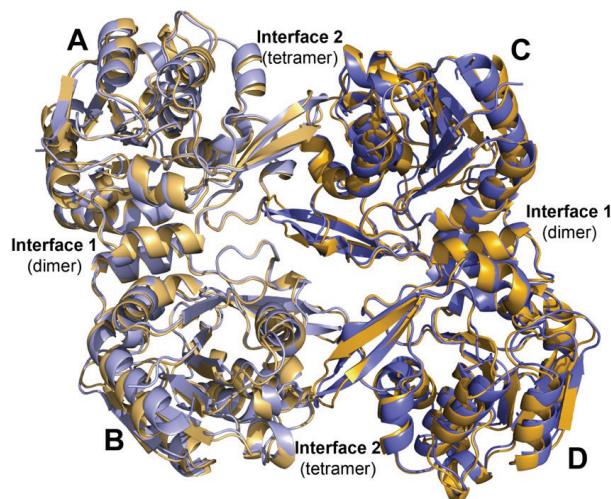


Abb. 41: Strukturalignment der tetrameren MeHNL (blau) und des putativen AtHNL Modells (orange). Die Monomere A und B, sowie C und D bilden jeweils über das Interface 1 ein Dimer. Die beiden Dimere (AB / CD) bilden über das Interface 2 ein Tetramer. (Publikation 3, Figure 1)

Die zuvor im Sequenzalignment (Abb. 39) identifizierten Aminosäuren der MeHNL wurden *in silico* schrittweise auf die AtHNL übertragen. Nach jedem Aminosäureaustausch fand eine Berechnung der Wechselwirkung zwischen den AtHNL Dimeren mittels des PDBePISA Servers (*Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies*) statt. Dabei wurden nur Mutationen, die zur Absenkung der Komplexierungsenergie beitrugen in das tetramere AtHNL Modell übernommen. Nach dem Austausch von 11 Aminosäuren wurde die niedrigste theoretische Komplexierungsenergie von $\Delta G = - 5,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ erreicht, die sogar niedriger als bei der tetrameren MeHNL ($\Delta G = - 2,6 \text{ kcal mol}^{-1}$) ist. Die entsprechenden Aminosäureaustausche sind in zusammengestellt.

Tab. 6: Aminosäuren der Dimer-Dimer Interaktionsfläche der MeHNL und der abweichenden Aminosäuren der AtHNL. Die grau hinterlegten Aminosäuren der AtHNL wurden gegen die entsprechenden Aminosäuren der MeHNL ausgetauscht. (Tabelle modifiziert nach Publikation 3, Table 1).

MeHNL	AtHNL	MeHNL	AtHNL	MeHNL	AtHNL
47 Gln	48 Pro	66 Glu	67 Lys	136 Phe	137 His
49 Glu	50 Gln	92 Arg	93 Ile	137 Thr	138 Glu
50 Gln	51 Ala	93 Tyr	94 Phe	138 Asn	139 Thr
52 Asn	53 Glu	95 Asp	96 Ala	139 Ile	140 Arg
59 Glu	60 Lys	133 Tyr	134 Phe	141 Thr	141 Asn
63 Thr	64 Glu	134 Phe	135 Ser	142 Glu	142 Gly
64 Phe	65 Thr	135 Thr	136 Ser	187 Arg	187 Lys
				188 Pro	188 Glu

4.4.3. Vergleichende Charakterisierung von Wildtyp-AtHNL und der Variante mit modifizierter Enzymoberfläche

Das heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) exprimierte synthetische Gen der modifizierten AtHNL (Surfmod-AtHNL) wurde anschließend vergleichend zum Wildtyp-Enzym charakterisiert.

4.4.3.1. Surfmod-AtHNL ist aktiver und zeigt ein breiteres pH-Spektrum

Das rationale Enzymdesign der AtHNL sollte in erster Linie eine Steigerung der Enzymaktivität und -stabilität unter sauren Reaktionsbedingungen (\leq pH 5,0) bewirken, damit ihr Einsatz in einem Zweiphasensystem zur Synthese enantiomerenreiner Cyanhydrine ermöglicht wird.

Der Einfluss des pH-Werts auf die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit des Wildtyp-Enzyms und der Surfmod-AtHNL Variante wurde durch die Spaltung von Mandelsäurenitril photometrisch bestimmt. Dabei zeigte die Surfmod-AtHNL im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eine über das gesamte pH-Spektrum (pH 4,0 – 6,5) deutlich gesteigerte Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, die ihr pH-Optimum bei pH 5,75 mit 227 U/mg erreicht (Abb. 42). Die Aktivität der Variante ist im Vergleich zur Wildtyp-AtHNL (133 U/mg) um das 1,7-fache gesteigert. Beachtenswert ist das um 0,25 pH-Einheiten ins saure Milieu erweiterte pH-Spektrum der Surfmod-AtHNL. Sie

zeigt bereits bei pH 4,5 eine Enzymaktivität von 24 U/mg, wohingegen das Wildtyp-Enzym erst bei pH 4,75 eine signifikant geringere Aktivität von 12 U/mg aufweist.

Die Enzymaktivität wird grundsätzlich vom Protonierungszustand katalytisch aktiver Aminosäuren im aktiven Zentrum und der Stabilität des Enzyms unter den gegebenen Reaktionsbedingungen bestimmt. Bei der Surfmod-AtHNL wurde keine Modifikation der katalytisch aktiven Aminosäuren vorgenommen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Aktivitätssteigerung durch eine Stabilisierung des Enzyms hervorgerufen wurde.

Entfaltungsstudien der Wildtyp AtHNL zeigten eine rapide Aggregation unter sauren Reaktionsbedingungen, die zum Verlust der katalytischen Aktivität führten.^[53] Durch die Modifikation der Enzymoberfläche scheint die Aggregation und somit die rapide Enzymaktivierung abgeschwächt worden zu sein. Eine Untersuchung der pH-Stabilität sollte den experimentellen Beweis dazu liefern.

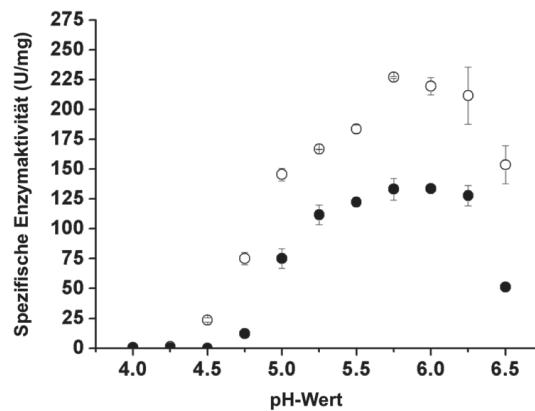


Abb. 42: Vergleich der pH-abhängigen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten von Wildtyp-AtHNL (●) und Surfmod-AtHNL (○). Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit beider Enzyme wurde anhand der Spaltung von Mandelsäurenitril in 50 mM Citrat-Phosphatpuffer bei pH 4,0 – 6,5 bei 20 °C bestimmt.

Wie in Tab. 7 dargestellt, zeigt die Surfmod-AtHNL im sauren Milieu \leq pH 5,4 eine deutlich höhere pH-Stabilität als das Wildtyp-Enzym. Bei pH 5,0 ist die Halbwertszeit der Variante gegenüber dem Wildtyp-Enzym um das 14-fache gesteigert (2,23 h). Zudem hat die Surfmod-AtHNL bei pH 4,5 eine Halbwertszeit von 0,22 h, was zur Synthese von (R)-Mandelsäurenitril in einem Zweiphasensystem ausreichen könnte. Oberhalb von pH 5,4 zeigen beide AtHNL-Varianten eine vergleichbare Halbwertszeit.

Diese Untersuchung bestätigte, dass die höhere Enzymaktivität der Surfmod-Variante auf die gesteigerte pH-Stabilität zurückgeführt werden kann. Ob die Modifikation zudem eine Auswirkung auf die Thermostabilität hat, wurde nachfolgend untersucht.

Tab. 7: pH-Stabilität von Wildtyp-AtHNL und Surfmod-AtHNL. Die Spaltungsaktivität (Mandelsäurenitril) der Enzym-Varianten wurde nach der Inkubation in 50 mM Citrat-Phosphatpuffer (pH 4,5 – 6,0, 20°C) bestimmt. Aus der Abnahme der Enzymaktivität wurde die Halbwertszeit berechnet.

pH	Wildtyp-AtHNL* ($\tau_{1/2}$ in h)	Surfmod-AtHNL ($\tau_{1/2}$ in h)
4,5	0	0,22
5,0	0,16	2,23
5,4	2	3,40
5,8	> 24	13,74
6,0	60	52,17

* Die Halbwertszeiten wurden der Dissertation von J. Guterl entnommen.^[53]

4.4.3.2. Surfmod-AtHNL ist thermostabiler

Aus prozesstechnischer Sicht ist die Enzymstabilität von HNLs nur bei Temperaturen bis 20 °C relevant, da oberhalb von 20 °C die nicht-enzymatische Produktbildung bei der enzymatischen Synthese von Cyanhydrinen stark steigt und die gebildeten Cyanhydrine thermisch nicht stabil sind.

Der Vergleich der Thermostabilität der Wildtyp-AtHNL und der Surfmod-Variante wurde bei pH 5,0 durchgeführt (Abb. 43). Das Wildtyp-Enzym zeigt bei 0 – 10 °C eine durchschnittliche Halbwertszeit von 22 min, die bei einer Temperaturerhöhung auf 20 °C auf 9,6 min sinkt. Die durchschnittliche Halbwertszeit der Surfmod-AtHNL erreicht hingegen bei 0 - 20 °C ca. 135 min und die Variante ist somit um das 6- bis 13-Fache stabiler als das Wildtyp-Enzym.

HNLs stellen im Hinblick auf die sehr niedrige Prozesstemperatur eine Ausnahme im Vergleich zum Großteil der technisch genutzten Biokatalysatoren dar. Enzyme wie z.B. die Triosephosphatisomerase der Hefe oder Lipase B aus *Candida antarctica* werden bei Temperaturen um die 90 - 100 °C verwendet und müssen unter den gegebenen Reaktionsbedingungen stabil sein.^[179] Eine Verbesserung der

Thermostabilität wird hierbei z.B. durch die Analyse und gezielte Reduktion der Beweglichkeit von Atomen erreicht, die anhand der B-Faktoren von Enzymkristallstrukturen identifiziert werden können.^[181] Dies kann einerseits durch den gezielten Austausch von Aminosäuren in potentiell instabilen Proteinbereichen geschehen. Andererseits kann eine Verringerung des B-Faktors von Aminosäuren durch die Verstärkung der molekularen Wechselwirkung mit anderen Aminosäuren (Oligomerisierung) oder ihrer Stabilisierung durch die Bindung an einen Träger (Immobilisierung) bewirkt werden.^[178, 182]

Im Fall der AtHNL wurden die Untersuchungen auf eine Steigerung der pH-Stabilität unter sauren Reaktionsbedingungen und bei niedrigen Temperaturen fokussiert. Eine molekularbiologische Modifikation der Proteinstruktur zur Veränderung des Oligomerisierungszustandes oder der Austausch einzelner Aminosäuren kann dabei ebenfalls einen Einfluss auf die Thermostabilität haben. Das Beispiel der Malatdehydrogenase aus *C. aurantiacus* zeigt, dass der Austausch nur einer Aminosäure zur Steigerung der Thermostabilität und pH-Stabilität geführt hat.^[180]

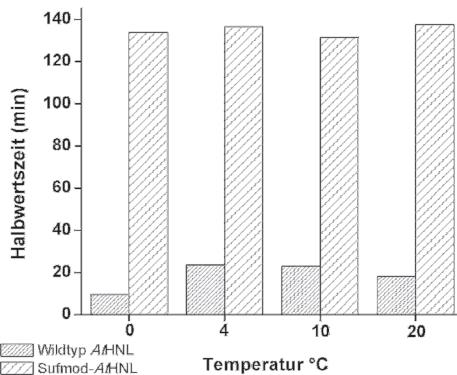


Abb. 43: Thermostabilität von Wildtyp-AtHNL und Surfmod-AtHNL. Die Spaltungsaktivität (Mandelsäurenitril) wurde nach der Inkubation in 50 mM Citrat-Phosphatpuffer bei Temperaturen zwischen 0 – 20 °C bei pH 5 bestimmt. Aus der Abnahme der Enzymaktivität wurde die Halbwertszeit berechnet.

Die molekularen Ursachen für die erhöhte Stabilität der Surfmod-AtHNL wurden durch die Bestimmung des isoelektrischen Punktes und der Quartärstruktur näher untersucht.

4.4.3.3. Surfmod-AtHNL ist ein Dimer mit niedrigerem isoelektrischen Punkt

Die denaturierte AtHNL zeigt ein zur MeHNL identisches Molekulargewicht von 29 kDa je Untereinheit.^[86] Die Wildtyp-AtHNL hat in nativer Form ein Molekulargewicht von ca. 58 kDa und die tetramere Variante würde ein Molekulargewicht von 116 kDa aufweisen.

Eine Größenausschlusschromatographie zeigte, dass beide Enzymvarianten bei pH 7,5 ein ähnliches Elutionsvolumen aufweisen (Abb. 44, *links*). Über die Berechnung des Verteilungskoeffizienten (K_{av}) konnte ein natives Molekulargewicht der Wildtyp-AtHNL von 58 kDa (29 kDa pro Untereinheit) und 55 kDa für die Surfmod-AtHNL ermittelt werden. Die Surfmod-AtHNL liegt bei pH 7,5 also wie das Wildtyp-Enzym als Dimer vor (Abb. 44, *rechts*).

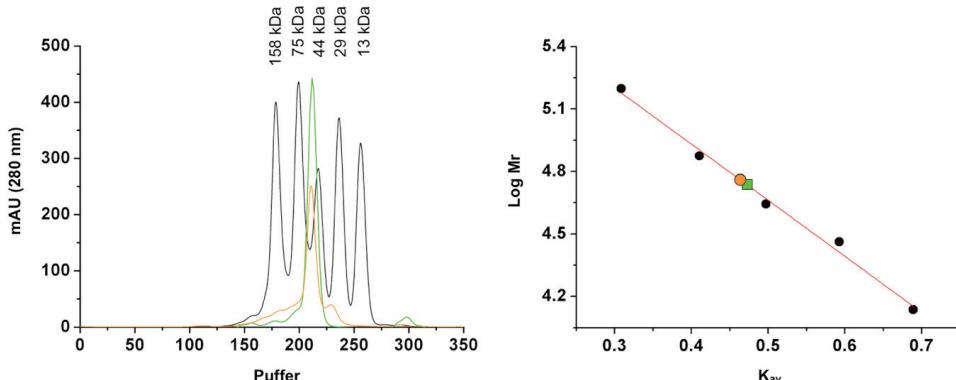


Abb. 44: Größenausschlusschromatographie von Wildtyp-AtHNL und Surfmod-AtHNL. Links: Größenausschlusschromatogramm mit fünf Standardproteinen (schwarz, Molekulargewicht: 13 - 158 kDa), Wildtyp-AtHNL (orange, Elutionsvolumen: 210,48 ml) und Surfmod-AtHNL (grün, Elutionsvolumen: 214,65 ml). Es wurden Proteinlösungen (1,6 ml) mit einer Konzentration 2-3 mg/ml auf eine Superdex G200 Säule (320 ml) bei pH 7,5 (50 mM Cirat-Phosphatpuffer + 150 mM NaCl) aufgetragen. Rechts: Lineare Auftragung der Standardproteine nach Berechnung des Verteilungskoeffizienten K_{av} zur Ermittlung des nativen Molekulargewichts der Wildtyp-AtHNL ($\text{Log } Mr = 4,76 = 58 \text{ kDa}$) und der Surfmod-AtHNL ($\text{Log } Mr = 4,73 = 55 \text{ kDa}$). (Publikation 3)

Um ausschließen zu können, dass die Surfmod-AtHNL im sauren Milieu tetramerisiert, wurde zusätzlich das Molekulargewicht bei pH 5 bestimmt, was ein Molekulargewicht im Bereich eines Dimers (53 kDa) ergab.

Die Tetramerisierung kann somit als mögliche Stabilisierungsursache der Surfmod-AtHNL ausgeschlossen werden.

Jedoch hat der Austausch der oberflächlichen Aminosäuren zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punkts (IP) und somit zu einer Verschiebung des pH-Optimums geführt. Eine isoelektrische Fokussierung zeigte eine Verschiebung des IPs der Surfmod-AtHNL um 0,3 pH-Einheiten von ursprünglich pH 5,1 des Wildtyp Enzyms in den sauren Bereich zu pH 4,8. Diese Verschiebung korreliert mit dem erweiterten pH-Spektrum der Variante im sauren Milieu (Abb. 24).

Der pH-Wert des umgebenden Mediums eines Proteins beeinflusst den Ionisierungszustand von sauren und basischen Aminosäuren (sauer: Asparaginsäure, Glutaminsäure; basisch: Lysin, Arginin, Histidin). Diese werden je nach pH-Wert unterschiedlich protoniert, wodurch die intermolekulare Wechselwirkung und somit die Proteinintegrität stark beeinflusst werden kann.^[183]

Unter den ausgetauschten Aminosäuren der Surfmod-AtHNL waren die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, sowie die saure Aminosäure Glutaminsäure (Tab. 6). Der Austausch von zwei basischen Lysinen gegen saure Glutaminsäuren (Lys60Glu, Lys67Glu) könnte einen starken Einfluss auf den IP und auch auf die Verbreiterung der pH-Optimumskurve im sauren pH-Bereich (Abb. 24) haben. Darüberhinaus wurden Glutaminsäure- und Arginin-Reste lediglich in ihrer Position verschoben. Ohne weiterführende punktuelle Rückmutationen und anschließende Charakterisierung der Varianten ist der genaue Einfluss der ausgetauschten Aminosäuren auf die Enzymstabilität nicht vorhersagbar. Interessante Ansatzpunkte für Rückmutationen sind die zuvor beschriebenen Aminosäurepositionen 60, 67 sowie 93, bei der die Aminosäure Isoleucin, welche in der Kristallstruktur einen sehr hohen B-Faktor aufweist, gegen Arginin getauscht wurde.

4.4.4. Surfmod-AtHNL katalysierte enantioselektive Synthese von Cyanhydrinen in einem Zweiphasensystem

Mit der Entwicklung der Surfmod-AtHNL wurde das Ziel verfolgt, die AtHNL für den Einsatz im organisch-wässrigen Zweiphasensystem zu stabilisieren. Der beschriebene strukturbasierte Ansatz zur Steigerung der pH-abhängigen Enzymaktivität und -stabilität führte zu einer AtHNL-Variante, die bei pH 4,5 mit einer Halbwertszeit von 0,22 h eine Enzymaktivität (für die Spaltungsreaktion) von 24 U/mg aufweist. Unter diesen Reaktionsbedingungen ist das Wildtyp-Enzym inaktiv.

Wie zuvor gezeigt, kann die nicht-selektive Produktbildung von Mandelsäurenitril im wässrig-organischen Zweiphasensystem bei pH 4,5 und 0 °C ausreichend unterdrückt werden (Kapitel 4.2, Abb. 22), sodass diese Reaktionsbedingungen für eine von der Surfmod-AtHNL katalysierte enantioselektive Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril gewählt wurden. Die Surfmod-AtHNL (0,6 mg) erreichte nach 120 min einen Substratumsatz von 71 % mit einem Enantiomerenüberschuss des gebildeten (*R*)-Mandelsäurenitrils von 99,3 % (Abb. 45).

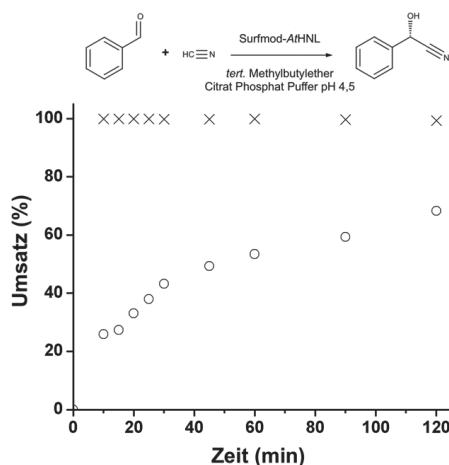


Abb. 45: Surfmod-AtHNL katalysierte Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril im wässrig-organischen Zweiphasensystem. Reaktionssystem: 1 ml Citrat-Phosphatpuffer (pH 4,5) und 1 ml MTBE, 0,6 mg Surfmod-AtHNL, 0,5 mmol Benzaldehyd und 1,5 mmol HCN bei 0 °C. Der Substratumsatz (○) und Enantiomerenüberschuss (×) des gebildeten (*R*)-Mandelsäurenitrils wurden über 120 min Reaktionszeit gaschromatographisch verfolgt. (Abbildung modifiziert nach Publikation 3, Figure 6B)

Ein vollständiger Substratumsatz innerhalb der 120 min hätte bei der eingesetzten Enzymkonzentration vermutlich durch eine Verlängerung der Versuchszeit erreicht werden können, da bis zu diesem Zeitpunkt ein konstanter Anstieg der Produktkonzentration beobachtet wurde.

Um die Anwendungsbreite der Surfmod-AtHNL zu demonstrieren, wurden darüber hinaus Synthesen von (R)-3-Fluormandelsäurenitril und von (2S)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitril durchgeführt. Nach 120 min Reaktionszeit konnten 74 % bzw. 88 % Substratumsatz mit guten Enantiomerenüberschüssen für das gebildete (R)-3-Fluormandelsäurenitril ($ee \geq 95\%$) und für (2S)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitril ($ee \geq 92\%$) erreicht werden. Die moderate Abnahme des Enantiomeren-überschusses während der Synthesen ist auf die begünstigte nicht-enzymatische Nebenreaktion aufgrund des hohen Wassergehalts im System zurückzuführen. Eine weitergehende Unterdrückung der Nebenreaktion wäre durch ein weiteres Absenken des pH-Wertes möglich, wodurch jedoch die Surfmod-AtHNL inaktiviert würde.

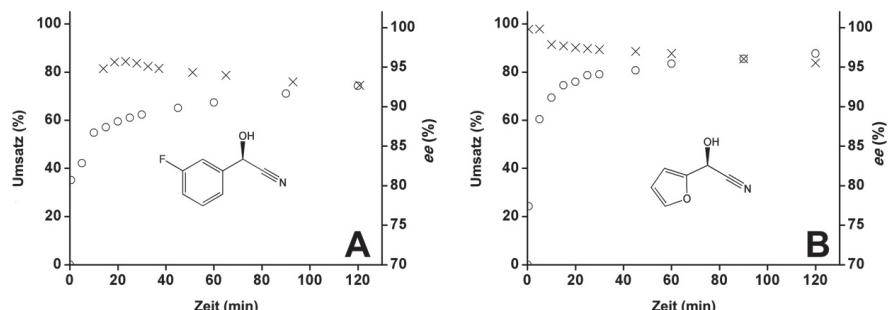


Abb. 46: Surfmod-AtHNL katalysierte Synthese von (R)-3-Fluormandelsäurenitril (A) und (2S)-Furan-2-yl(hydroxy)ethannitril (B) im wässrig-organischen Zweiphasensystem. Reaktionssystem: 1 ml Citrat-Phosphatpuffer (pH 4.5) und 1 ml MTBE, 1 mg Surfmod-AtHNL, 0,5 mmol 3-Fluorbenzaldehyd bzw. Furfural und 1,5 mmol HCN bei 0 °C. Der Substratumsatz (○) und Enantiomerenüberschuss (×) des gebildeten Cyanhydrins wurden über 120 min Reaktionszeit gaschromatographisch verfolgt. Abbildung modifiziert nach Publikation 3, Supplementary Material.

Die durchgeführten Cyanhydrin-Synthesen mittels Surfmod-AtHNL im organisch-wässrigen Zweiphasensystem zeigten gute Enantiomeren-überschüsse und akzeptable Substratumsätze. Das Abflachen der Umsatzkurve während des Reaktionsverlaufs könnte entweder auf eine Inaktivierung des Enzyms oder Substratmangel in der wässrigen Phase hindeuten.

Anwendungsbezogener könnte der Einsatz der Surfmod-AtHNL im einphasigen organischen MTBE sein. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, ob die gesteigerte Enzymaktivität und Stabilität auch bei präzipitierter oder immobilisierter Surfmod-AtHNL auftritt.

KAPITEL 5

5. Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte am Beispiel der *AtHNL* gezeigt werden, dass hohe pH-Stabilität einer Hydroxynitril-Lyase keine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Synthese enantiomerenreiner Cyanhydrine ist.

Durch gezieltes Reaktionsdesign wie die Verwendung von einphasigem MTBE kann die spontane nicht-selektive Produktbildung unterbunden werden. Eine effiziente Enzymnutzung durch mehrfache Recyclierung konnte beispielhaft anhand der Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril unter Verwendung von Ganzzellansätzen oder einfach durchführbaren Immobilisierungsverfahren (adsorptive Bindung) gezeigt werden.

Alternativ zum Reaktionsdesign wurde in dieser Arbeit eine oberflächen-modifizierte *AtHNL* Variante mit signifikant gesteigerter Enzymaktivität und Stabilität entwickelt. Diese könnte durch weitergehende Immobilisierungsstudien, bei denen eine Kombination unterschiedlicher Immobilisierungsmethoden eingesetzt wird (z.B. Solgel-umhüllte Celite-Partikel mit gebundenem Enzym) oder die kovalente Bindung des Enzyms an einen Träger, eine attraktive Alternative zu der technisch etablierten *PaHNL* darstellen.

Grundlagenbasierte Untersuchungen zu den Auswirkungen der einzelnen Mutationspositionen der oberflächen-modifizierten *AtHNL*-Variante könnten zur Identifikation von stabilisierenden „hotspots“ führen, die dann als Grundlage zur Herstellung weiterer *AtHNL* Varianten genutzt werden können.

KAPITEL 6

6. Literatur

- [1] Ulber, R., Soyez, K. *5000 Jahre Biotechnologie: Vom Wein zum Penicillin.* **2004**, *Chem. unserer Zeit.* 38: 172-180.
- [2] Maul, S. M. *Das Gilgamesch-Epos.* **2008**, 2. Auflage
- [3] Kützing, F. T. *Mikroskopische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter, nebst mehreren andern dazu gehörigen vegetabilischen Gebilden.* **1837**, *J. Prakt. Chem.* 11: 385-409.
- [4] Schwann, T. *Vorläufige Mitteilung, betreffend Versuche über die Weingärung und Fäulnis.* **1837**, *Annalen Phys. Chem.* 41: 184-193.
- [5] Pasteur, M. L. *Mémoire sur la fermentation alcoolique.* **1857**, *Compt. rend. acad. sci. Paris.* 45: 1032-1036.
- [6] Pasteur, M. L. *Mémoire sur la fermentation de l'acide tartarique.* **1858**, *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris).* 46: 615-618.
- [7] Buchner, E. *Alkoholische Gärung ohne Hefezellen.* **1897**, *BDChG.* 30: 117-124.
- [8] Hubbuch, J., Kula, M. R. *Isolation and purification of biotechnological products.* **2007**, *J. Non-equil. Thermodyn.* 32: 99-127.
- [9] Stürmer, R., Breuer, M. *Chemie und Biologie Hand in Hand.* **2006**, *Chem. unserer Zeit.* 40: 104-111.
- [10] Nestl, B. M., Nebel, B. A., Hauer, B. *Recent progress in industrial biocatalysis.* **2011**, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15: 187-193.
- [11] Sheldon, R. A. *Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art.* **2005**, *Green Chem.* 7: 267-278.
- [12] Sheldon, R. A. *Reactions in non-conventional media for sustainable organic synthesis.* **2008**, *Nato. Sci. Ser. II. Math.* 246: 1-28.
- [13] van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. *Biocatalysis in ionic liquids.* **2007**, *Chem. Rev.* 107: 2757-2785.
- [14] Wohlgemuth, R. *Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells.* **2010**, *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 283-292.

- [15] Patel, R. N. *Biocatalysis: Synthesis of key intermediates for development of pharmaceuticals*. **2011**, ACS Catal. 1: 1056-1074.
- [16] Dadashipour, M., Asano, Y. *Hydroxynitrile lyases: Insights into biochemistry, discovery, and engineering*. **2011**, ACS Catal. 1: 1121-1149.
- [17] Purkarthofer, T., Skranc, W., Schuster, C., Griengl, H. *Potential and capabilities of hydroxynitrile lyases as biocatalysts in the chemical industry*. **2007**, Appl. Microbiol. Biotechnol. 76: 309-320.
- [18] Wöhler, F., Liebig, J. *Über die Bildung des Bittermandelöls*. **1837**, Annalen d. Pharma. 22: 1-24.
- [19] Rosenthaler, L. *Enzyme effected asymmetrical synthesis*. **1908**, Biochem. Z. 14: 238-253.
- [20] Krieble, V. K., Wieland, W. A. *The properties of oxinitrilase*. **1921**, J. Am. Chem. Soc. 43: 164-175.
- [21] Rosenthaler, L. *Über die Verbreitung emulsinartiger Enzyme*. **1913**, Arch. Pharm. 261: 56-80.
- [22] Nordefeldt, E. **1925**, Biochem. Z. 159
- [23] Weidenhagen, R. **1932**, Ergeb. Enzymforsch. 1: 168 ff.
- [24] Albers, H., Hamann, K. *Über die synthetisierende Wirkung des Emulsin*. **1932**, Biochem. Z. 255: 44-65.
- [25] Albers, H. *Die Methoden der Fermentforschung*. **1941**, 3: 2137 ff.
- [26] Bové, C., Conn, E. E. *Metabolism of aromatic compounds in higher plants II: Purification and properties of oxynitrilase of Sorgum vulgare*. **1961**, J. Biol. Chem. 236: 207-210.
- [27] Becker, W., Freund, H., Pfeil, E. *Stereospecific synthesis of D-Hydroxynitriles and optically active ethanolamines*. **1965**, Angew. Chem., Int. Ed. 4: 1079.
- [28] Sharma, M., Sharma, N. N., Bhalla, T. C. *Hydroxynitrile lyases: At the interface of biology and chemistry*. **2005**, Enzyme Microb. Technol. 37: 279-294.
- [29] Hegnauer, R. *Die Verbreitung der Blausäure bei den Cormophyten. 3. Die Blausäurehaltigen Gattungen*. **1959**, Pham. Wochensbl. 8: 248-262.
- [30] Conn, E. E. *Cyanogenic compounds*. **1980**, Annu. Rev. Plant. Phys. 31: 433-451.
- [31] Mori, K. *Comprehensive natural products II: Chemistry and biology*. **2010**, 4th ed.: 339-385.
- [32] Ikan, R. *Naturally occurring glycosides*. **1999**, 1st ed.: 147-191.
- [33] Hughes, J., Carvalho, F. J., Hughes, M. A. *Purification, characterization, and cloning of alpha-hydroxynitrile lyase from cassava (Manihot esculenta Crantz)*. **1994**, Arch. Biochem. Biophys. 311: 496-502.
- [34] Vennesland, B. *Cyanide in biology*. **1981**, 1st ed.

- [35] Hickel, A., Hasslacher, M., Griengl, H. *Hydroxynitrile lyases: Functions and properties.* **1996**, *Physiol. Plantarum.* 98: 891-898.
- [36] Kakes, P. *Properties and functions of the cyanogenic system in higher plants.* **1990**, *Euphytica.* 48: 25-43.
- [37] Poulton, J. E. *Cyanogenesis in plants.* **1990**, *Plant Physiol.* 94: 401-405.
- [38] Way, J. L. *Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism.* **1984**, *Annu. Rev. Pharmacol.* 24: 451-481.
- [39] Friedberg, K. D. *Antidote bei Blausäurevergiftungen.* **1968**, *Arch. Toxikol.* 24: 41-48.
- [40] Jorgensen, K., Bak, S., Busk, P. K., Sorensen, C., Olsen, C. E., Puonti-Kaerlas, J., Moller, B. L. *Cassava plants with a depleted cyanogenic glucoside content in leaves and tubers. Distribution of cyanogenic glucosides, their site of synthesis and transport, and blockage of the biosynthesis by RNA interference technology.* **2005**, *Plant Physiol.* 139: 363-374.
- [41] McMahon, J. M., White, W. L. B., Sayre, R. T. *Cyanogenesis in cassava (Manihot esculenta Crantz).* **1995**, *J. Exp. Botany.* 46: 731-741.
- [42] Andersen, M. D., Busk, P. K., Svendsen, I., Moller, B. L. *Cytochromes P-450 from cassava (Manihot esculenta Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin - Cloning, functional expression in Pichia pastoris, and substrate specificity of the isolated recombinant enzymes.* **2000**, *J. Biol. Chem.* 275: 1966-1975.
- [43] Bak, S., Olsen, C. E., Halkier, B. A., Moller, B. L. *Transgenic tobacco and Arabidopsis plants expressing the two multifunctional sorghum cytochrome P450 enzymes, CYP79A1 and CYP71E1, are cyanogenic and accumulate metabolites derived from intermediates in dhurrin biosynthesis.* **2000**, *Plant Physiol.* 123: 1437-1448.
- [44] Siritunga, D., Sayre, R. *Engineering cyanogen synthesis and turnover in cassava (Manihot esculenta).* **2004**, *Plant Mol. Biol.* 56: 661-669.
- [45] Cholod, M. S. *Cyanohydrins.* **1993**, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.* 7: 821-834.
- [46] Knowles, C. J., Bunch, A. W. *Microbial cyanide metabolism.* **1986**, *Adv. Microb. Physiol.* 27: 73-111.
- [47] Zagrobelny, M., Bak, S., Moller, B. L. *Cyanogenesis in plants and arthropods.* **2008**, *Phytochemistry.* 69: 1457-1468.
- [48] Breithaupt, H., Pohl, M., Bönigk, W., Heim, P., Schimz, K. L., Kula, M. R. *Cloning and expression of (R)-hydroxynitrile lyase from Linum usitatissimum (flax).* **1999**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 6: 315-332.

- [49] Trummler, K., Wajant, H. *Molecular cloning of acetone cyanohydrin lyase from flax (Linum usitatissimum) - Definition of a novel class of hydroxynitrile lyases.* **1997**, *J. Biol. Chem.* 272: 4770-4774.
- [50] Pohl, M., Breithaupt, H., Fröhlich, B., Heim, P., Iding, H., Juchem, P., Siegert, P., Kula, M. *Enzymes for carboligation - 2-ketoacid decarboxylases and hydroxynitrile lyases.* **2007**, Asymmetric synthesis with chemical and biological methods: 327-340.
- [51] Albrecht, J., Jansen, I., Kula, M. *Improved purification of an (R)-oxynitrilase from Linum usitatissimum (flax) and investigation of the substrate range.* **1993**, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17: 191-203.
- [52] Xu, L. L., Singh, B. K., Conn, E. E. *Purification and characterization of acetone cyanohydrin lyase from Linum usitatissimum.* **1988**, *Arch. Biochem. Biophys.* 263: 256-263.
- [53] Guterl, J. K. *Hydroxynitril-Lyasen für die Biotechnologie.* **2008**, Dissertation. Universität Düsseldorf.
- [54] Kiess, M., Hecht, H. J., Kalisz, H. M. *Glucose oxidase from Penicillium amagasakiense - Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases.* **1998**, *Eur. J. Biochem.* 252: 90-99.
- [55] Glieder, A., Weis, R., Skranc, W., Poechlauer, P., Dreveny, I., Majer, S., Wubbolts, M., Schwab, H., Gruber, K. *Comprehensive step-by-step engineering of an (R)-hydroxynitrile lyase for large-scale asymmetric synthesis.* **2003**, *Angew. Chem., Int. Ed.* 42: 4815-4818.
- [56] Hochuli, E. *A rapid purification of D-oxynitrilase from Almond meal by affinity chromatography.* **1983**, *Helv. Chim. Acta.* 66: 489-493.
- [57] Jansen, I., Woker, R., Kula, M. R. *Purification and protein characterization of hydroxynitrile lyases from Sorghum and Almond.* **1992**, *Biotechnol. Appl. Bioc.* 15: 90-99.
- [58] Dreveny, I., Andryushkova, A. S., Glieder, A., Gruber, K., Kratky, C. *Substrate binding in the FAD-dependent hydroxynitrile lyase from Almond provides insight into the mechanism of cyanohydrin formation and explains the absence of dehydrogenation activity.* **2009**, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 48: 3370-3377.
- [59] Hu, Z. H., Poulton, J. E. *Sequencing, genomic organization, and preliminary promoter analysis of a black cherry (R)-(+)-mandelonitrile lyase gene.* **1997**, *Plant Physiol.* 115: 1359-1369.
- [60] Hu, Z. H., Poulton, J. E. *Molecular analysis of (R)-(+)-mandelonitrile lyase microheterogeneity in black cherry.* **1999**, *Plant Physiol.* 119: 1535-1546.

- [61] Yemm, R. S., Poulton, J. E. *Isolation and characterization of multiple forms of mandelonitrile lyases from Mature black cherry (Prunus serotina ehrh) seeds.* **1986**, *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 440-445.
- [62] Ueatrongchit, T., Kayo, A., Komeda, H., Asano, Y., H-Kittikun, A. *Purification and characterization of a novel (R)-hydroxynitrile lyase from Eriobotrya japonica (Loquat).* **2008**, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 6: 1513-1522.
- [63] Ueatrongchit, T., Komeda, H., Asano, Y., H-Kittikun, A. *Parameters influencing asymmetric synthesis of (R)-mandelonitrile by a novel (R)-hydroxynitrile lyase from Eriobotrya japonica.* **2009**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 56: 208-214.
- [64] Wajant, H., Mundry, K. W. *Hydroxynitrile lyase from Sorghum bicolor - A glycoprotein heterotetramer.* **1993**, *Plant Sci.* 89: 127-133.
- [65] Seely, M. K., Criddle, R. S., Conn, E. E. *Metabolism of aromatic compounds in higher plants. 8. On requirement of hydroxynitrile lyase for flavin.* **1966**, *J. Biol. Chem.* 241: 4457-4462.
- [66] Smitskamp-Wilms, E., Brussee, J., Vandergen, A., Vanscharrenburg, G. J. M., Sloothaak, J. B. *Hydroxynitrile lyases from almond and sorghum as biocatalysts.* **1991**, *Recl. Trav. Chim. Pay. B.* 110: 209-215.
- [67] Wajant, H., Böttlinger, H., Mundry, K. W. *Purification of hydroxynitrile lyase from Sorghum bicolor L (Sorghum) by affinity chromatography using monoclonal antibodies.* **1993**, *Biotechnol. Appl. Bioc.* 18: 75-82.
- [68] Heim, P. *Die Hydroxynitril-Lyasen aus Linum usitatissimum (Lein) und Sorghum bicolor (Hirse).* **2002**, *Dissertation*, Universität Düsseldorf.
- [69] Lauble, H., Miehlich, B., Forster, S., Wajant, H., Effenberger, F. *Crystal structure of hydroxynitrile lyase from Sorghum bicolor in complex with the inhibitor benzoic acid: A novel cyanogenic enzyme.* **2002**, *Biochemistry.* 41: 12043-12050.
- [70] Bauer, M., Geyer, R., Boy, M., Griengl, H., Steiner, W. *Stability of the enzyme (S)-hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis.* **1998**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 5: 343-347.
- [71] Hanefeld, U., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J. *Enzymatic formation and esterification of (S)-mandelonitrile.* **2001**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11: 213-218.
- [72] Selmar, D., Lieberei, R., Biehl, B., Conn, E. E. *Alpha-hydroxynitrile lyase in Hevea brasiliensis and its significance for rapid cyanogenesis.* **1989**, *Physiol. Plantarum.* 75: 97-101.
- [73] Wagner, U. G., Hasslacher, M., Griengl, H., Schwab, H., Kratky, C. *Mechanism of cyanogenesis: The crystal structure of hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis.* **1996**, *Structure (Cambridge, Ma, U. S.).* 4: 811-822.

- [74] Andexer, J., von Langermann, J., Mell, A., Bocola, M., Kragl, U., Eggert, T., Pohl, M. *An R-selective hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* with an alpha/beta-hydrolase fold.* **2007**, *Angew. Chem., Int. Ed.* 46: 8679-8681.
- [75] Fuhshuku, K., Asano, Y. *Synthesis of (R)-beta-nitro alcohols catalyzed by R-selective hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* in the aqueous-organic biphasic system.* **2011**, *J. Biotechnol.* 153: 153-159.
- [76] Gruber-Khadjawi, M., Purkarthofer, T., Skranc, W., Griengl, H. *Hydroxynitrile lyase-catalyzed enzymatic nitroaldol (Henry) reaction.* **2007**, *Adv. Synth. Catal.* 349: 1445-1450.
- [77] Padhi, S. K., Fujii, R., Legatt, G. A., Fossum, S. L., Berchtold, R., Kazlauskas, R. J. *Switching from an esterase to a hydroxynitrile lyase mechanism requires only two amino acid substitutions.* **2010**, *Chem. Biol.* 17: 863-871.
- [78] Carvalho, J. P. C. C. *Studies on the aliphatic ketone cyanohydrin hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* Crantz.* **1981**, *University of California.*
- [79] Siritunga, D., Arias-Garzon, D., White, W., Sayre, R. T. *Over-expression of hydroxynitrile lyase in transgenic cassava roots accelerates cyanogenesis and food detoxification.* **2004**, *Plant Biotechnol. J.* 2: 37-43.
- [80] Lauble, H., Decanniere, K., Wajant, H., Förster, S., Effenberger, F. *Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of hydroxynitrile lyase from cassava (*Manihot esculenta*).* **1999**, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 55: 904-906.
- [81] Lauble, H., Förster, S., Miehlich, B., Wajant, H., Effenberger, F. *Structure of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in complex with substrates acetone and chloroacetone: implications for the mechanism of cyanogenesis.* **2001**, *Acta Crystallogr. Sec. D: Biol. Crystallogr.* 57: 194-200.
- [82] Lauble, H., Miehlich, B., Förster, S., Kobler, C., Wajant, H., Effenberger, F. *Structure determinants of substrate specificity of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta*.* **2002**, *Protein Sci.* 11: 65.
- [83] Gruber, K., Gartler, G., Krammer, B., Schwab, H., Kratky, C. *Reaction mechanism of hydroxynitrile lyases of the alpha/beta-hydrolase superfamily - The three-dimensional structure of the transient enzyme-substrate complex certifies the crucial role of LYS236.* **2004**, *J. Biol. Chem.* 279: 20501-20510.
- [84] Chueskul, S., Chulavatnatol, M. *Properties of alpha-hydroxynitrile lyase from the petiole of cassava (*Manihot esculenta* Crantz).* **1996**, *Arch. Biochem. Biophys.* 334: 401-405.
- [85] Wajant, H., Förster, S., Böttinger, H., Effenberger, F., Pfizenmaier, K. *Acetone cyanohydrin lyase from *Manihot esculenta* (cassava) is serologically distinct from other hydroxynitrile lyases.* **1995**, *Plant Sci.* 108: 1-11.

- [86] Guterl, J. K., Andexer, J. N., Sehl, T., von Langermann, J., Frindi-Wosch, I., Rosenkranz, T., Fitter, J., Gruber, K., Kragl, U., Eggert, T. *Uneven twins: Comparison of two enantiocomplementary hydroxynitrile lyases with α/β -hydrolase fold.* **2009**, *J. Biotechnol.* 141: 166-173.
- [87] Okrob, D., Metzner, J., Wiechert, W., Gruber, K., Pohl, M. *Tailoring a stabilized variant of hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana*.* **2012**, *ChemBioChem*. DOI: 10.1002/cbic.201100619
- [88] Andexer, J. *Die erste R-selektive Hydroxynitril-Lyase mit alpha/beta-Hydrolasefaltung.* **2008**, *Dissertation*. Universität Düsseldorf.
- [89] Steiner, K., Hajnal, I., Lyskowski, A., Steinkellner, G., Gruber, K., Schwab, H. *Characterisation of bacterial hydroxynitrile lyases with high homology to cupin superfamily proteins.* **2011**, *Abstract Book: 10th Biotrans (Sicily - Italy)*. Poster 288: 143.
- [90] Wohlgemuth, R. *Biocatalysis - key to sustainable industrial chemistry.* **2010**, *Curr. Opin. Biotech.* 21: 713-724.
- [91] Glieder, A. *R-HNL random variants and their use for preparing optically pure, sterically hindered cyanohydrins.* **2008**, *DSM. Patent-Nr: WO 2008071695*
- [92] Ritzen, B., van, O., MCM, van, D., FL, Rutjes, F. P. J. T. *Enantioselective chemoenzymatic synthesis of trans-aziridines.* **2009**, *J. Org. Chem.* 74: 7548-7551.
- [93] Schmidt, M., Griengl, H. *Oxynitrilases: from cyanogenesis to asymmetric synthesis.* **1999**, *Top. Curr. Chem.* 200: 193-226.
- [94] von Langermann, J., Guterl, J. K., Pohl, M., Wajant, H., Kragl, U. *Hydroxynitrile lyase catalyzed cyanohydrin synthesis at high pH-values.* **2008**, *Bioprocess Biosyst Eng.* 31: 155-161.
- [95] Andexer, J. N., Langermann, J. V., Kragl, U., Pohl, M. *How to overcome limitations in biotechnological processes - examples from hydroxynitrile lyase applications.* **2009**, *Trends Biotechnol.* 27: 599-607.
- [96] Costes, D., Wehtje, E., Adlercreutz, P. *Hydroxynitrile lyase-catalyzed synthesis of cyanohydrins in organic solvents - Parameters influencing activity and enantiospecificity.* **1999**, *Enzyme Microb. Tech.* 25: 384-391.
- [97] Effenberger, F., Ziegler, T., Förster, S. *Enzyme-catalyzed cyanohydrin synthesis in organic-solvents.* **1987**, *Angew. Chem., Int. Ed.* 26: 458-460.
- [98] Klibanov, A. M. *Improving enzymes by using them in organic solvents.* **2001**, *Nature*. 409: 241-246.
- [99] Effenberger, F. *Synthesis and reactions of optically-active cyanohydrins.* **1994**, *Angew. Chem., Int. Ed.* 33: 1555-1564.

- [100] Ziegler, T., Horsch, B., Effenberger, F. *A convenient route to (R)-alpha-hydroxy carboxylic-acids and (2R)-1-amino-2-alkanols from (R)-cyanohydrins*. **1990**, *Synthesis Stuttgart*. 7: 575-578.
- [101] Gerrits, P. J., Willeman, W. F., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J., Brussee, J., van, d. G., A. *Mass transfer limitation as a tool to enhance the enantiomeric excess in the enzymatic synthesis of chiral cyanohydrins*. **2001**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 15: 111-121.
- [102] Willeman, W. F., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J. *Reaction temperature optimization procedure for the synthesis of (R)-mandelonitrile by Prunus amygdalus hydroxynitrile lyase using a process model approach*. **2002**, *Enzyme Microb. Technol.* 30: 200-208.
- [103] Pöchlauer, P. *Synthesis of homochiral cyanohydrins in an industrial environment: Hydroxynitrile lyases offer new options*. **1998**, *Chimica oggi*. 16: 15-19.
- [104] von Langermann, J., Mell, A., Paetzold, E., Daußmann, T., Kragl, U. *Hydroxynitrile lyase in organic solvent-free systems to overcome thermodynamic limitations*. **2007**, *Adv. Synth. Catal.* 349: 1418-1424.
- [105] Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Bona, R., Rumbold, K., Luckl, J., Griengl, H., Kohlwein, S. D., Schwab, H. *High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree Hevea brasiliensis in microbial hosts*. **1997**, *Protein Express. Purif.* 11: 61-71.
- [106] Semba, H., Dobashi, Y., Matsui, T. *Expression of hydroxynitrile lyase from Manihot esculenta in Yeast and its application in (S)-mandelonitrile production using an immobilized enzyme reactor*. **2008**, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 1457 - 1463.
- [107] Asano, Y., Dadashipour, M., Yamazaki, M., Doi, N., Komeda, H. *Functional expression of a plant hydroxynitrile lyase in Escherichia coli by directed evolution: creation and characterization of highly in vivo soluble mutants*. **2011**, *Protein Eng. Des. Sel.* 24: 607-616.
- [108] Schmidt, M., Herve, S., Klempier, N., Griengl, H. *Preparation of optically active cyanohydrins using the (S)-hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis*. **1996**, *Tetrahedron*. 52: 7833-7840.
- [109] Hickel, A., Graupner, M., Lehner, D., Hermetter, A., Glatter, O., Griengl, H. *Stability of the hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis: a fluorescence and dynamic light scattering study*. **1997**, *Enzyme Microb. Tech.* 21: 361-366.
- [110] Costes, D., Rotcenkovs, G., Wehtje, E., Adlercreutz, P. *Stability and stabilization of hydroxynitrile lyase in organic solvents*. **2001**, *Biocatal. Biotrans.* 19: 119-130.
- [111] Paravidino, M., Sorgedrager, M. J., Orru, R. V. A., Hanefeld, U. *Activity and enantioselectivity of the hydroxynitrile lyase MeHNL in dry organic solvents*. **2010**, *Chem.-Eur. J.* 16: 7596-7604.

- [112] Sheldon, R. A. *Enzyme immobilization: The quest for optimum performance*. **2007**, *Adv. Synth. Catal.* 349: 1289–1307.
- [113] Gaisberger, R. P., Fechter, M. H., Griengl, H. *The first hydroxynitrile lyase catalysed cyanohydrin formation in ionic liquids*. **2004**, *Tetrahedron: Asymmetry*. 15: 2959-2963.
- [114] Diaz, J. F., Balkus, K. J. *Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve*. **1996**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2: 115-126.
- [115] Yiu, H. H. P., Wright, P. A. *Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic-organic hybrid*. **2005**, *J. Mater. Chem.* 15: 3690-3700.
- [116] Vinu, A., Murugesan, V., Tangermann, O., Hartmann, M. *Adsorption of cytochrome c on mesoporous molecular sieves: Influence of pH, pore diameter, and aluminum incorporation*. **2004**, *Chem. Mater.* 16: 3056-3065.
- [117] Hartmann, M., Jung, D. *Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends*. **2010**, *J. Mater. Chem.* 20: 844-857.
- [118] Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. *Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports*. **1998**, *Chem. Phys. Lipids*. 93: 185-197.
- [119] Gómez, J. M., Romero, M. D., Fernández, T. M., Garcíá, S. *Immobilization and enzymatic activity of beta-glucosidase on mesoporous SBA-15 silica*. **2010**, *J. Porous Mater.* 17: 657-662.
- [120] Manyar, H. G., Gianotti, E., Sakamoto, Y., Terasaki, O., Coluccia, S., Tumbiolo, S. *Active Biocatalysts Based on Pepsin Immobilized in Mesoporous SBA-15*. **2008**, *J. Phys. Chem. C*. 112: 18110-18116.
- [121] Shah, P., Sridevi, N., Prabhune, A., Ramaswamy, V. *Structural features of Penicillin acylase adsorption on APTES functionalized SBA-15*. **2008**, *Micropor Mesopor Mat.* 116: 157-165.
- [122] Kannan, K., Jasra, R. V. *Immobilization of alkaline serine endopeptidase from *Bacillus licheniformis* on SBA-15 and MCF by surface covalent binding*. **2009**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 56: 34-40.
- [123] Szymanska, K., Bryjak, J., Jarzebski, A. B. *Immobilization of invertase on mesoporous silicas to obtain hyper active biocatalysts*. **2009**, *Top. Catal.* 52: 1030-1036.
- [124] Kim, M. I., Ham, H. O., Oh, S. D., Park, H. G., Chang, H. N., Choi, S. H. *Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles*. **2006**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 39: 62-68.
- [125] Tran, D. N., Balkus, K. J. J. *Perspective of recent progress in immobilization of enzymes*. **2011**, *ACS Catal.* 1: 956-968.

- [126] Lu, Y., Guo, Y., Wang, Y., Liu, X. H., Wang, Y., Guo, Y., Zhang, Z., Lu, G. *Immobilized penecillin G acylase on mesoporous silica: The influence of pore size, pore volume and mesophases.* **2008**, *Micropor. Mesopor. Mater.* 114: 507-510.
- [127] Quiocho, F. A., Richards, F. M. *Enzymatic behavior of carboxypeptidase A in solid state.* **1966**, *Biochem. (USA)*. 5: 4062-4076.
- [128] St. Clair, N. L., Navia, M. A. *Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts.* **1992**, *J. Am. Chem. Soc.* 114: 7314-7316.
- [129] Ayala, M., Horjales, E., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R. *Cross-linked crystals of chloroperoxidase.* **2002**, *Biochem. Bioph. Res. Co.* 295: 828-831.
- [130] Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P. G., van Rantwijk, F., van der Wielen, L. A. M., Sheldon, R. A. *Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs).* **2004**, *Biotechnol. Bioeng.* 87: 754-762.
- [131] Cao, L. Q., van, R., F, Sheldon, R. A. *Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase.* **2000**, *Org. Lett.* 2: 1361-1364.
- [132] Chmura, A., van der Kraan, G. M., Kielar, F., van Langen, L. M., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. *Cross-linked aggregates of the hydroxynitrile lyase from Manihot esculenta: Highly active and robust biocatalysts.* **2006**, *Adv. Synth. Catal.* 348: 1655-1661.
- [133] Cabirol, F. L., Lim, A. E. C., Hanefeld, U., Sheldon, R. A. *Straightforward enzymatic process based on HNL CLEA-catalysis towards cyanohydrin derivates.* **2009**, *Org. Process Res. Dev.* 14: 114-118.
- [134] Roberge, C., Amos, D., Pollard, D., Devine, P. *Preparation and application of cross-linked aggregates of chloroperoxidase with enhanced hydrogen peroxide tolerance.* **2009**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 56: 41-45.
- [135] Hara, P., Hanefeld, U., Kanerva, L. T. *Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from Burkholderia cepacia and their application in dry organic solvents.* **2008**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 50: 80-86.
- [136] Cabirol, F. L., Tan, P. L., Tay, B., Cheng, S., Hanefeld, U., Sheldon, R. A. *Linum usitatissimum hydroxynitrile lyase cross-linked enzyme aggregates: A recyclable enantioselective catalyst.* **2008**, *Adv. Synth. Catal.* 350: 2329-2338.
- [137] Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., Ottolenghi, M. *Biochemically active sol-gel glasses - The trapping of enzymes.* **1990**, *Mater. Lett.* 10: 1-5.
- [138] Pierre, A. C. *The sol-gel encapsulation of enzymes.* **2004**, *Biocatal. Biotrans.* 22: 145-170.

- [139] Pierre, A. C., Pajonk, G. M. *Chemistry of aerogels and their applications*. **2002**, *Chem. Rev.* 102: 4243-4265.
- [140] Veum, L., Hanefeld, U., Pierre, A. *The first encapsulation of hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis in a sol-gel matrix*. **2004**, *Tetrahedron*. 60: 10419-10425.
- [141] Maury, S., Buisson, P., Perrard, A., Pierre, A. C. *Compared esterification kinetics of the lipase from Burkholderia cepacia either free or encapsulated in a silica aerogel*. **2005**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 32: 193-203.
- [142] Reetz, M. T. *Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry*. **1997**, *Adv. Mater.* 9: 943-954.
- [143] Ishige, T., Honda, K., Shimizu, S. *Whole organism biocatalysis*. **2005**, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9: 174-180.
- [144] de Carvalho, C. C. C. R. *Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes*. **2011**, *Biotechnol. Adv.* 29: 75-83.
- [145] Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauss, U., Guterl, J. K., Wendorff, M., Losi, A., Gärtner, W., Jäger, K.-E. *Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen*. **2007**, *Nat. Biotechnol.* 25: 443-445.
- [146] Kiljunen, E., Kanerva, L. T. *(R)- and (S)-cyanohydrins using oxynitrilases in whole cells*. **1996**, *Tetrahedron: Asymmetry*. 7: 1105-1116.
- [147] Kiljunen, E., Kanerva, L. T. *Sorghum bicolor shoots in the synthesis of (S)-mandelonitrile*. **1994**, *Tetrahedron: Asymmetry*. 5: 311-314.
- [148] Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. *Industrial Biotransformations*. **2006**, 2nd ed.: 455.
- [149] Jong, W. S. P., Sauri, A., Luirink, J. *Extracellular production of recombinant proteins using bacterial autotransporters*. **2010**, *Curr. Opin. Biotech.* 21: 646-652.
- [150] Choi, J. H., Lee, S. Y. *Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli*. **2004**, *Appl. Microbiol. Biot.* 64: 625-635.
- [151] Bond, A. E., Row, P. E., Dudley, E. *Post-translation modification of proteins; methodologies and applications in plant sciences*. **2011**, *Phytochemistry*. 72: 975-996.
- [152] Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., Schafer, F. *Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): A review*. **2009**, *Method. Enzymol.* 463: 439-473.
- [153] Eijsink, V. G. H., Bjork, A., Gaseidnes, S., Sirevag, R., Synstad, B., van den Burg, B., Vriend, G. *Rational engineering of enzyme stability*. **2004**, *J. Biotechnol.* 113: 105-120.
- [154] Polizzi, K. M., Bommarius, A. S., Broering, J. M., Chaparro-Riggers, J. F. *Stability of biocatalysts*. **2007**, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11: 220-225.

- [155] Eijsink, V. G. H., Gaseidnes, S., Borchert, T. V., van den Burg, B. *Directed evolution of enzyme stability*. **2005**, *Biomol. Eng.* 22: 21-30.
- [156] Strohbach, J. W., Tanis, S. P., Moon, M. W., Nieman, J. A., Beauchamp, T. J., Northuis, J. M., McGhee, W. D. *Preparation of pyridoquinoxaline antivirals*. **2002**, Pharmica & Upjohn Company. Patent-Nr: WO 2003053971.
- [157] Asano, Y., Akiyama, T., Yu, F., Sato, E. *Substitutional variants of hydroxynitrile lyase with high specific activity and methods of use*. **2011**, Mitsubishi Rayon. Patent-Nr: US 08030053.
- [158] Friedrich, T., Kesseler, M., Hauer, B. *New isolated polypeptide having (S)-hydroxynitrile lyase activity, useful for producing cyanohydrins, specifically the (S)-enantiomers of optically active cyanohydrins*. **2004**, BASF. Patent-Nr: WO2004090124.
- [159] Ichige, E., Semba, H., Shijuku, T., Harayama, S. *Novel modified S-hydroxynitrile lyase SHNL having acid resistance and obtained by substituting amino acids in wild-type SHNL sequence derived from cassava or para rubber tree, useful for producing optically active cyanohydrin*. **2008**, Nippon Shokubai. Patent-Nr: WO2007037354.
- [160] Ichige, E., Semba, H., Shijuku, T., Harayama, S. *Modified S-hydroxynitrile lyase*. **2009**, Nippon Shokubai. Patent-Nr: US 07214523.
- [161] Semba, H., Ichige, E., Mukouyama, M. *Method for production of S-hydroxynitrile lyase by use of Escherichia coli*. **2007**, Nippon Shokubai. Patent-Nr: US 07214523.
- [162] Semba, H., Ichige, E. *Novel modified S-hydroxynitrile lyase derived from Manihot esculenta and Hevea brasiliensis, useful for preparing optically active cyanohydrins*. **2009**, Nippon Shokubai. Patent-Nr: WO2008041272.
- [163] Schwab, H., Glieder, A., Kratky, C., Dreveny, I., Bona, R., Pochlauer, P., Skranc, W., Mayrhofer, H., Wirth, I., Neuhofer, R. *Isolated protein having hydroxynitrile lyase activity*. **2007**, DSM. Patent-Nr: US 07202075.
- [164] Glieder, A., Gruber, K., Luiten, R., Skranc, W., Weis, R. *New R-hydroxynitrile lyases from Prunus amygdalus or Prunus serotina, useful for preparing enantiopure R- or S-cyanohydrins*. **2009**, DSM. Patent-Nr: EP 1613748.
- [165] Roos, J., Stelzer, U., Effenberger, F. *Synthesis of (1R,cis,alpha S)-cypermethrine via lipase catalyzed kinetic resolution of racemic m-phenoxybenzaldehyde cyanohydrin acetate*. **1998**, *Tetrahedron: Asymmetry*. 9: 1043-1049.
- [166] Osprian, I., Fechter, M. H., Griengl, H. *Biocatalytic hydrolysis of cyanohydrins: an efficient approach to enantiopure alpha-hydroxy carboxylic acids*. **2003**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 24-5: 89-98.
- [167] Tromp, R. A., van der Hoeven, M., Amore, A., Brussee, J., Overhand, M., van der Marel, G. A., van der Gen, A. *Synthesis of Fmoc-protected (2S,3S)-2-hydroxy-3-*

- amino acids from a furyl substituted chiral cyanohydrin.* **2003**, *Tetrahedron: Asymmetry*. 14: 1645-1652.
- [168] Cabirol, F. L., Hanefeld, U., Sheldon, R. A. *Immobilized hydroxynitrile lyases for enantioselective synthesis of cyanohydrins: Sol-gels and cross-linked enzyme aggregates.* **2006**, *Adv. Synth. Catal.* 348: 1645-1654.
- [169] Effenberger, F., Eichhorn, J., Roos, J. *Enzyme-catalyzed addition of hydrocyanic acid to substituted picaldehydes - A novel synthesis of (R)-pantolactone.* **1995**, *Tetrahedron: Asymmetry*. 6: 271-282.
- [170] Kobler, C., Bohrer, A., Effenberger, F. *Hydroxynitrile lyase-catalyzed addition of HCN to 2- and 3-substituted cyclohexanones.* **2004**, *Tetrahedron*. 60: 10397-10410.
- [171] van Langen, L. M., Selassa, R. P., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. *Cross-linked aggregates of (R)-oxynitrilase: A stable, recyclable biocatalyst for enantioselective hydrocyanation.* **2005**, *Organic Letters*. 7: 327-329.
- [172] Willeman, W. F., Hanefeld, U., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J. *Estimation of kinetic parameters by progress curve analysis for the synthesis of (R)-mandelonitrile by Prunus amygdalus hydroxynitrile lyase.* **2000**, *Enzyme Microb. Technol.* 27: 423-433.
- [173] Hanefeld, U., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J. *Study of the (S)-hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis: mechanistic implications.* **1999**, *Biochim. Biophys. Acta, Prot. Struct. Mol. Enzym.* 1432: 185-193.
- [174] Dreveny, I., Gruber, K., Glieder, A., Thompson, A., Kratky, C. *The hydroxynitrile lyase from almond a lyase that looks like an oxidoreductase.* **2001**, *Structure* (Cambridge, U.K.). 9: 803-815.
- [175] Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.* **2007**, *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1451-1463.
- [176] Sheldon, R. A. *Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts.* **2011**, *Org. Proc. Res. Dev.* 15: 213-223.
- [177] Vieille, C., Zeikus, G. J. *Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability.* **2001**, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 1-43.
- [178] Fernandez-Lafuente, R. *Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation.* **2009**, *Enzyme Microb. Tech.* 45: 405-418.
- [179] Ahern, T. J., Casal, J. I., Petsko, G. A., Klibanov, A. M. *Control of oligomeric enzyme thermostability by protein engineering.* **1987**, *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 675-679.
- [180] Bjork, A., Dalhus, B., Mantzas, D., Sirevag, R., Eijsink, V. G. H. *Large improvement in the thermal stability of a tetrameric malate dehydrogenase by single point mutations at the dimer-dimer interface.* **2004**, *J. Mol. Biol.* 341: 1215-1226.

- [181] Yuan, Z., Zhao, J., Wang, Z. X. *Flexibility analysis of enzyme active sites by crystallographic temperature factors.* **2003**, *Protein Eng.* 16: 109-114.
- [182] Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E. *Understanding enzyme immobilisation.* **2009**, *Chem. Soc. Rev.* 38: 453-468.
- [183] Grimsley, G. R., Scholtz, J. M., Pace, C. N. *A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins.* **2009**, *Protein. Sci.* 18: 247-251.

1. **Methoden zur integrierten Analyse metabolischer Netzwerke unter statio-nären und instationären Bedingungen**
von S. A. Wahl (2008), 245 Seiten
ISBN: 978-3-89336-506-7
2. **Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)**
von M. Wittlich (2008), XVIII, 185 Seiten
ISBN: 978-3-89336-510-4
3. **Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GA-BARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen**
von J. Mohrlüder (2008), V, 158 Seiten
ISBN: 978-3-89336-511-1
4. **Struktur und Funktion von Transaminasen aus *Corynebacterium glutami-cum***
von J. Marienhagen (2008), VI, 154 Seiten
ISBN: 978-3-89336-512-8
5. **Implementierung eines Funk-Protokolls (IEEE 802.15.4) und Entwicklung eines adaptiven Zeitsynchronisationsverfahrens für ein Netzwerk intelli-genter und autarker Sensoren**
von M. Schlösser (2008), 77 Seiten
ISBN: 978-3-89336-519-7
6. **Etablierung und Optimierung der sekretorischen Gewinnung thermostabi-ler Lipasen in Gram-positiven Bakterien**
von H. Brundiek (2008), VIII, 154 Seiten
ISBN: 978-3-89336-520-3
7. **Visuospatial Attention: Neural Correlates and Pharmacological Modulation in Healthy Subjects and Patients with Spatial Neglect**
by S. Vossel (2008), XIV, 176 pages
ISBN: 978-3-89336-526-5
8. **Analyse des Substratspektrums der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum***
von J.-E. Schweitzer (2008), V, 130 Seiten
ISBN: 978-3-89336-528-9
9. **Adaptive Verfahren zur automatischen Bildverbesserung kernspintomo-graphischer Bilddaten als Vorverarbeitung zur Segmentierung und Klassi-fikation individueller 3D-Regionen des Gehirns**
von J. Castellanos (2008), VI, 100 Seiten
ISBN: 978-3-89336-539-5

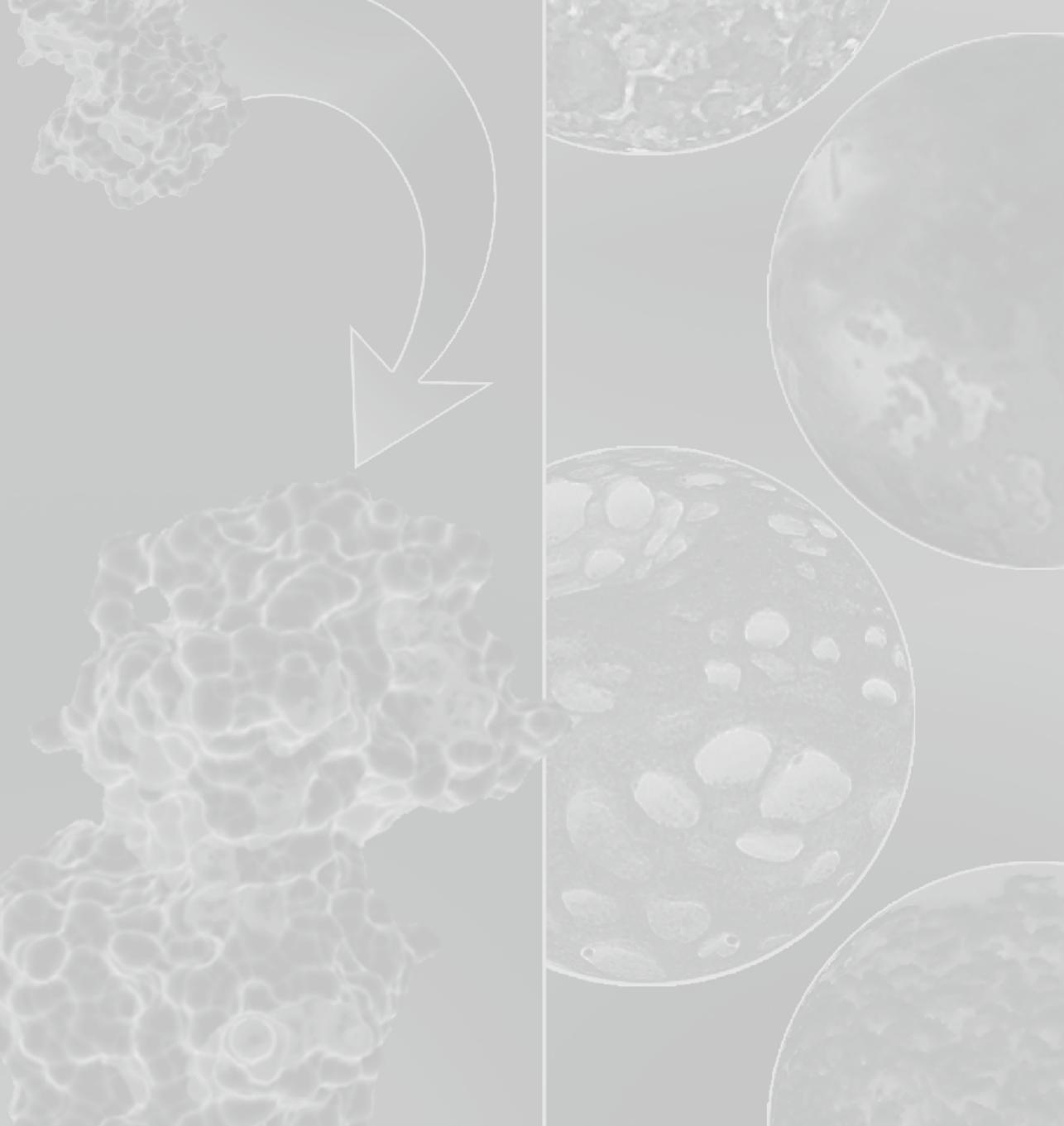
10. **Posttranskriptionale Regulation der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum***
von C. Schultz (2009), VII, 151 Seiten
ISBN: 978-3-89336-560-9
11. **MtrA, ein bifunktionaler Antwortregulator aus *Corynebacterium glutamicum***
von M. Brocker (2009), VI, 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-561-6
12. **Strukturelle Charakterisierung von GABRAP-Ligand-Interaktionen**
von Y. Thielmann (2009), 166 Seiten (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-563-0
13. **Acceleration on an image reconstruction algorithm for Positron Emission Tomography using a Graphics Processing Unit**
by T. Felder (2009), 97 pages
ISBN: 978-3-89336-566-1
14. **NMR-Lösungsstruktur der Loopregion Tyr⁶⁷ - Leu⁷⁷ des visuellen Arrestins im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin**
von S. Feuerstein (2009), XVI, 140 Seiten
ISBN: 978-3-89336-571-5
15. **Development of a Process for the Cleavage of a Mucin Fusion Protein by Enterokinase**
by T. Kubitzki (2009), IV, 133 pages
ISBN: 978-3-89336-575-3
16. **Children's health and RF EMF exposure**
project coord. P. Wiedemann (2009), 49 pages
ISBN: 978-3-89336-594-4
17. **Entwicklung einer Signalerfassungselektronik für eine Halbleiter-Photomultiplier (SiPM) Matrix**
von C. Parl (2009), IV, 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-595-1
18. **Medienorientierung biomedizinischer Forscher im internationalen Vergleich**
Die Schnittstelle von Wissenschaft & Journalismus und ihre politische Relevanz
herausg. von H. P. Peters (2009), 364 Seiten
ISBN: 978-3-89336-597-5
URN: urn.nbn:de: 0001-00542

19. **Identifizierung von Interaktionspartnern für HIV-1 Nef und ihre potentielle Relevanz bei der Entwicklung der HIV-assoziierten Demenz**
von J. Möller (2010), VI, 172 Seiten
ISBN: 978-3-89336-604-0
20. **Biotransformationen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen**
von D. Zehentgruber (2010), XI, 147 Seiten
ISBN: 978-3-89336-605-7
21. **Studies on central carbon metabolism and respiration of *Gluconobacter oxydans* 621H**
by T. Hanke (2010), 120 pages
ISBN: 978-3-89336-607-1
22. **Prozessentwicklung zur Produktion von 2-Keto-L-Gulonsäure, einer Vitamin C- Vorstufe**
von B. Osterath (2010), XXI, 213 Seiten
ISBN: 978-3-89336-612-5
23. **Visuell evozierte Antworten der corticalen Areale V1/V2 und V5/MT nach Schachbrettmusterumkehrreizung – Magnetenzephalographische Untersuchungen in Kombination mit cytoarchitektonischen Wahrscheinlichkeitskarten**
von B. U. Barnikol (2010), III, 138 Seiten
ISBN: 978-3-89336-615-6
24. **Biochemische und regulatorische Analyse des TCA-Zyklus und Glyoxylat-Shunts in *Escherichia coli***
von M. Kunze (2010), 191 Seiten
ISBN: 978-3-89336-620-0
25. **Metabolomanalyse als Grundlage für ¹³C-Stoffflussanalyse und dynamischer Modellierung am Beispiel der Lysinbiosynthese**
von M. G. Wellerdiek (2010), xvi, 182 Seiten
ISBN: 978-3-89336-621-7
26. **Neue Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme für die Synthese enantiokomplementärer 2-Hydroxyketone**
von G. Kolter (2010), IX, 168 Seiten
ISBN: 978-3-89336-626-2
27. **Genetische Analyse von Substrat-Translokase-Wechselwirkungen bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli***
von F. Lausberg (2010), 174 Seiten
ISBN: 978-3-89336-628-6
28. **Silicium Nanodrähte für die extrazelluläre Ableitung elektrischer Aktivität**
von J. F. Eschermann (2010), xii, 191 Seiten
ISBN: 978-3-89336-639-2

29. **Causality measures between neural signals from invasively and non-invasively obtained local field potentials in humans**
by E. Florin (2010), xxix, 220 pages
ISBN: 978-3-89336-646-0
30. **Regulatory and metabolic aspects of the phosphate starvation response of *Corynebacterium glutamicum***
by H. M. Woo (2010), III, 111 pages
ISBN: 978-3-89336-664-4
31. **Ligand interaction analysis of membrane-anchored proteins**
by J. Glück (2010) VIII, 87 pages (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-683-5
32. **Novel insights into characteristics, relevance, and regulation of coryne-bacterial aconitase**
by M. Baumgart (2010), V, 147 pages
ISBN: 978-3-89336-682-8
33. **Investigation of GABARAP complexes with apoptosis-related proteins and structural characterization of GABARAP lipidation**
by P. Ma (2011), VI, 139 pages (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-699-6
34. **GABARAP-artige Proteine, Nix und Bcl-2: Strukturelle Basis molekularer Interaktionen an der Schnittstelle zwischen Autophagie und Apoptose**
von M. Schwartzen (2011), VIII, 164 Seiten (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-700-9
35. **Einflussfaktoren auf die Stabilität und Aktivität der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* in Carboligasereaktionen mit aromati-schen Aldehyden**
von M. Schwarz (2011), XI, 176 Seiten
ISBN: 978-3-89336-701-6
36. **Untersuchungen zur Bildung von D-Aminosäuren mit *Corynebacterium glutamicum***
von N. C. Stäbler (2011), VIII, 104 Seiten
ISBN: 978-3-89336-702-3
37. **Charakterisierung von Wirkstoffen für die Diagnose und Therapie von Morbus Alzheimer**
von D. Bartnik (2011), XII, 105 Seiten
ISBN: 978-3-89336-703-0
38. **Identifizierung und Charakterisierung von Regulatoren der Acyl-CoA Carboxylasen in *Corynebacterium glutamicum***
von J. Nickel (2011), IV, 127 Seiten
ISBN: 978-3-89336-712-2

39. **Metabolische 13C-Stoffflussanalyse vom isotopisch stationären zum instationären Fall**
von K. Grönke (2011), getr. pag.
ISBN: 978-3-89336-713-9
40. **Enzyme supported crystallization of chiral amino acids**
by K. Würges (2011), XI, getr. pag.
ISBN: 978-3-89336-715-3
41. **Systemische Analyse des Citratzyklus in *Corynebacterium glutamicum***
von J. van Ooyen (2011), 116 Seiten
ISBN: 978-3-89336-731-3
42. **Einfluss intrazellulärer Nukleotid-Cofaktoren auf Redoxreaktionen in rekombinanten Ganzzellsystemen**
von D. Minör (2011), XII, 138 Seiten
ISBN: 978-3-89336-737-5
43. **Development of ¹⁸F-labelled radioligands for molecular imaging of the dopamine D4 receptor**
by F. Kügler (2011), xiv, 161 pages
ISBN: 978-3-89336-738-2
44. **Personalisierte Medizin im Gesundheitssystem der Zukunft. Einflussfaktoren und Szenarien**
von C.R. Karger, B. Hüsing (2011), viii, 99 Seiten
ISBN: 978-3-89336-743-6
45. **Charakterisierung von Proteinen einer neuartigen Signaltransduktionskaskade in *Corynebacterium glutamicum***
von G. Bosco (2011), V, 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-754-2
46. **CopRS and CsoR: two regulatory systems involved in copper homeostasis of *Corynebacterium glutamicum***
by S. V. Schelder (2012), IV, 90 pages
ISBN: 978-3-89336-761-0
47. **Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient succinate production**
by B. O. Litsanov (2012), III, 105 pages
ISBN: 978-3-89336-762-7
48. **Der Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex in *Corynebacterium glutamicum* und seine Interaktion mit Odhl**
von K. Raasch (2012), VI, 86 Seiten
ISBN: 978-3-89336-764-1

49. **Signaltransduktion in *Corynebacterium glutamicum*:**
Studien zur Rolle von Proteinen mit einer FHA-Domäne
von S. Krawczyk (2012), 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-771-9
50. **Analysis of functional domains of Par-4**
by U.K. Tiruttani Subhramanyam (2012), 85 pages
ISBN: 978-3-89336-766-5
51. **Transcriptional responses and transcriptional regulators of *Gluconobacter oxydans* 621H**
by S. K. Schweikert (2012), XVI, 140 pages
ISBN: 978-3-89336-780-1
52. **Characterization of the human mu opioid receptor:
Structural and functional studies of a G protein-coupled receptor**
by Y. Ma (2012), 129 pages
ISBN: 978-3-89336-767-2
53. **Optimierung der Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* für die
enantio-selektive Synthese von (R)-Cyanhydrinen**
Entwicklung und Etablierung geeigneter Reaktionsparameter und molekulare
Stabilisierung durch rationales Enzymdesign
von D. Okrob (2012), XV, 135 Seiten
ISBN: 978-3-89336-782-5



Gesundheit / Health
Band / Volume 53
ISBN 978-3-89336-782-5

 **JÜLICH**
FORSCHUNGSZENTRUM