

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>BIOKATALYSATOREN; INDUSTRIELLE RELEVANZ UND FORSCHUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>UNKONVENTIONELLE REAKTIONSMEDIEN.....</b>	<b>4</b>
1.2.1	Enzymreaktionen in wasserfreien unkonventionellen Medien .....	5
1.2.2	Reaktionssysteme mit wassermischbaren Kosolventien .....	6
1.2.3	Zweiphasensysteme.....	7
1.2.3.1	Wässrig-organische Zweiphasensysteme.....	7
1.2.3.1.1	Stabilität von Enzymen in wässrig-organischen Zweiphasensystemen .....	11
<b>1.3</b>	<b>BEDEUTUNG UND SYNTHESE CHIRALER 2-HYDROXYKETONE .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4</b>	<b>THIAMINDIPHOSPHAT-ABHÄNGIGE ENZYME .....</b>	<b>16</b>
1.4.1	Der Kofaktor Thiamindiphosphat (ThDP).....	16
1.4.2	Reaktionszyklus ThDP-abhängiger Enzyme.....	18
1.4.3	Struktur ThDP-abhängiger Enzyme .....	21
1.4.4	Spezielle Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme .....	23
1.4.4.1	Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) aus <i>Pseudomonas putida</i> .....	23
1.4.4.2	Benzaldehydlyase (BAL) aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	24
1.4.4.3	BAL und BFD: Struktur, Aktivität und Stabilität im Vergleich.....	26
<b>1.5</b>	<b>AKTIVITÄT UND STABILITÄT DER BAL IN UNKONVENTIONELLEN MEDIEN .....</b>	<b>29</b>
1.5.1	Verwendung von Kosolventien.....	29
1.5.2	BAL in wässrig-organischen Zweiphasensystemen.....	33
<b>2</b>	<b>MOTIVATION UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>38</b>
3.1.1	Chemikalien und Enzyme .....	38
3.1.2	Geräte .....	38
3.1.3	Computerprogramme und Datenbanken .....	39
3.1.4	Bakterienstämme.....	40
3.1.5	Plasmide .....	40
<b>3.2</b>	<b>PH-MESSUNG .....</b>	<b>41</b>
3.2.1	pH-Messung in rein wässrigen Puffern.....	41
3.2.2	pH-Messung nach Zugabe organischer Substanzen.....	41
<b>3.3</b>	<b>KULTIVIERUNG VON BAKTERIENSTÄMMEN .....</b>	<b>42</b>
3.3.1	Nährmedien .....	42
3.3.2	Kultivierung von Flüssig- und Plattenkulturen .....	42
3.3.3	Kultivierung von Proteinexpressionskulturen.....	42

3.3.4	Hochzelldichtekultivierung .....	43
3.3.5	Bestimmung der Zelldichte .....	44
3.3.6	Proteinexpression der BAL-Varianten .....	44
<b>3.4</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....</b>	<b>44</b>
3.4.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	44
3.4.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	44
3.4.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	45
3.4.4	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	45
3.4.5	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	46
3.4.6	Sequenzierung von DNA .....	46
<b>3.5</b>	<b>PROTEINCHEMISCHE METHODEN .....</b>	<b>46</b>
3.5.1	Zellaufschluss mittels Sonifikation .....	46
3.5.2	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford.....	47
3.5.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	48
3.5.4	Färbung von SDS-Gelen .....	49
3.5.4.1	Färben von SDS-Gelen mittels Coomassie.....	49
3.5.4.2	Färben von SDS Gelen mittels Silberfärbung.....	49
<b>3.6</b>	<b>REINIGUNG UND LAGERUNG REKOMBINANTER PROTEINE.....</b>	<b>49</b>
3.6.1	Reinigung mittels Immobilisierter Metallaffinitätschromatographie über eine Ni <sup>2+</sup> -NTA-Matrix.....	49
3.6.2	Größenausschlusschromatographie mittels Sephadex G-25 Matrix .....	50
3.6.3	Lagerung gereinigter Proteine .....	51
<b>3.7</b>	<b>SYNTHESE VON BENZOIN-DERIVATEN .....</b>	<b>51</b>
3.7.1	Synthese von 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin .....	51
3.7.2	Synthese von 4,4'-Dichlorbenzoin .....	52
<b>3.8</b>	<b>HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC).....</b>	<b>52</b>
3.8.1	Reversed-phase HPLC .....	53
3.8.1.1	Kalibrierung .....	54
3.8.2	Chirale-Analytik.....	55
<b>3.9</b>	<b>BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄTEN.....</b>	<b>56</b>
3.9.1	Kontinuierliche Aktivitätstests.....	56
3.9.1.1	Gekoppelter photometrischer Test zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität (BFDH281A) .....	56
3.9.1.2	Gekoppelter photometrischer Test zur Bestimmung der Lyaseaktivität (BAL).....	58
3.9.1.3	Etablierung eines direkten fluoreszenzphotometrischen Test zur Bestimmung der Ligaseaktivität (BAL) .....	59
3.9.1.3.1	Etablierung des fluoreszenzphotometrischen Aktivitätstests am LS-50B .....	61

3.9.1.3.2	Anpassung des fluoreszenzphotometrischen Aktivitätstest am Fluorolog 3-22 (Horiba Jobin Yvon).....	72
3.9.2	Diskontinuierliche Aktivitätstests (BAL).....	78
3.9.2.1	Ermittlung der Ligaseaktivität abhängig von der 4-Chlorbenzaldehydkonzentration .....	79
3.9.2.2	Ermittlung der Ligaseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	79
3.9.2.3	Ermittlung der Lyaseaktivität abhängig von der 4,4'-Dichlorbenzoinkonzentration .....	80
3.9.3	Bestimmung der kinetischen Parameter ( $V_{\max}$ und $K_M$ ).....	80
3.9.4	Kolorimetrischer Test.....	81
<b>3.10</b>	<b>BESTIMMUNG DER ENZYMSTABILITÄTEN .....</b>	<b>82</b>
3.10.1	Stabilität gegenüber Rühreffekten.....	82
3.10.1.1	Bestimmung der Stabilität gegenüber magnetischem Rühren .....	82
3.10.1.2	Bestimmung der Stabilität mittels Schaufelrührer .....	83
3.10.2	Bestimmung der Stabilität in 2-Phasen .....	84
3.10.3	Bestimmung der Stabilität gegenüber aromatischen Aldehyd Substraten .....	85
3.10.4	Ermittlung der Desaktivierungskonstanten $k_{\text{des}}$ und der Halbwertszeit.....	87
3.10.5	Stabilität der BAL und der BAL-Deletionsvarianten in Puffer .....	89
<b>3.11</b>	<b>REAKTIVIERUNGSANALYSEN .....</b>	<b>89</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>91</b>
<b>4.1</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN DER VERSCHIEDENEN EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE STABILITÄT DER BAL .....</b>	<b>91</b>
4.1.1	Stabilität gegenüber Rühreffekten.....	91
4.1.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Rührstabilität .....	97
4.1.3	Einfluss einer Grenzfläche auf die Stabilität der BAL.....	100
4.1.4	Einfluss von Substraten auf die Stabilität der BAL .....	104
4.1.5	Umstellung des Test- und des Puffersystems zur Ermittlung der Stabilität der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden .....	105
4.1.6	Ermittlung des Einfluss von Benzaldehyd auf die Stabilität der BAL mittels des HPLC-basierten Testsystems .....	106
4.1.7	Einfluss aromatischer Aldehyde auf die Stabilität der <i>BFDH281A</i> .....	108
<b>4.2</b>	<b>ANALYSE DER ENZYM-INKTIVIERENDEN EFFEKTE DURCH VERSCHIEDENE AROMATISCHE ALDEHYDE.....</b>	<b>108</b>
4.2.1	Inaktivierung der BAL durch verschiedene Benzaldehyd-Derivate .....	109
4.2.2	Einfluss des pH auf die Stabilität der BAL mit aromatischen Substraten .....	113
4.2.3	Reaktivierung nach Entfernung der Aldehyde .....	116
4.2.4	Abhängigkeit der Inaktivierung vom Enzym-Substrat Verhältnis .....	120

---

<b>4.3</b>	<b>MÖGLICHKEITEN ZUR STABILISIERUNG DER BAL</b> .....	<b>126</b>
4.3.1	Vergleich von Aktivität und Stabilität der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden bei verschiedenen pH-Werten.....	127
4.3.2	Hypothese: Inaktivierung durch Schiffbasenbildung.....	134
4.3.2.1	Vergleichende Analyse der Lysinreste in BAL und BFD .....	134
4.3.2.2	BAL-Varianten zur Überprüfung der Schiffbasen-Hypothese .....	137
4.3.3	Überprüfung von strukturell der BFD angeglichenen BAL-Varianten.....	139
4.3.3.1	Planung und Charakterisierung von BFD ähnlichen BAL Varianten.....	139
4.3.3.2	Einfluss des C-Terminus auf die Stabilität der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden .....	144
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>150</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSION AND OUTLOOK</b> .....	<b>155</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>160</b>