

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

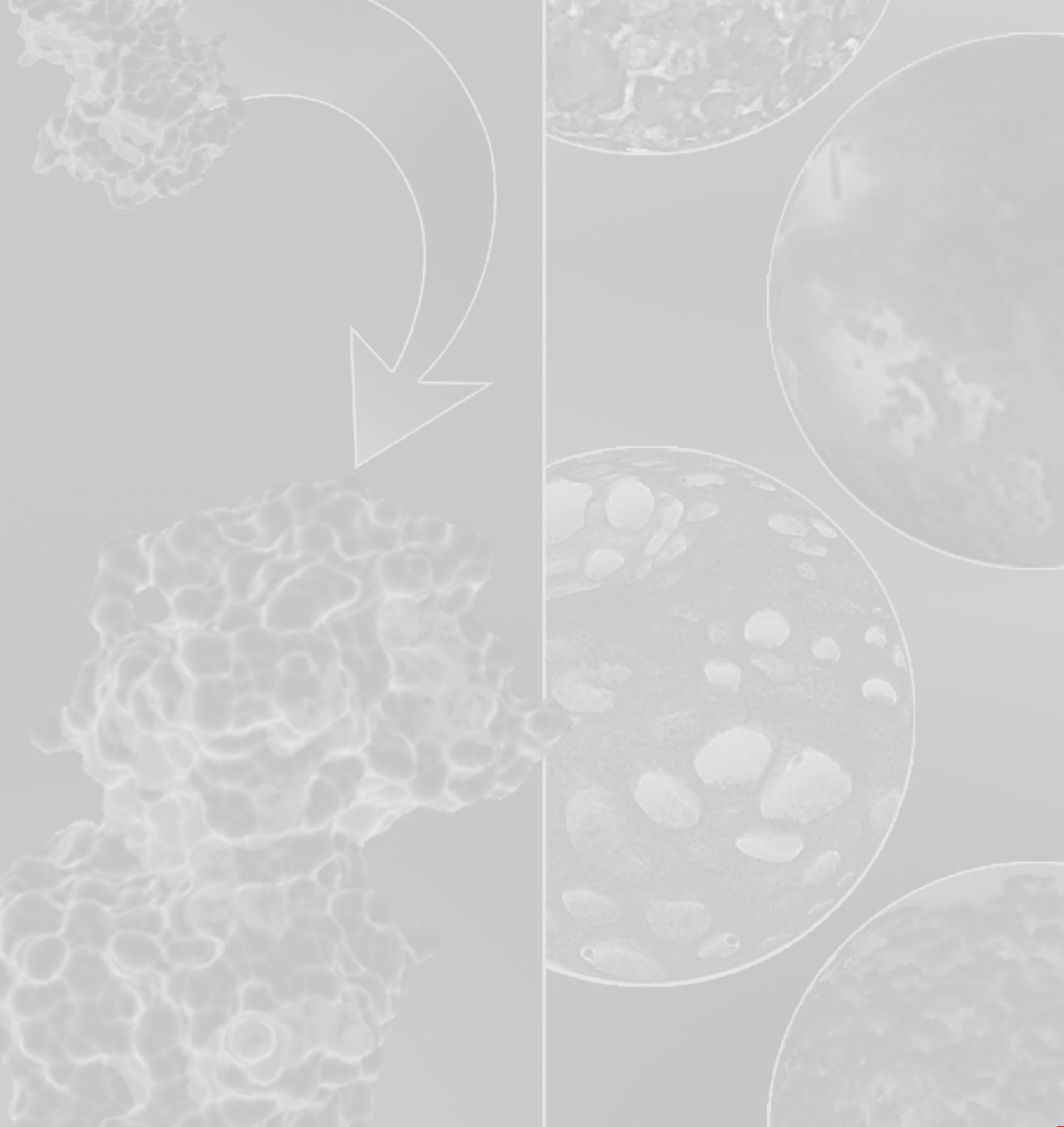
INHALTSVERZEICHNIS

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>Pa</i> HNL für den industriellen Einsatz.....	32
1.4.3.2.	Optimierung der <i>Hb</i> HNL	34
1.4.3.3.	Optimierung der <i>Me</i> HNL	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>At</i> HNL	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>At</i> HNL durch den gezielten Austausch von Aminosäuren der Enzymoberfläche	66
4.	Diskussion	73
4.1.	Die <i>At</i> HNL als potentieller technischer Biokatalysator	73
4.2.	Etablierung geeigneter Reaktionsparameter für die <i>At</i> HNL.....	76
4.3.	Synthese von industriell relevanten Cyanhydrinen mittels immobilisierter <i>At</i> HNL	81
4.3.1.	Die Reinigung von HNLs und der Einsatz ganzer Zellen	81
4.3.1.1.	Vergleich der <i>At</i> HNL-Präparationsmethoden	82

4.3.2.	Synthese von (<i>R</i>)-Cyanhydrinen mittels immobilisierter <i>AfHNL</i> und durch Ganzzellbiokatalyse.....	84
4.3.2.1.	Trägerbeladung und Etablierung der immobilisierten <i>AfHNL</i>	85
4.3.2.1.1.	Präparation von Celite- <i>AfHNL</i>	73
4.3.2.1.2.	Präparation von Solgel- <i>AfHNL</i>	86
4.3.2.1.3.	Etablierung eines Herstellungsprotokolls für <i>AfHNL</i> -CLEAs	86
4.3.3.	Gegenüberstellung der Enzymaktivität und Selektivität verschiedener <i>AfHNL</i> -Präparationen.....	88
4.3.3.1.	Vergleichende Cyanhydrinsynthesen	89
4.3.3.1.1.	Solgel- <i>AfHNL</i> zeigt die höchste Enzymaktivität	91
4.3.3.1.2.	Celite- <i>AfHNL</i> zeigt eine leicht reduzierte Enzymaktivität	91
4.3.3.1.3.	<i>AfHNL</i> -CLEAs verlieren viel Enzymaktivität und sind schlecht präparierbar	92
4.3.3.1.4.	Bei der (<i>R</i>)-2-Hydroxyheptannitril-Synthese ist der Einfluss der Enzympräparation besonders groß	92
4.3.4.	Der Einfluss des Wassergehalts auf die Synthese von Cyanhydrinen... 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>AfHNL</i>	94
4.3.5.	Ganzzellbiotransformationen zur Synthese von Cyanhydrinen	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>AfHNL</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>AfHNL</i>	104
4.3.6.2.2.	(<i>R</i>)-Mandelsäurenitrilsynthese mit <i>AfHNL</i> -CLEAs	105
4.3.6.2.3.	(<i>R</i>)-Mandelsäurenitrilsynthese mit Solgel- <i>AfHNL</i>	105
4.3.6.2.4.	(<i>R</i>)-Mandelsäurenitrilsynthese mit Celite- <i>AfHNL</i>	106
4.3.6.2.5.	(<i>R</i>)-Mandelsäurenitrilsynthese mittels Ganzzellbio-katalyse.....	106
4.3.7.	Vergleich der Produktivität der <i>AfHNL</i> -Präparationen zur etablierten <i>PaHNL</i>	107
4.4.	Stabilisierung der <i>AfHNL</i> durch rationales Enzymdesign	108
4.4.1.	Sequenzieller und struktureller Vergleich von <i>AfHNL</i> und <i>MeHNL</i>	108

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



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

 **JÜLICH**
FORSCHUNGSZENTRUM