

Untersuchungen zur Produktion und zielgerichteten Immobilisierung rekombinanter Lipasen

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften -

der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Herrn Dipl.-Ing. Martin Wolfram
geb. am 04.09.1984 in Ebersdorf / Thür.

Halle (Saale), 2017

Gutachter:

1. Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Prof. Dr. Jörg Kreßler
3. Prof. Dr.-Ing. Rudolf Hausmann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.05.2018

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Martin Wolfram, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, dass keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht worden sind.

Die Dissertation hat in der gegenwärtigen bzw. in einer anderen Fassung noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Halle, 01.08.2017

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Lehrstuhl für Aufarbeitung biotechnischer Produkte des Institutes für Pharmazie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften. An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die zum Vollenden der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Aufgabenstellung, die sehr gute Betreuung und die konstruktiven Diskussionen während der gesamten Promotionsdauer.

Bei Herrn Prof. Dr. Jörg Kreßler und Herrn Prof. Dr.-Ing. Rudolf Hausmann möchte ich mich für die Übernahme der Begutachtung der Arbeit bedanken.

Der Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) danke ich für die finanzielle Förderung meiner Promotion.

Der Firma EUCODIS Bioscience und insbesondere Herrn Dr. Jan Modregger möchte ich für die Bereitstellung der DNA-Sequenzen der Lipasen und der entsprechenden Vektoren danken.

Mein Dank gilt ebenso Frau Dr. Andrea Heinz (AG Biopharmazie) und Herrn Dr. Christian Ihling (AG Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik) des Instituts für Pharmazie für die massenspektrometrischen Untersuchungen der Lipase-Proben.

Bei Herrn Frank Ullmann (Institut für Biochemie / Biotechnologie) bedanke ich mich für all die Hilfestellungen und Ratschläge bei technischen Problemen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Aufarbeitung biotechnischer Produkte“ danke ich für die gute Zusammenarbeit, die offene und freundschaftliche Atmosphäre sowie die vielen lustigen Stammtischtreffen und gemeinsamen Unternehmungen.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Franziska Seifert und Herrn Dr. Thomas Hertel für ihre stets offenen Ohren, die hilfreichen Diskussionen und ihre wertvollen Ratschläge bedanken.

Ein herzlicher Dank für die tatkräftige Unterstützung geht auch an René Heppner, der in seiner Diplomarbeit die Produktion und Reinigung der Lipase LipA untersuchte sowie an Zaid Alhajjaj, der sich in seiner Masterarbeit mit der Reinigung und Immobilisierung der Lipase LipT1-WT beschäftigte.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden, meiner Familie und insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder für ihre Unterstützung, die Ermutigungen und ihr Verständnis bedanken.

Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung	I
Danksagung	II
Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen	III
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungen	VII
1 Einleitung	1
1.1 Lipasen.....	2
1.1.1 Eigenschaften von Lipasen.....	2
1.1.2 <i>Bacillus</i> – Lipasen.....	4
1.1.3 Anwendungsmöglichkeiten	6
1.2 Immobilisierung	8
1.2.1 Kopplung über Aminogruppen	9
1.2.2 Kopplung über Thiolgruppen.....	12
1.2.3 Zielgerichtete Immobilisierung	13
1.3 Potentielle Lipase-Anwendungen in Bioraffinerie-prozessen	18
1.4 Motivation	20
1.5 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Chemikalien.....	22
2.2 Geräte	24
2.3 Puffer.....	26
2.4 Nährmedien.....	27
2.5 Enzyme	29
2.6 Trägermaterialien	30
2.7 Inkubationskammern für Objektträger.....	31
2.8 Analytik.....	31
2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.8.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität.....	32
2.8.2.1 Titrimetrische Bestimmung der Lipase-Aktivität	32
2.8.2.2 Colorimetrische Bestimmung der Lipase-Aktivität.....	32
2.8.2.3 Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität	34
2.8.3 Bestimmung der Glycerinkonzentration	36
2.8.4 Untersuchung der Plasmidstabilität.....	36

2.8.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.8.5.1	Färbung mittels Coomassie.....	37
2.8.5.2	Silberfärbung.....	38
2.9	Methoden	39
2.9.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen.....	39
2.9.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen.....	39
2.9.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> im Schüttelkolben.....	40
2.9.4	Biotrockenmassebestimmung	40
2.9.5	Kultivierung von <i>E. coli</i> im Bioreaktor.....	41
2.9.6	Zellaufschluss.....	41
2.9.6.1	Hochdruckhomogenisation.....	41
2.9.6.2	Enzymatischer Zellaufschluss mittels Lysozym	42
2.9.7	Lipase-Reinigung über His ₆ -tag	42
2.9.7.1	Säulenchromatographie	42
2.9.7.2	Batch-Adsorption.....	43
2.9.8	Dialyse und Lagerung	43
2.9.9	Produktion der mikrobiellen Transglutaminase	43
2.9.10	Nachweis MTG-reaktiver Glutaminreste	44
2.9.11	Nachweis MTG-reaktiver Aminogruppen	44
2.9.12	Lipase-Immobilisierung mittels MTG.....	45
2.9.13	Nachweis der Proteinmodifikation mittels ESI-MS.....	46
2.9.14	Recycling von Lipase-Immobilisat.....	46
2.9.15	Lipase-Kopplung an funktionalisierte Glasobjektträger.....	46
2.9.16	Bestimmung der Thermostabilität der Cys-Varianten	47
2.9.17	Modifikation löslicher Lipasen mit Glutaraldehyd	47
2.9.18	Immobilisierung auf GA-aktivierte Träger.....	48
2.9.19	Immobilisierung auf oxiranaktivierte Träger.....	48
2.9.20	Immobilisierung mittels His ₆ -tag.....	49
2.9.21	Recycling His ₆ -tag gekoppelter Lipase.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Produktion der Lipasen LipT1-WT, LipA und LipL1.....	50
3.1.1	Untersuchung der Produktion der Lipase LipT1-WT im Schüttelkolbenmaßstab	51
3.1.2	Untersuchung der Lipase-Produktion im Bioreaktor.....	52
3.1.3	Affinitätsreinigung der Lipasen.....	56
3.2	Immobilisierung der Lipasen.....	60
3.2.1	Lipase-Immobilisierung mittels mikrobieller Transglutaminase.....	60

3.2.1.1	Untersuchung der Verfügbarkeit MTG-reaktiver Glutaminreste innerhalb der Lipase LipT1-WT	61
3.2.1.2	Design eines Glutamin-Peptid-tags zur zielgerichteten Immobilisierung	62
3.2.1.3	Nachweis reaktiver Glutaminreste der Q-Tag-Lipasen	64
3.2.1.4	Nachweis MTG-reaktiver Aminogruppen des Trägermaterials.....	65
3.2.1.5	Untersuchung der Kopplung verschiedener Varianten der Lipase LipT1 mittels MTG	66
3.2.1.6	Einfluss der Pufferbedingungen auf Adsorptions- und Kopplungsverhalten	68
3.2.1.7	Direkte Kopplung der Lipase-Varianten aus <i>E. coli</i> -Rohextrakt	70
3.2.1.8	Untersuchung der Trägerbeladung.....	71
3.2.1.9	Einfluss der mehrmaligen MTG-Zugabe auf die Lipase-Kopplung ..	73
3.2.1.10	Untersuchung der Desaminierung des Q-Tags.....	74
3.2.1.11	Wiederverwendbarkeit der immobilisierten Lipase LipT1-CQ	77
3.2.2	Lipase-Immobilisierung über Thiolgruppen	79
3.2.2.1	Untersuchung der Multimerisierung der LipT1-Cys-Varianten	80
3.2.2.2	Einfluss des Reduktionsmittels DTT auf die Lipase-Aktivität.....	81
3.2.2.3	Untersuchung der Lipase-Kopplung auf funktionalisierte Glasobjektträger	83
3.2.2.4	Untersuchung der Stabilität der immobilisierten Cys-Varianten bei Wiederverwendung.....	85
3.2.2.5	Untersuchung der Thermostabilität der immobilisierten Cys-Varianten.....	87
3.2.3	Lipase-Immobilisierung über Aminogruppen	88
3.2.3.1	Einfluss von Glutaraldehyd auf die Lipase-Aktivität in Lösung	89
3.2.3.2	Immobilisierung der Lipasen mittels Glutaraldehyd	92
3.2.4	Untersuchung der Lipase-Aktivierung durch Glutaraldehyd	96
3.2.4.1	Untersuchung der Aktivierung durch <i>n</i> -Valeraldehyd.....	96
3.2.4.2	Einfluss von Triton X-100 und NaCl auf die Lipase-Aktivierung	97
3.2.4.3	Untersuchung des Aktivierungsverhaltens von LipA.....	98
3.2.4.4	Einfluss der GA-Konzentration auf das Aktivierungsverhalten	100
3.2.4.5	Einfluss der Reaktionsdauer und Reduktion mit NaBH ₃ CN auf die Aktivierung	101
3.2.4.6	Untersuchung der GA-Lipase-Aktivierung gegenüber Triacylglyceriden	103
3.2.5	Lipase-Immobilisierung über Histidin	105

3.2.5.1	Kopplung der unmodifizierten Lipase LipT1-WT	105
3.2.5.2	Einfluss der GA-Modifikation und Trägerbeladung auf die Lipase-Kopplung	106
3.2.5.3	Untersuchung der Wiederverwendbarkeit der mittels His ₆ -tag immobilisierten Lipase GA-LipT1-WT	108
4	Diskussion	110
4.1	Produktion der Lipasen	110
4.2	Reinigung der Lipasen	114
4.3	Immobilisierung von Lipasen	116
4.3.1	Einflussfaktoren auf die Immobilisierung	116
4.4	Immobilisierung mittels MTG	120
4.5	Immobilisierung über Thiolgruppen	124
4.6	Immobilisierung über Aminogruppen	128
4.7	Lipase-Aktivierung durch Glutaraldehyd	130
4.8	Immobilisierung mittels Polyhistidin-tag	135
5	Zusammenfassung	139
6	Ausblick	141
7	Literatur	143
8	Anhang	163
8.1	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	163
8.2	Ergänzende Ergebnisse	166
9	Lebenslauf	170

Abkürzungen

A _T	Titrimetrisch bestimmte Lipase-Aktivität
A _C	Colorimetrisch bestimmte Lipase-Aktivität
A _{MTG}	Transglutaminase-Aktivität
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BA	Batch-Adsorption
β-ME	β-Mercaptoethanol
BFM	Biofeuchtmasse
BTM	Biotrockenmasse
BR	Bioreaktor
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BTL2	<i>Bacillus thermacatenulatus</i> Lipase 2
CaIB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CaIA	<i>Candida antarctica</i> Lipase A
CMC	<i>Critical micelle concentration</i>
CNBr	Cyanogenbromid
CV	<i>Column volume</i>
CPG-GA	<i>Controlled pore glass</i> mit Glutaraldehyd aktiviert
CRL	<i>Candida rugose</i> Lipase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
D	Dialyse
DTT	Dithiothreitol
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ESI	<i>Electro spray ionization</i>
GA	Glutaraldehyd
Gl.	Gleichung
Glc	Glucose
GST	Glutathion-S-Transferase
HDH	Hochdruckhomogenisator
HLL	<i>Humicola lanuginosa</i> Lipase
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IDA	<i>Iminodiacetic acid</i>
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
k.A.	keine Angabe
k _L a	volumenbezogener Sauerstoffeintragskoeffizient
LDAO	<i>N,N-Dimethyldodecylamin N-oxid</i>
M	Marker
MAL	Maleinimid
MDC	Monodansylcadaverin
MW	<i>Molecular weight</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
MS	Massenspektrometrie

NC	Natrium-Caseinat
Ni ²⁺ -SC	<i>Streamline chelating</i> beladen mit Nickelionen
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
OD	Optische Dichte
OT	Objekträger
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Lipase
PGA	Penicillin G Acylase
PLA	Poly lactide
PM	Produktionsmedium
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat
PP	Probenpuffer
PVC	Polyvinylchlorid
RE	Rohextrakt
RML	<i>Rhizomucor miehei</i> Lipase
RT	Raumtemperatur
R _f	Reinigungsfaktor
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SK	Schüttelkolben
T	Totalacrylamidkonzentration
TAG	Triacylglycerid
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLL	<i>Thermomyces lanuginosus</i> Lipase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U _C	Einheit der Lipase-Aktivität im colorimetrischen Test
U _T	Einheit der Lipase-Aktivität im titrimetrischen Test
VA	Valeraldehyd
V ₀	Startvolumen
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen / volumetrisch
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen

Übliche internationale physikalische und biochemische Abkürzungen werden nicht gesondert aufgeführt. Englische Begriffe werden im Text kursiv dargestellt.

1 Einleitung

Enzyme sind als Biokatalysatoren für den Stoffwechsel aller lebenden Organismen von zentraler Bedeutung. Sie ermöglichen einen effizienten Ablauf der zellulären Stoffwechselprozesse unter physiologischen Bedingungen. Ihnen kommt auch in vielen technischen Anwendungen eine große Bedeutung zu. Enzymkatalysierte Reaktionen sind Bestandteil zahlreicher industrieller Prozesse und konnten bereits konventionelle, rein chemisch katalysierte Verfahren ablösen [Schmid *et al.*, 2001; Adrio und Demain, 2014]. Aufgrund ihrer Chemo-, Regio- und Stereoselektivität weisen Enzyme deutliche Vorteile gegenüber vielen herkömmlichen Katalysatoren auf. Enzymatisch katalysierte Reaktionen ermöglichen durch Verringerung der Bildung von Nebenprodukten zum einen Vereinfachungen im Reinigungsprozess und somit eine hohe Produktqualität und Reinheit. Zum anderen können Entsorgungsprobleme von anfallenden Neben- und Abfallprodukten vermieden werden [Pollard und Woodley, 2007; Sanchez und Demain, 2011]. Auch aus energetischer Sicht bieten Biokatalysatoren Vorzüge gegenüber chemischen Katalysatoren. Da Enzymreaktionen in der Regel unter milden Reaktionsbedingungen ablaufen, kann auf die Anwendung oft benötigter hoher Temperaturen und Drücke verzichtet werden. Daraus resultieren Einsparungen im Hinblick auf Energiekosten und Ausstoß von CO₂ [Adrio und Demain, 2014]. Der globale Markt für industrielle Enzyme wurde 2013 auf 4,8 Milliarden US\$ geschätzt. Bis zum Jahr 2018 wird eine Steigerung auf über 7 Milliarden US\$ prognostiziert [BBC-Research, 2014; Freedonia, 2014].

Lipasen (Triacylglycerolhydrolasen) nehmen unter den industriellen Biokatalysatoren eine besondere Stellung ein. Sie benötigen keine Cofaktoren und sind selbst unter nicht-physiologischen Bedingungen aktiv, wodurch ein Einsatz in organischen Lösungsmitteln [Zaks und Klibanov, 1985] und ionischen Flüssigkeiten ermöglicht wird [Ha *et al.*, 2008]. Sie sind zudem in der Lage ein breites Spektrum an Substraten umzusetzen, wobei die Katalyse reaktionsspezifisch und mit teils hoher Regio- und Stereoselektivität abläuft [Jaeger *et al.*, 1999; Reetz, 2002]. Diese Eigenschaften machen Lipasen für die Synthese von Feinchemikalien und besonders für den Aufbau chiraler Moleküle interessant [Kourist *et al.*, 2014]. Neben der Produktion pharmazeutischer Wirkstoffe [Patel, 2008] kommen Lipasen auch in der Nahrungsmittel- [Rajendran *et al.*, 2009], Kosmetik- [Antonopoulou *et al.*, 2016] und Waschmittelindustrie zum Einsatz [Hasan *et al.*, 2010]. Nicht zuletzt spielt die Nutzung von Lipasen eine zunehmende Rolle bei der Produktion von Biodiesel [Norjannah *et al.*, 2016]. Trotz des bereits breiten Einsatzspektrums wird davon ausgegangen, dass das Anwendungspotenzial von Enzymen und besonders von Lipasen noch nicht ausgeschöpft ist. Aus diesem Grund stellt die Forschung nach neuen und verbesserten Biokatalysatoren eine der Herausforderungen der modernen Biotechnologie dar [Nagarajan, 2012; Daiha *et al.*, 2015].

1.1 Lipasen

1.1.1 Eigenschaften von Lipasen

Lipasen (E.C. 3.1.1.3) gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen und kommen ubiquitär in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen vor [Saxena *et al.*, 1999]. Sie können sowohl intrazellulär als auch extrazellulär auftreten. Da ihre natürliche Funktion in der hydrolytischen Spaltung von Triacylglyceriden (TAG) in freie Fettsäuren und Glycerin besteht (Abbildung 1-1), spielen sie eine tragende Rolle im Fettstoffwechsel des Organismus. Neben der Hydrolyse sind die meisten Lipasen auch in der Lage Veresterungen und verschiedene Umesterungen (Acidolyse, Alkoholyse, Interesterifikation) zu katalysieren, die bevorzugt in organischen Lösungsmitteln ablaufen [Jaeger und Eggert, 2002; Ribeiro *et al.*, 2011].

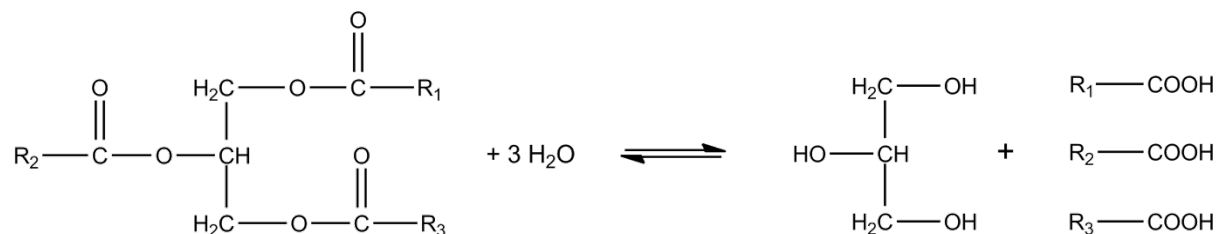


Abbildung 1-1: Reaktionsschema der lipasekatalysierten Hydrolyse bzw. Synthese von Triacylglyceriden (R₁ – R₃: Fettsäurereste).

Aufgrund ihrer Sekundärstruktur können Lipasen den α/β -Hydrolasen zugeordnet werden, d.h. sie weisen mindestens fünf parallele β -Faltblätter auf, die untereinander jeweils durch α -Helices verbunden sind [Schrag und Cygler, 1997]. Das aktive Zentrum wird aus einer katalytischen Triade der Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat (in Ausnahmen auch Glutamat) gebildet [Brady *et al.*, 1990]. Der katalytische Serinrest ist dabei in ein konserviertes Motiv der Anordnung Gly - X - Ser - X - Gly eingebettet, wobei X für eine beliebige Aminosäure stehen kann [Arpigny und Jaeger, 1999].

Die lipasekatalysierte Hydrolyse von Esterbindungen verläuft im Wesentlichen in vier Schritten und folgt einem Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus (Abbildung 1-2). Zunächst findet ein nukleophiler Angriff des Serinrestes auf die Carbonylgruppe des Substrates statt [Jaeger *et al.*, 1999]. Durch Bindung des Substrates bildet sich ein tetraedrisches Intermediat aus. Dies wird durch die beiden Aminosäuren Histidin und Aspartat sowie durch die Amidgruppen der Oxyanion-Tasche stabilisiert. Anschließend wird ein Proton des Histidinrestes auf das Sauerstoffatom der Abgangsgruppe übertragen, wodurch der Alkohol abgespalten wird und ein Acyl-Enzym-Komplex entsteht. In diesem Komplex ist der Serinrest kovalent mit der Säuregruppe der Fettsäure verbunden. Zur Deacylierung des Enzyms ist ein erneuter Angriff eines Nukleophils (z.B. Wasser) notwendig, wobei ein zweiter tetraedrischer Übergangszustand entsteht. Durch Übertragung des am Histidin lokalisierten Protons auf den Sauerstoff des Serins wird die Bindung zwischen Enzym und Säuregruppe gespalten und das Produkt freigesetzt.

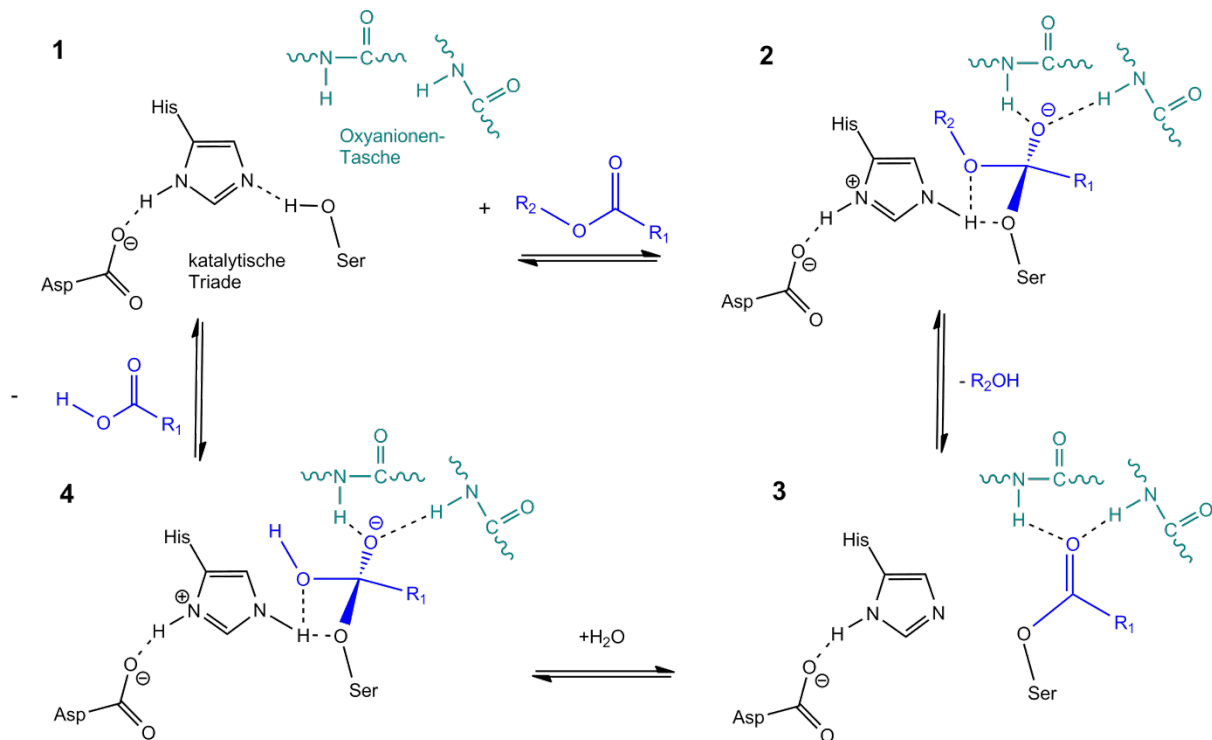


Abbildung 1-2: Reaktionsmechanismus der lipasekatalysierten Esterhydrolyse. 1: Freies Enzym; 2: tetraedrisches Intermediat 1; 3: Acyl-Enzym; 4: tetraedrisches Intermediat 2; modifiziert nach [Jaeger *et al.*, 1999].

Eine Besonderheit vieler Lipasen stellt die sogenannte Grenzflächenaktivierung dar. Charakteristisch für diesen Effekt ist ein sprunghafter Anstieg der Aktivität, sobald die Löslichkeitsgrenze des Substrates überschritten wird und sich in der wässrigen Phase entsprechende Grenzflächen ausbilden [Verger und Haas, 1976; Reis *et al.*, 2009]. Die Ursache für diese Aktivitätssteigerung konnte durch Aufklärung der dreidimensionalen Strukturen verschiedener Lipasen ermittelt werden [Brady *et al.*, 1990; Winkler *et al.*, 1990; Carrasco-Lopez *et al.*, 2009]. Dabei wurde das Vorhandensein einer α -helikalen Struktur, dem sogenannten „Deckel“ (*lid*), festgestellt, der das aktive Zentrum überdeckt und den Zugang für das Substrat blockiert. Der interne, zum aktiven Zentrum zugewandte Bereich der Deckelstruktur ist hydrophob, wohingegen der außenliegende Bereich eine hydrophile Oberfläche aufweist. Der Kontakt mit einer Substrat/Wasser-Grenzfläche induziert strukturelle Änderungen der Deckeldomäne, wodurch eine „offene“ Konformation entsteht und der Zugang zum aktiven Zentrum freigegeben wird [Brzozowski *et al.*, 1991; Derewenda *et al.*, 1992]. Durch die Öffnung des Deckels wird zusätzlich die lipophile Oberfläche des Enzyms vergrößert und die Anlagerung an die Grenzfläche erleichtert [Vasel *et al.*, 1993]. Das Vorhandensein einer Deckelstruktur und das Auftreten einer Grenzflächenaktivierung sind zwar typische Eigenschaften von Lipasen, allerdings kann anhand dieser Merkmale keine eindeutige Klassifizierung eines lipolytischen Enzyms zur Gruppe der Lipasen bzw. Esterasen vorgenommen werden. Es wurden bereits Enzyme identifiziert, die ein lipasekonformes Substratspektrum aufweisen, jedoch nicht über eine Deckeldomäne verfügen (Beispiel *Bacillus subtilis* Lipase A) [Jaeger *et al.*, 1993; Pouderoyen *et al.*, 2001] oder solche, die trotz vorhandener Deckeldomäne keine Grenzflächenaktivierung zeigen (Beispiel *Candida antarctica* Lipase B) [Uppenberg *et al.*, 1994; Martinelle *et al.*, 1995]. Aus

diesem Grund wurde die Substratspezifität als Kriterium zur Klassifizierung von Lipasen und Esterasen vorgeschlagen. Demzufolge können solche Enzyme als Lipasen eingeordnet werden, die in der Lage sind Triacylglyceride mit Fettsäuren ≥ 12 C-Atomen zu hydrolysieren [Verger, 1997]. Als Esterasen gelten dementsprechend Enzyme, die vorzugsweise kürzerkettige Substrate verwerten.

1.1.2 *Bacillus* – Lipasen

Lipasen werden von Mikroorganismen, Tieren und Pflanzen gebildet. Für industrielle Anwendungen sind vor allem mikrobielle Lipasen relevant, da sie vergleichsweise kostengünstig produziert werden können, breite Spezifitäten aufweisen und in einem weiten pH- und Temperaturbereich aktiv sind [Sharma *et al.*, 2001; Andualema und Gessesse, 2012].

Eine wichtige Gruppe unter den mikrobiellen Lipasen stellen Enzyme aus *Bacillus*-Spezies dar. Neben der einfachen Produktion und Zugänglichkeit für genetische Modifikationen zeichnen sich *Bacillus*-Lipasen durch ihre hohe Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln, hohen Temperaturen und pH-Werten aus [Treichel *et al.*, 2010; Guncheva und Zhiryakova, 2011]. Alle bisher bekannten *Bacillus*-Lipasen weisen im katalytischen Zentrum die Aminosäurefolge Ala - His - Ser - X - Gly als zentrales Element auf (X steht für Met oder Gln) [Arpigny und Jaeger, 1999; Guncheva und Zhiryakova, 2011]. Das in anderen mikrobiellen Lipasen konservierte Gly an Position 1 ist durch Ala ersetzt. Im Allgemeinen werden *Bacillus*-Lipasen in zwei Subfamilien eingeteilt [Arpigny und Jaeger, 1999]. Lipasen aus *B. subtilis*, *B. pumilus* und *B. licheniformis* werden der Subfamilie I.4 zugeordnet. Sie besitzen mit 19 - 20 kDa ein vergleichsweise geringes Molekulargewicht. Die katalytische Triade wird von den Aminosäuren Ser77, Asp133 und His156 gebildet. Aufgrund des Fehlens einer Deckeldomäne ist das aktive Zentrum durchgängig lösungsmittlexponiert (Abbildung 1-3) [Pouderoyen *et al.*, 2001].

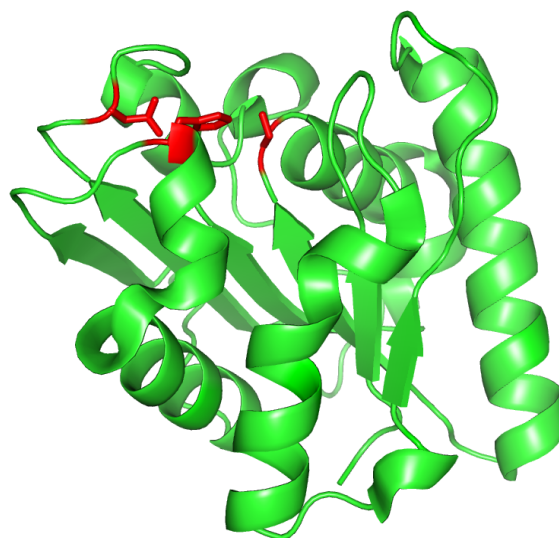


Abbildung 1-3: 3D-Struktur der Lipase A aus *B. subtilis*. Aminosäurereste der katalytischen Triade (Ser77, Asp133 und His156) in rot (*sticks*). *Ribbon*-Darstellung erstellt mit *pymol* basierend auf PDB-Eintrag 1I6W nach [Pouderoyen *et al.*, 2001].

Im Gegensatz zu den meisten Lipasen ist eine Unterscheidung zwischen offener und geschlossener Konformation somit nicht möglich. Lipasen aus Subfamilie I.4 besitzen keine Cysteinreste und bilden daher keine Disulfidbrücken aus [Nthangeni *et al.*, 2001]. Sie weisen keine besonders hohe Thermostabilität auf, da bereits bei Temperaturen oberhalb von 45 °C ein deutlicher Aktivitätsverlust auftritt. Jedoch besitzen sie eine bemerkenswerte Alkalistabilität im pH-Bereich von 9 - 12 [Lesuisse *et al.*, 1993; Litantra *et al.*, 2013].

Zur Subfamilie I.5 werden hauptsächlich Lipasen aus verschiedenen *Geobacillus*-Spezies wie z.B. *G. thermocatenulatus*, *G. stearothermophilus*, *G. thermoleovorans* oder auch *G. zalihae* gezählt [Guncheva und Zhiryakova, 2011]. Sie weisen ein Molekulargewicht zwischen 40 und 45 kDa auf, sind im neutralen bis moderat alkalischen pH-Bereich aktiv (pH 8 – 10) und bei Temperaturen von 60 – 70 °C stabil [Schmidt-Dannert *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2000; Kambourova *et al.*, 2003; Leow *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2010]. Lipasen der Subfamilie I.5 besitzen neben einer Calcium-Bindestelle eine Zink-Bindedomäne, die über die Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zur Stabilität des Enzyms beitragen [Jeong *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005]. Der Zink-Bindedomäne wird zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Öffnung der Deckeldomäne während der Grenzflächenaktivierung der Lipasen zugeschrieben. Ein Vergleich zwischen offener und geschlossener Konformation ist in Abbildung 1-4 am Beispiel der Lipase T1 aus *G. zalihae* dargestellt. Die Deckelregion (50 – 70 AS) in *Geobacillus*-Lipasen besteht in der Regel aus zwei α -Helices, die über einen flexiblen Loop miteinander verbunden sind [Jeong *et al.*, 2002; Carrasco-Lopez *et al.*, 2009]. Die Deckelöffnung kann sowohl durch Interaktion mit hydrophoben Grenzflächen als auch temperaturinduziert erfolgen [Carrasco-Lopez *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2012].

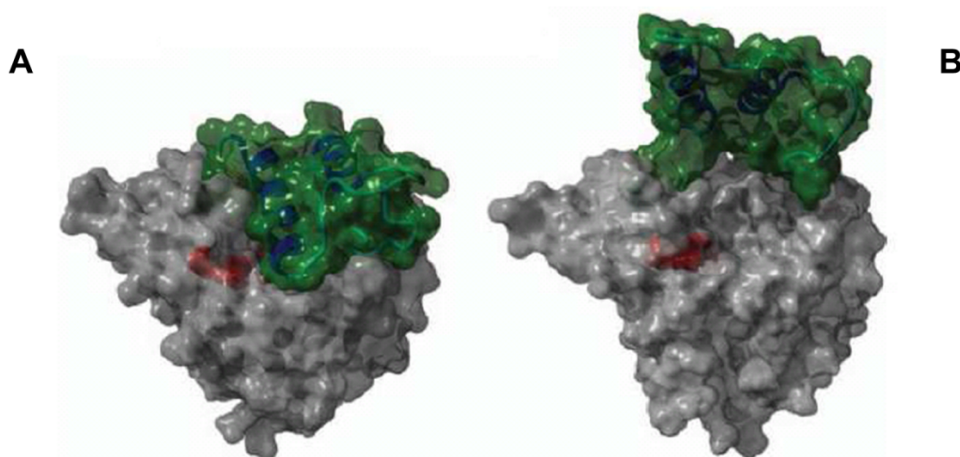


Abbildung 1-4: Oberflächendarstellung der geschlossenen (A) und offenen (B) Konformation der Lipase LipT1. Darstellung des aktiven Zentrums (S113, D317, H358) in rot, Deckeldomäne in grün mit Helices α_6 und α_7 in blau. Beide Konformationen basieren auf Molekulardynamik-Simulationen, entnommen aus [Rahman *et al.*, 2012].

Die Herstellung von *Bacillus*-Lipasen kann über verschiedene Wege realisiert werden. Zur homologen Produktion wurden u.a. die WT-Stämme *B. megaterium* CCOP-P2637 [Lima *et al.*, 2004], *G. thermoleovorans* CCR11 [Castro-Ochoa *et al.*, 2005] oder auch *Bacillus* Sp. Strain 398 [Kim *et al.*, 1994] eingesetzt. Neben der oft bevorzugten Fermentation im Submers-Verfahren konnte beispielsweise für eine Lipase aus *B. coagulans* ein Produktionsverfahren mittels Solid-State-Fermentation etabliert werden [Alkan *et al.*, 2007].

Als Kohlenstoffquellen dienten entweder Lipide in Form von Pflanzenölen (u.a. Oliven-, Senf- und Sojaöl) bzw. freie Fettsäuren oder eine Kombination aus Lipiden und Kohlenhydraten wie Stärke, Maltose und Glucose [Guncheva und Zhiryakova, 2011]. Die eingesetzten Lipide wirkten als Induktor für die Genexpression der Lipasen. Ein ähnlicher Effekt konnte auch beim Einsatz verschiedener Detergenzien, wie SDS, Tween oder Triton X-100 festgestellt werden [Castro-Ochoa *et al.*, 2005; Shariff *et al.*, 2007; Takaç und Marul, 2008].

Parallel zur homologen Produktion konnten zahlreiche *Bacillus*-Lipasen bereits rekombinant hergestellt werden. Aufgrund der einfachen Kultivierbarkeit, des schnellen Wachstums und der genetischen Zugänglichkeit wurde zu diesem Zweck sehr häufig *Escherichia coli* genutzt [Guncheva und Zhiryakova, 2011; Rosano und Ceccarelli, 2014]. Verglichen mit der Produktion im jeweiligen Wildtypstamm wurden mit diesem Ansatz in vielen Fällen deutlich höhere Aktivitätsausbeuten erreicht. Abdel-Fattah *et al.* klonierten ein Lipase-Gen aus *G. thermoleovorans* Toshki unter die Kontrolle des T7-Promoters und erhielten eine 4,5-fach erhöhte Lipase-Aktivität [Abdel-Fattah und Gaballa, 2008]. Die Lipase aus *B. licheniformis* RSP-09 konnte mit C-terminalen His₆-tag ebenfalls in *E. coli* produziert werden. Im Vergleich zum WT-Stamm wurde eine 36-fach höhere Zielproteinmenge erhalten [Madan und Mishra, 2009]. Das Gen für Lipase T1 aus *Geobacillus* sp. T1 wurde mit dem Gen einer Glutathion-S-Transferase kombiniert und konnte erfolgreich exprimiert werden [Leow *et al.*, 2007]. Das Expressionslevel verbesserte sich gegenüber der Kultivierung des Wildtypstammes 280-fach.

Neben *E. coli* wurde ebenfalls die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* (Neuklassifizierung: *Komagataella phaffii*) zur Produktion von *Bacillus*-Lipasen genutzt. Die Vorteile des Stammes bestehen u.a. darin, dass hohe Zelldichten erreicht werden können und eine effiziente Sekretion des Zielproteins möglich ist [Lin-Cereghino *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2014]. So konnten bspw. die Lipasen aus *Bacillus* sp. L2 und *G. thermocatenulatus* unter Verwendung des methanolinduzierbaren AOX1-Promoters produziert und ins Medium sekretiert werden [Quyen *et al.*, 2003; Sabri *et al.*, 2009]. Weitere zur rekombinanten Lipase-Herstellung genutzte Produktionsstämme sind u.a. *B. subtilis* [Kim *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2006] und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [Ahn *et al.*, 2003; Mormeneo *et al.*, 2008].

1.1.3 Anwendungsmöglichkeiten

Lipasen nehmen aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften eine Schlüsselposition unter den industriell genutzten Enzymen ein. Dabei kann das Einsatzspektrum grundsätzlich in zwei unterschiedliche Bereiche eingeteilt werden [Buthe, 2006]: Lipasen werden entweder gezielt einem Produkt zugesetzt, z.B. als Bestandteil von Waschmitteln, verdauungsfördernden Präparaten oder kosmetischen Produkten oder sie werden als Biokatalysator zu Herstellung von Fein- und Bulkchemikalien genutzt.

In der Wasch- und Reinigungsmittelindustrie werden bevorzugt Lipasen mit breitem Substratspektrum eingesetzt, um verschiedenste Fett- und Ölverschmutzungen beseitigen zu können [Jaeger und Reetz, 1998; Hasan *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2013]. Zur Entfernung von Verschmutzungen sind häufig harsche Bedingungen notwendig, die außerhalb des physiologischen Bereichs liegen (pH 10 - 11 und 30 - 60 °C). Hier erweisen sich die hohe Temperatur- und pH-Stabilität vieler Lipasen sowie deren Toleranz gegenüber Tensiden als vorteilhaft.

Lipasen spielen ebenfalls in der Lebensmittelindustrie eine wichtige Rolle. Unter Einsatz von Lipasen mit enger Substratspezifität und hoher Regioselektivität können sogenannte strukturierte Lipide hergestellt werden [Iwasaki und Yamane, 2000; Xu, 2000]. Dabei werden gezielt Fettsäuren innerhalb der Lipide ausgetauscht, um Produkte mit einer gewünschten Fettsäurezusammensetzung zu erhalten und so die Produkteigenschaften zu kontrollieren. Ein Beispiel zur lipasevermittelten Modifikation von Lipiden stellt die Produktion synthetischer Kakaobutter dar [Bloomer *et al.*, 1990; Mohamed, 2012]. Durch Substitution von Palmitin- durch Stearinsäure im Triacylglycerid konnte Einfluss auf das Schmelzverhalten des Produkts genommen werden. Als weitere Beispiele können Umesterungsreaktionen von Milch- und Magarinefetten genannt werden, um möglichst positionsspezifisch ungesättigte Fettsäuren in Lipide einzubauen [Schmid *et al.*, 1999; Sørensen *et al.*, 2010]. Besonderes Interesse besteht, aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften, in der gezielten Anreicherung langkettiger, ungesättigter ω -3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) [Chen *et al.*, 2012]. Ein weiteres Einsatzgebiet von Lipasen ist die Herstellung von Molkereiprodukten. Durch die lipasekatalysierte Spaltung von Milchlipiden kann auf die Textur und die Aromabildung bei der Reifung von Käse Einfluss genommen werden [Aravindan *et al.*, 2007; Jooyandeh *et al.*, 2009]. Ebenso können mit Hilfe von Lipasen andere für die Lebensmittelindustrie interessante Aromastoffe, wie bspw. Ester aus Essig-, Butter-, oder Capronsäure und Ethanol, synthetisiert werden [Larios *et al.*, 2004; Mahapatra *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2012].

Ein wichtiges Anwendungsgebiet von Lipasen ist die Produktion von Feinchemikalien. In diesem Bereich kommen die Vorteile der Spezifität und Selektivität besonders zum Tragen. Lipasen finden Verwendung bei der Herstellung verschiedener Synthesebausteine wie enantiomerenreiner Alkohole, chiraler Amine und Amide [Jaeger und Reetz, 1998; Ghanem, 2007]. Weitere Einsatzgebiete stellen die Synthese von Polyestern durch Kondensations- oder Ringöffnungspolymerisation und die regioselektive Acylierung von Zuckern zur Produktion von Biotensiden dar [Kobayashi, 2010; Gumel *et al.*, 2011].

Lipasekatalysierte Reaktionen kommen ebenfalls zur Herstellung von pharmazeutischen, zumeist chiralen Wirkstoffen zum Einsatz. Dies erfolgt entweder über die Reaktion mit prochiralen Substraten oder eine kinetische Racematspaltung [Gotor-Fernández *et al.*, 2006; Patel, 2008]. Als Beispiele können die Produktion der Entzündungshemmer Naproxen [Sakaki *et al.*, 2001] und Ibuprofen [Carvalho *et al.*, 2006] sowie des Blutdrucksenkers Diltiazem [Zhao *et al.*, 2010] genannt werden.

Für die Kosmetikindustrie ist die Anwendung von Lipasen vor allem für die Synthese von Mono- und Diacylglyceriden, Zucker-Estern und Emollient-Estern interessant [Pandey *et al.*, 1999; Hills, 2003]. Die Substanzen dienen in kosmetischen Produkten u.a. als Emulgatoren und Aromastoffe oder als Bestandteile, die die Haut vor dem Austrocknen schützen sollen.

Des Weiteren werden Lipasen zur Produktentfettung in der Leder- [Choudhary *et al.*, 2004], Papier- und Zellstoffindustrie angewendet [Gutiérrez *et al.*, 2009] sowie zur Herstellung biologisch abbaubarer Kühl- und Schmiermittel eingesetzt [Brenneis *et al.*, 2004].

Zusätzlich ist die lipasekatalysierte Produktion langkettiger Fettsäuremethylester aus Pflanzenölen Gegenstand intensiver Forschung [Ribeiro *et al.*, 2011; Pourzolfaghar *et al.*, 2016]. Die enzymbasierte Methode zur Gewinnung von Biodiesel erweist sich aus ökologischer Sicht vorteilhaft gegenüber der konventionellen, basenkatalysierten Herstellung, ist aber aus ökonomischer Sicht noch nicht wettbewerbsfähig [Tan *et al.*, 2010; Daiha *et al.*, 2015; Norjannah *et al.*, 2016].

1.2 Immobilisierung

Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Effizienz und Reduktion der Kosten eines enzymkatalysierten Produktionsverfahrens besteht im mehrmaligen Einsatz des Biokatalysators. Dies kann über eine Immobilisierung des Enzyms erreicht werden [Cao, 2006; Homaei *et al.*, 2013]. Neben der einfacheren Abtrennung des Biokatalysators aus dem Reaktionsmedium können durch die Immobilisierung die thermische und chemische Stabilität des Enzyms erhöht und mitunter dessen Aktivität und Selektivität positiv beeinflusst werden [Adlercreutz, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013]. Weiterhin ermöglicht die Immobilisierung den Einsatz von Enzymen in kontinuierlichen Prozessen.

Immobilisierungsverfahren können grundsätzlich in zwei Kategorien eingeteilt werden (Abbildung 1-5). Zum einen kann die Rückhaltung des Enzyms im Reaktionssystem über einen Einschluss in polymere Gelstrukturen, Kapseln oder Membranen erfolgen. Hierfür bietet sich u.a. die Verwendung von Alginat, Chitosan, Siliconen oder auch Polyethylenimin an [Sheldon, 2007; Brady und Jordaan, 2009; Rother *et al.*, 2009]. Zum anderen kann die Immobilisierung über Kopplungsverfahren realisiert werden, bei denen das Enzym entweder an eine feste Matrix gebunden wird oder die Fixierung durch Quervernetzung der Enzymmoleküle in aggregierter (CLEA) bzw. kristalliner Form (CLEC) stattfindet [Cao, 2006; Cantone *et al.*, 2013; Sheldon und Pelt, 2013].

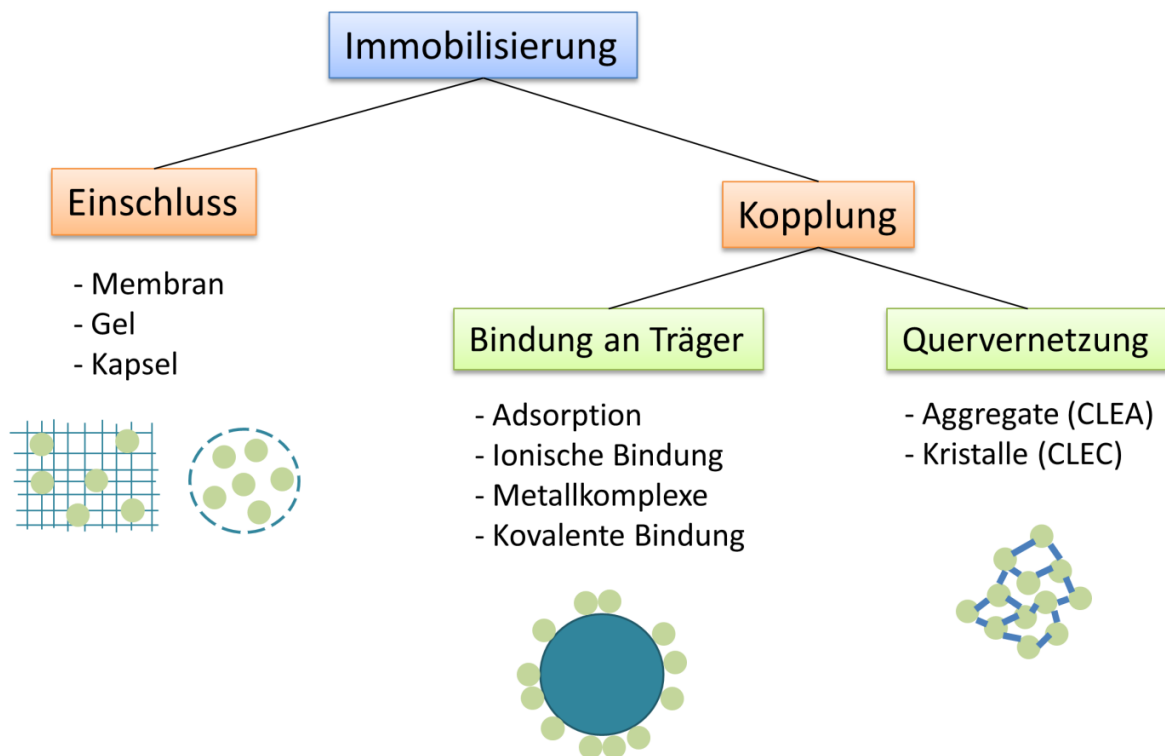


Abbildung 1-5: Einteilung verschiedener Immobilisierungsstrategien. CLEA: „Cross-linked Enzyme Aggregates“; CLEC: „Cross-linked Enzyme Crystals“. Modifiziert nach [Singh *et al.*, 2013].

Der überwiegende Teil der literaturbeschriebenen Immobilisierungsverfahren beruht auf der trägerbasierten Enzymkopplung. Zur Immobilisierung werden neben hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen auch die Ausbildung von Metallkomplexen und kovalenten

Bindungen genutzt. Letztere besitzt gegenüber den anderen genannten Methoden den Vorteil, dass ein unerwünschtes Auswaschen des Enzyms im Prozess und somit ein Verlust an Biokatalysator vermieden wird. Gleichzeitig wird die Verunreinigung des Produktes mit Protein verhindert. Zusätzlich kann durch eine kovalente Kopplung eine Stabilisierung der Enzymstruktur erreicht werden [Mansfeld *et al.*, 1999]. Über die Ausbildung von Mehrfachverknüpfungen zwischen Träger und Enzym kann die Flexibilität labiler Proteinregionen eingeschränkt und somit einer Denaturierung unter Prozessbedingungen entgegenwirkt werden [Mateo *et al.*, 2007b].

Neben den genannten Vorteilen können mit der Immobilisierung auch verschiedene Nachteile verbunden sein [DiCosimo *et al.*, 2013]. So können u.a. infolge der Kopplung Aktivitätsverluste durch Veränderungen der kinetischen Eigenschaften bzw. eine Inaktivierung des Enzyms auftreten. Weiterhin können Stofftransportlimitierungen die Aktivität negativ beeinflussen. Im Gegensatz zur Verwendung des freien Enzyms fallen bei der Immobilisierung zusätzliche Kosten für Trägermaterial, Kopplungsreagenzien und den Kopplungsprozess an.

Zur Kopplung sind prinzipiell verschiedene auf der Proteinoberfläche vorhandene Aminosäureseitenketten geeignet [Wong, 1993; Cao, 2006]. Dazu zählen vor allem die primären Aminogruppen in Lysinresten und im N-Terminus. Weitere, oberflächenexponierte Seitenketten, die für eine Kopplung in Frage kommen, sind z.B. Carboxylgruppen (Asp, Glu, C-Terminus) und Thiolgruppen (Cys), vereinzelt auch Hydroxylgruppen (Ser, Tyr). Bei vorhandener Glykosylierung im Protein können diese Strukturen ebenfalls für eine kovalente Kopplung in Betracht gezogen werden. Außerdem besteht die Möglichkeit unter Anwendung chemischer und enzymatischer Derivatisierungsverfahren neue Funktionalitäten auf der Proteinoberfläche zu schaffen [Wong, 1993; Fernandez-Lorente *et al.*, 2008b; Oteng-Pabi *et al.*, 2014]. Im Folgenden wird auf verschiedene Immobilisierungsmethoden zur kovalenten Kopplung von Enzymen eingegangen.

1.2.1 Kopplung über Aminogruppen

Aufgrund ihres abundanten Auftretens in Proteinen spielen primäre Aminogruppen, vor allem in Form von Lysin-Seitenketten, eine besondere Rolle bei der kovalenten Immobilisierung [Hermanson, 2010]. Die Kopplung von Enzymen über proteinogene Aminogruppen kann prinzipiell über verschiedene Reaktionen erfolgen. Ein sehr häufig genutzter Ansatz besteht in der Verwendung von Aldehyden. Hierbei nimmt Glutaraldehyd (GA) als homobifunktionelles Kopplungsreagenz eine besondere Stellung ein [Hansen und Mikkelsen, 1991; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1995a; López-Gallego *et al.*, 2005a; Gómez *et al.*, 2006; Yilmaz *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2014]. Beim Einsatz von GA ist allerdings zu beachten, dass es in wässriger Lösung nicht ausschließlich als monomeres Dialdehyd (I) auftritt, sondern in Abhängigkeit des vorliegenden pH-Wertes zur Oligomerisierung in der Lage ist [Migneault *et al.*, 2004]. In Abbildung 1-6 ist eine Übersicht relevanter GA-Strukturen dargestellt. Im sauren pH-Bereich können vermehrt cyclische Hemiacetale in monomerer (II) und oligomerer Form (III) vorliegen, wohingegen bei basischem pH-Wert eher oligomere, α,β - ungesättigte Aldehyde (IV) gebildet werden.

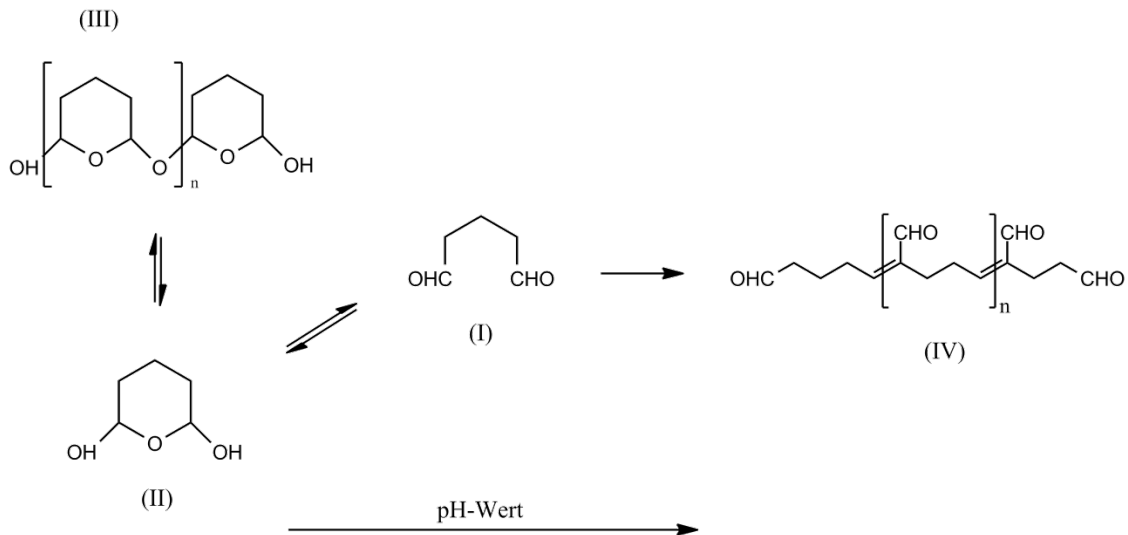


Abbildung 1-6: Auswahl reaktiver GA-Strukturen in wässriger Lösung. Nach [Migneault *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2014].

Aufgrund der hohen Reaktivität von GA und der zahlreichen möglichen Spezies ist bis heute der tatsächliche Reaktionsmechanismus bei der Immobilisierung bzw. Quervernetzung von Proteinen nicht vollständig aufgeklärt [Barbosa *et al.*, 2014]. Es wird davon ausgegangen, dass je nach pH-Wert im Medium die verschiedenen GA-Spezies unterschiedliche Reaktionen mit den Aminogruppen des Proteins eingehen (Abbildung 1-7). Unter sauren und neutralen Bedingungen reagiert GA mit Aminogruppen unter Ausbildung Schiff'scher Basen bzw. als Hemiacetal unter Bildung sekundärer Amine (Abbildung 1-7; 1,2,3). Der Einsatz eines Reduktionsmittels (z.B. NaBH_3CN) kann durch Umwandlung der instabilen Imine in sekundäre Amine eine stabilisierende Wirkung auf GA-Protein-Konjugate haben [Fernandez-Lafuente *et al.*, 1995a], zeigte jedoch nicht immer einen eindeutigen Effekt [Hansen und Mikkelsen, 1991; Walt und Agayn, 1994]. Im basischen pH-Bereich wird neben der Entstehung von Schiff'schen Basen von einer Michael-Addition an der C-C-Doppelbindung der α,β - ungesättigten Aldehydstrukturen ausgegangen (Abbildung 1-7; 4a,b) [Richards und Knowles, 1968; Barbosa *et al.*, 2014].

Beim Einsatz von GA zur Enzymimmobilisierung sind grundsätzlich zwei verschiedene Vorgehensweisen möglich. Das Zielprotein kann zunächst auf einen aminogruppenhaltigen Träger adsorbiert und durch anschließende Zugabe von GA kovalent fixiert werden [López-Gallego *et al.*, 2005a; Fernández-Lorente *et al.*, 2006]. Alternativ besteht die Möglichkeit die Aminogruppen des Trägermaterials zuerst mit GA zu aktivieren und im zweiten Schritt durch Zugabe des Enzyms eine Kopplung zu realisieren [Betancor *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2006]. Je nach gewählter Vorgehensweise können unterschiedliche Aktivitäten, Stabilitäten und auch Selektivitäten bei der Lipase-Immobilisierung erzielt werden [Barbosa *et al.*, 2012]. Zusätzlich kann durch die Ionenstärke im Kopplungspuffer und durch den Zusatz von Detergenzien wie Triton X-100 das Immobilisierungsergebnis wesentlich beeinflusst werden.

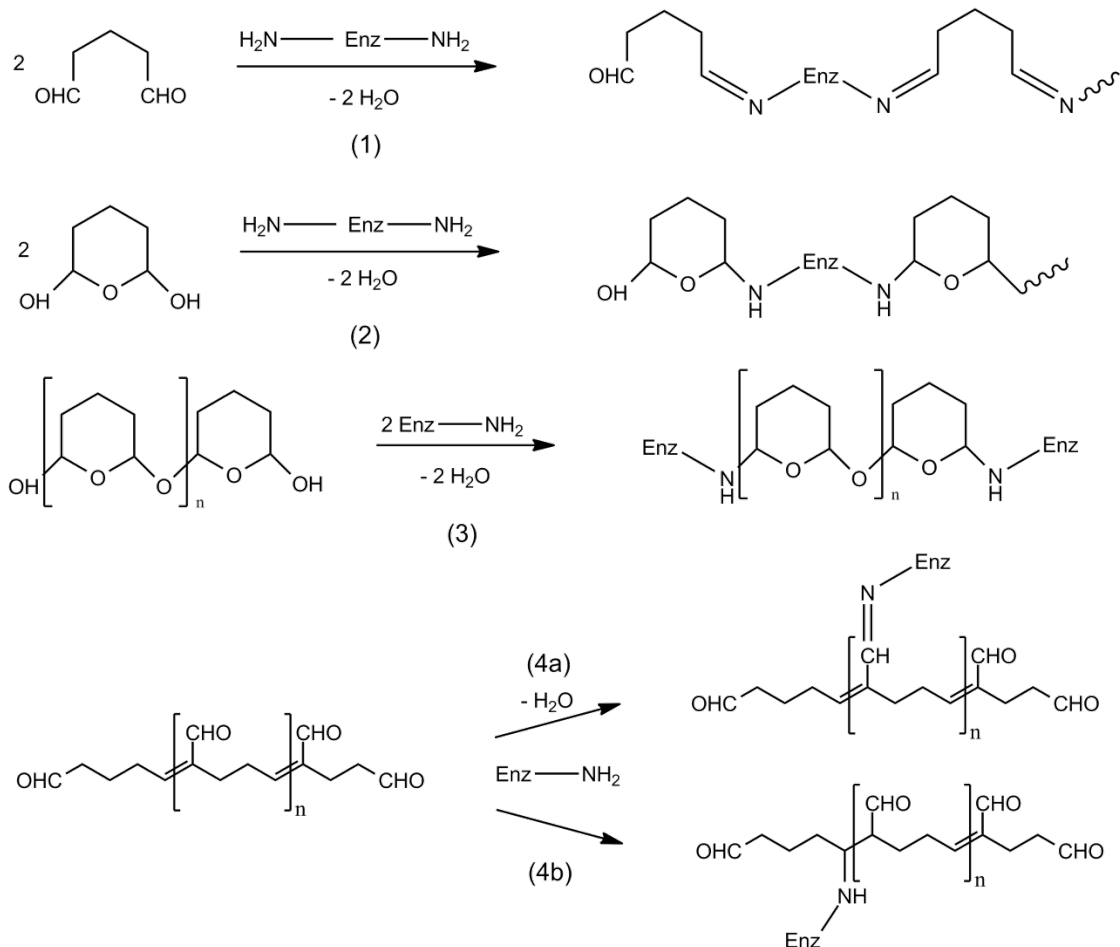


Abbildung 1-7: Reaktionen zwischen GA und proteinogenen Aminogruppen. Nach [Migneault *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2014].

Als Trägermaterialien bei der Immobilisierung mittels GA dienen häufig aminogruppenfunktionalisierte Glaspartikel [Hansen und Mikkelsen, 1991; Yilmaz *et al.*, 2011], die zur einfacheren Abtrennung beispielsweise einen magnetischen Kern besitzen können [Hu *et al.*, 2009; Tudorache *et al.*, 2012]. Weiterhin kommen u.a. quervernetzte Agarose oder auch aktiviertes Chitosan zum Einsatz [Adriano *et al.*, 2005; López-Gallego *et al.*, 2005a]. Neben der Verwendung von GA finden im Bereich der aldehydbasierten Immobilisierung auch verstärkt glyoxalaktivierte Träger Verwendung [Tardioli *et al.*, 2003; López-Gallego *et al.*, 2005b; Cecchini *et al.*, 2007; Godoy *et al.*, 2011b].

Eine Alternative zur Kopplung über Aldehyde besteht in der Nutzung oxiranaktivierter Trägermaterialien. Oxirangruppen können sowohl mit den auf der Proteinoberfläche vorhandenen Aminogruppen als auch mit proteinogenen Thiol- und Hydroxylgruppen reagieren [Wong, 1993; Katchalski-Katzir und Kraemer, 2000]. Somit kann, bei entsprechend hoher Dichte an funktionellen Gruppen auf dem Träger, eine Mehrpunktfixierung zwischen Protein und Trägermaterial erreicht werden [Mateo *et al.*, 2002]. Durch die Fixierung der Proteinstruktur über verschiedene Positionen auf der Proteinoberfläche ist in vielen Fällen eine Stabilisierung des Enzyms möglich. So können beispielsweise höhere Stabilitäten gegenüber organischen Lösungsmitteln oder erhöhten Temperaturen erzielt werden [Mateo *et al.*, 2000a; Boller *et al.*, 2002; Knezevic *et al.*, 2006]. Allerdings kann sich eine zu starke Interaktion zwischen Protein und Trägermaterial bei der Mehrpunktfixierung auch

destabilisierend auf die Proteinstruktur auswirken und die Aktivität negativ beeinflussen [Ryan und Ó'Fágáin, 2007]. Bei der Verwendung oxiranaktivierter Trägermaterialien wird zur Immobilisierung des Zielenzym eine Vorgehensweise in drei Schritten empfohlen [Mateo *et al.*, 2000a; Mateo *et al.*, 2006]. Zunächst erfolgt die Adsorption des Proteins an den Träger bei neutralem pH-Wert (meist pH 7). Durch einen pH-Wechsel in den basischen Bereich (pH 9 – 10) wird im zweiten Schritt der Dissoziationsgrad der proteinogenen Aminogruppen (vorrangig Lysinreste) erhöht, wodurch die Reaktivität auf der Proteinoberfläche steigt und so eine Mehrpunktfixierung erreicht werden kann. Anschließend werden durch Zugabe niedermolekularer Aminokomponenten, wie Glycin oder Ethanolamin, noch auf dem Träger vorhandene, reaktive Oxirangruppen geblockt. Zur Beeinflussung der initialen Adsorption des Proteins wurden verschiedene heterofunktionale Trägermaterialien entwickelt, die neben Oxirangruppen weitere funktionale Reste wie Thiolgruppen, Aminogruppen oder Chelatkomplexe aufweisen [Palomo *et al.*, 2003b; Mateo *et al.*, 2007a]. Die zusätzlichen Funktionalitäten interagieren mit entsprechenden Bereichen auf der Proteinoberfläche über Ausbildung kovalenter Bindungen (Disulfidbrücken), ionischer Wechselwirkungen oder Chelatbildung, wodurch die Ausrichtung des Proteins auf dem Träger kontrolliert werden soll. In diesem Zusammenhang konnten, in Abhängigkeit der vorhandenen funktionalen Gruppen und der genutzten Adsorptionsbedingungen, verschiedene Parameter wie Enzymaktivität, Stabilität oder auch Enantioselektivität positiv beeinflusst werden [Grazu *et al.*, 2003; Palomo *et al.*, 2003b; López-Gallego *et al.*, 2004].

Weitere Möglichkeiten zur aminogruppenbasierten Kopplung von Proteinen bestehen u.a. in der Nutzung *N*-hydroxysuccinimidaktivierter Trägermaterialien, der Verwendung von Carbodiimiden zur Kopplung an carboxylhaltige Träger oder dem Einsatz verschiedener Kopplungsreagenzien wie Iso(thio)cyanate oder Imidoester [Wong, 1993; Redeker *et al.*, 2013].

1.2.2 Kopplung über Thiolgruppen

Thiolgruppen, als funktionelle Seitenketten in Cysteinen, kommen in Proteinen im Gegensatz zu Aminogruppen vergleichsweise selten vor, zeichnen sich aber durch eine hohe Reaktivität unter milden Reaktionsbedingungen aus [Wong, 1993]. Diese Reaktivität erlaubt die Anwendung verschiedener Kopplungsreaktionen zur Enzymimmobilisierung unter der Voraussetzung, dass die vorhandenen Thiolgruppen auf der Proteinoberfläche zugänglich und nicht an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind.

Eine Möglichkeit zur Protein-Kopplung über Thiolgruppen besteht in der Nutzung von maleinimidaktivierter Trägermaterialien. Thiolgruppen reagieren mit der Doppelbindung des Maleinimidmoleküls unter Bildung einer stabilen Thioetherbindung, die unter physiologischen Bedingungen nicht gespalten werden kann [Wong, 1993; Hermanson, 2010]. Diese Alkylierungsreaktion ist im pH-Bereich 6,5 - 7,5 sehr spezifisch. Bei höheren pH-Werten können jedoch auch Kreuzreaktionen mit vorhandenen Aminogruppen ablaufen. Die Reaktion zwischen Thiolgruppen und Maleinimidderivaten wird neben der Enzymimmobilisierung [Blank *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2010; Ménard *et al.*, 2012] häufig auch zur gezielten Markierung des Zielproteins mit entsprechend funktionalisierten Farbstoffen genutzt [Riederer *et al.*, 2008; Filice *et al.*, 2011b].

Thiole können unter oxidativen Bedingungen Disulfidbrücken ausbilden, was eine weitere Möglichkeit zur kovalenten und reversiblen Immobilisierung des Zielproteins darstellt [Mansfeld *et al.*, 1999; Rusmini *et al.*, 2007; Redeker *et al.*, 2013]. Als Träger hierfür kommen disulfidaktivierte Materialien zum Einsatz. Die Thiolgruppen des Proteins reagieren mit den Disulfiden des Trägers (z.B. Pyridyldisulfid), wobei sog. gemischte Disulfide entstehen. Diese Reaktion ist hoch selektiv für die vorhandenen Cysteinreste im Protein. Die Reversibilität der Bindung erlaubt durch Zugabe eines Reduktionsmittels wie Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol (β -ME) das Protein vom Träger zu eluieren, wodurch ein Recycling des Trägermaterials realisiert werden kann.

Alternative Methoden zur Kopplung von Proteinen über Thiolgruppen beinhalten die Nutzung vinylsulfonaktivierter Trägermaterialien unter Ausbildung stabiler Thioetherbindungen [Hermanson, 2010; Redeker *et al.*, 2013] oder die Chemisorption thiohaltiger Proteine an Goldoberflächen [Rao *et al.*, 1998; Nakanishi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011].

1.2.3 Zielgerichtete Immobilisierung

Der überwiegende Teil der literaturbeschriebenen Verfahren zur Immobilisierung beruht auf einer ungerichteten Kopplung zwischen Enzym und Träger. In diesen Fällen kann die räumliche Ausrichtung des Enzyms auf dem Träger nicht aktiv gesteuert werden. Die Orientierung wird u.a. von den Eigenschaften des Trägermaterials, der Lage der reaktiven Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche und den vorliegenden Kopplungsbedingungen beeinflusst. Es wird zwar davon ausgegangen, dass eine Immobilisierung in der Regel nicht vollkommen zufällig abläuft [Hernandez und Fernandez-Lafuente, 2011], aufgrund der verschiedenen Einflüsse kann jedoch eine Verteilung verschieden orientierter Enzymmoleküle auf der Trägeroberfläche nicht ausgeschlossen werden (Abbildung 1-8).

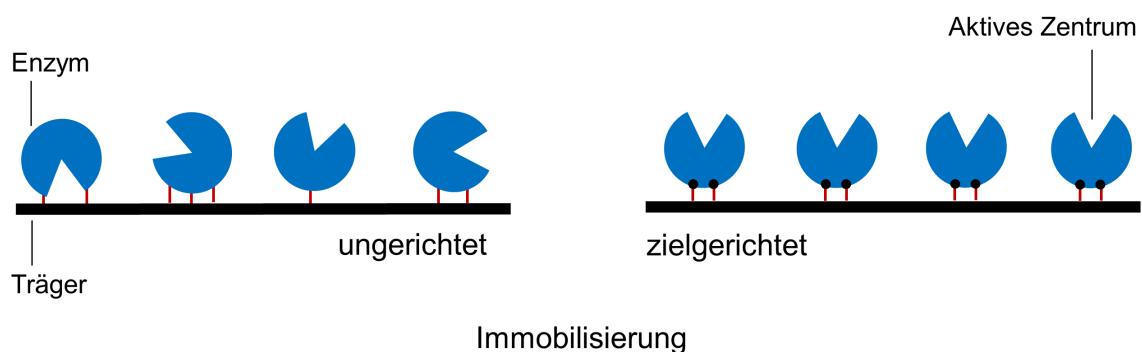


Abbildung 1-8: Schematischer Vergleich verschiedener Enzymorientierungen bei der ungerichteten und zielgerichteten Immobilisierung.

Ungünstige Orientierungen, bei denen die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums beeinflusst wird, können zu einem Aktivitätsverlust oder zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms führen [Rao *et al.*, 1998; Garcia-Galan *et al.*, 2011].

Diesem Problem kann mit einer zielgerichteten Immobilisierung entgegengewirkt werden [Wong *et al.*, 2009; Hernandez und Fernandez-Lafuente, 2011; Singh *et al.*, 2013]. Dabei

wird über verschiedene, rationale Ansätze versucht, die Orientierung des Enzyms zu steuern, um die Heterogenität auf dem Träger zu verringern und dadurch mögliche Aktivitätsverluste zu vermeiden. Zusätzlich kann in bestimmten Fällen über eine zielgerichtete Kopplung auch die Stabilität des immobilisierten Enzyms erhöht werden [Mansfeld *et al.*, 1999; Ryan und Ó'Fágáin, 2007].

Bei der zielgerichteten Immobilisierung erfolgt die Kopplung über zuvor festgelegte Punkte auf der Proteinoberfläche. Hierbei ist entscheidend, dass keine katalytisch wirksamen Bereiche des Proteins durch den Träger blockiert oder durch die Kopplungsreaktion irreversibel verändert werden.

Zur Realisierung einer zielgerichteten Immobilisierung ist in der Regel eine Modifikation der Proteinstruktur notwendig. Dies soll insbesondere die Reaktivität der definierten Kopplungspunkte erhöhen. Modifikationen sind zum einen auf Proteinebene über chemische Modifikationen und zum anderen über Veränderungen der genetischen Information möglich [Cowan und Fernandez-Lafuente, 2011]. Die rein chemische Modifikation hat den Vorteil, dass das Enzym bereits korrekt gefaltet und prozessiert vorliegt. Weiterhin ist dieser Ansatz schneller durchführbar als eine Modifikation des entsprechenden Gens. Nachteile bestehen zum einen darin, dass sich je nach vorliegender Aminosäureverteilung auf der Proteinoberfläche eine zielgerichtete Reaktion unter Umständen schwierig gestalten kann. Zum anderen muss eine chemische Modifikation, im Gegensatz zu Veränderungen auf Genebene, jedes mal vor der Immobilisierung erfolgen, was den Gesamtaufwand des Prozesses erhöhen kann.

Viele Methoden zur selektiven, chemischen Modifikation von Proteinen nutzen u.a. Thiolgruppen oder N-terminale Aminogruppen, um zusätzliche Funktionalitäten im Protein für eine gezielte Kopplung zu erzeugen [Chalker *et al.*, 2009; Cowan und Fernandez-Lafuente, 2011; Rueda *et al.*, 2016]. Bei vorhandenen Glykosylierungsstrukturen im Protein können diese ebenso für eine Funktionalisierung, z.B. mit Thiolgruppen, herangezogen werden [Suarez *et al.*, 2007]. Im Fall von Lipasen kann beispielsweise eine vorherige Festphasenaminierung das Immobilisierungsergebnis positiv beeinflussen [Fernandez-Lorente *et al.*, 2008b]. So wurde eine Lipase aus *Bacillus thermocatenuatus* (BTL2) an ein hydrophobes Trägermaterial (Butyl-Agarose) adsorbiert. Aufgrund der Grenzflächenaktivierung war das aktive Zentrum der Lipase zur Trägeroberfläche gerichtet. Anschließend wurden die zugänglichen Carboxylgruppen mittels 1-Ethyl-3-(Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) und 1,2-Ethylendiamin in Aminogruppen überführt. Nach Desorption unter Einsatz von Triton X-100 konnte die modifizierte Lipase mit der vom aktiven Zentrum abgewandten, aminierten Seite erfolgreich an Glyoxyl-Agarose gekoppelt werden.

Die weitaus verbreitetere Variante zur Veränderung der Reaktivität der Proteinoberfläche stellt die Nutzung genetischer Modifikationen dar. Hier gehört das Einfügen von Punktmutationen innerhalb der Gensequenz des Zielproteins zu einer häufig gewählten Methode, um Aminosäureaustausche vorzunehmen.

Zur Immobilisierung einer Penicillin G Acylase (PGA) aus *E. coli* wurden drei Mutationen mit dem Ziel eingefügt die Anzahl reaktiver Lysinreste in einem definierten Bereich der Proteinoberfläche zu erhöhen [Abian *et al.*, 2004]. Nach Kopplung der Mutante auf Glyoxyl-Agarose verbesserte sich die Stabilität des Enzyms gegenüber erhöhten Temperaturen (60 °C) und organischen Lösungsmitteln (Dimethylformamid) auf das 11-fache. Cecchini *et al.* konstruierten verschiedene Varianten der PGA mit bis zu fünf zusätzlichen Lysinresten auf

der dem aktiven Zentrum entgegengesetzten Seite [Cecchini *et al.*, 2007]. Diese Mutanten konnten ebenfalls erfolgreich auf Glyoxyl-Agarose gekoppelt werden, wodurch die katalytischen Eigenschaften verbessert werden konnten.

Ryan *et al.* nutzten einen ähnlichen Ansatz für die Immobilisierung einer Meerrettich-Peroxidase [Ryan und Ó'Fágáin, 2007]. Es wurden mehrere Varianten des Enzyms mit bis zu drei Arg-Lys-Substitutionen erstellt, die auf cyanogenbromidaktivierte Agarose und aldehydfunktionalisierte Polyethersulfonmembranen gebunden werden konnten.

Neben dem Einbau zusätzlicher Aminogruppen in Form von Lysinresten werden auch häufig Cysteine als Ziel von Aminosäureaustauschen herangezogen. So konnte Subtilisin mit einem zusätzlichen Cysteinrest erfolgreich an Thiol-Sepharose und maleinimidaktivierte Silica-Partikel gekoppelt werden [Huang *et al.*, 1997]. Diese Protease-Variante zeigte eine höhere katalytische Effizienz als Subtilisin, das mittels ungerichteten Verfahren immobilisiert wurde.

Blank *et al.* konnten zeigen, dass zwei Varianten der Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) mit jeweils einer Cystein-Substitution die gleichen kinetischen Konstanten wie das Wildtyp-enzym aufwiesen und eine zielgerichtete Kopplung an maleinimidaktivierte Oberflächen möglich war [Blank *et al.*, 2006].

Zur Erhöhung der Thermostabilität wurden verschiedene Cystein-Einzelmutanten einer Protease aus *Bacillus stearothermophilus* erzeugt [Mansfeld *et al.*, 1999]. Hinsichtlich der Mutationspositionen wurden Bereiche auf der Proteinoberfläche gewählt, die bei der thermischen Entfaltung des Proteins eine Rolle spielen. Nach Immobilisierung an Thiol-Sepharose wurden, je nach Variante, deutliche Unterschiede in den Halbwertszeiten bei 75 °C erhalten. Durch Kombination verschiedener Mutationspositionen konnte, verglichen mit dem freien Wildtyp-Enzym, eine 33-fach höhere Stabilität erreicht werden.

Grazu *et al.* kombinierten die Durchführung genetischer Modifikationen am Zielprotein mit dem Einsatz eines heterofunktionalen Trägermaterials [Grazu *et al.*, 2010]. Dazu wurde in einer PGA aus *E. coli* an sechs Positionen die jeweils vorliegende Aminosäure durch ein Cystein ausgetauscht. Zur Festlegung des Kopplungspunktes wurden Bereiche auf der Proteinoberfläche ausgewählt, die besonders reich an Lysinresten waren. Die Kopplung selbst erfolgte an einen Träger, der neben Thiolgruppen auch Oxirangruppen aufwies. Im initialen Schritt wurde das Enzym gerichtet über die Ausbildung einer Disulfidbrücke an das Material gebunden, woraufhin im zweiten Schritt eine Mehrpunktfixierung zwischen den umliegenden Aminogruppen des Proteins und den Oxirangruppen des Trägers ablief. Als Ergebnis wurden Immobilisate mit erhöhter Stabilität und verbesserter Enantioselektivität erhalten. Eine ähnliche Vorgehensweise wurde zur Immobilisierung der Lipase BTL2 gewählt, wobei als Träger Glyoxyl-Agarose zum Einsatz kam, welche ebenso mit zusätzlichen Thiolgruppen funktionalisiert wurde [Godoy *et al.*, 2011b].

Zusätzlich zu natürlich vorkommenden, reaktiven Aminosäuren können über verschiedene gentechnische Methoden auch neue Funktionalitäten in das Zielprotein integriert werden. Mittels Intein-Technologie besteht beispielsweise die Möglichkeit Proteine am C-Terminus mit reaktiven α -Thioestern auszustatten, was anschließend eine spezifische Kopplung an thiolgruppenhaltige Trägermaterialien unter Ausbildung einer Peptidbindung erlaubt [Perler und Adam, 2000; Camarero *et al.*, 2004]. Eine weitere Alternative stellt der Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren in das Zielprotein während Proteinbiosynthese dar [Lang und Chin, 2014]. Dies kann zum einen durch Zufütterung entsprechender Aminosäuren, die von den tRNA-Synthetasen des Produktionsstammes akzeptiert werden, erfolgen. Zum anderen kann der Einbau über genetisch manipulierte tRNA-Synthetasen mit erweitertem Substratspektrum realisiert werden. Häufig genutzte nicht-kanonische Aminosäuren weisen

u.a. Azido- oder Propargylgruppen auf [Kiick *et al.*, 2002; Link *et al.*, 2004]. Diese können zur Durchführung chemoselektiver Kopplungsreaktionen wie der Staudinger-Ligation oder einer kupferkatalysierten Cycloaddition (*Click* Chemie) genutzt werden [Rusmini *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2009; Redeker *et al.*, 2013].

Neben dem Austausch einzelner Aminosäuren auf der Proteinoberfläche kann eine zielgerichtete Immobilisierung ebenso durch Fusion des Zielproteins mit einem Protein- bzw. Peptid-*tag* erreicht werden [Nakanishi *et al.*, 2008; Hernandez und Fernandez-Lafuente, 2011; Homaei *et al.*, 2013]. Die Kopplung basiert meist auf einer komplementären Affinität zwischen zwei Biomolekülen und führt in der Regel nicht zur Ausbildung einer kovalenten Bindung. Dies ermöglicht in vielen Fällen ebenfalls die Anwendung der Methode zur spezifischen Proteinreinigung. Als *tags* zur Immobilisierung können größere Proteine (>20 kDa) wie die Cellulosebindedomäne (CBD) oder Gluthation-S-Transferase (GST) aber auch kleinere Peptide (< 10 AS) wie STREP- und FLAG-*tag* dienen.

Am weitesten verbreitet ist allerdings der Einsatz eines Polyhistidin-*tags* [Rusmini *et al.*, 2007; Redeker *et al.*, 2013]. Dieser *tag* besteht zumeist aus 6 – 10 aufeinanderfolgenden Histidinresten und kann N- oder C-terminal mit dem Zielprotein fusioniert werden. Zur Immobilisierung geeignete Trägermaterialien werden mit einem Chelator wie z.B. Iminodiessigsäure (IDA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA) aktiviert und mit Ionen eines Übergangsmetalls wie Ni²⁺, Cu²⁺ oder Co²⁺ beladen. Die spezifische Kopplung beruht auf der reversiblen Interaktion zwischen den Metall-Chelatkomplexen und den Imidazolringen der Histidine, wobei zu einem geringen Anteil auch Cystein- und Tryptophanseitenketten beteiligt sein können [Hemdan *et al.*, 1989]. Mittels His-*tag* immobilisierte Lipasen wurden bisher beispielsweise zur selektiven Hydrolyse von Fischöl [Ashjari *et al.*, 2015] und Olivenöl [Woo *et al.*, 2015] oder auch zur Produktion von Fettsäuremethylestern (Biodiesel) aus Altfett eingesetzt [Vahidi *et al.*, 2015]. Aufgrund der Reversibilität der Bindung kann das Zielprotein z.B. durch Zugabe eines kompetitiven Liganden, wie Imidazol, vom Träger eluiert werden. Weitere Möglichkeiten zur Elution bestehen in der Komplexbildung des Metallions (z.B. Zugabe Ethylendiamintetraessigsäure) oder der Absenkung des pH-Wertes (< 6) zur Protonierung der Histidinseitenketten [Schlieben *et al.*, 2004; Rusmini *et al.*, 2007]. Diese Reversibilität bietet den Vorteil, dass das Trägermaterial, im Fall einer Enzyminaktivierung nach Prozesseinsatz, regeneriert und erneut mit aktivem Enzym beladen werden kann.

Es wurden ebenso Immobilisierungs-*tags* entwickelt, die für eine kovalente Bindung des Zielproteins genutzt werden können [Wong *et al.*, 2009]. Neben der Anwendung chemischer Kopplungsreaktionen kann die Immobilisierung in bestimmten Fällen auch enzymatisch erfolgen. Hierfür bietet sich beispielsweise der Einsatz einer mikrobiellen Transglutaminase (MTG) an, mit der die in Tabelle 1-1 aufgeführten Proteine erfolgreich immobilisiert werden konnten. Die mikrobielle Transglutaminase (EC 2.3.2.13) gehört zur Klasse der Transferasen und ist in der Lage Proteine über Glutamin- und Lysinreste unter Ausbildung von ϵ -(γ -Glutamyl)lysin-Isopeptidbindungen miteinander zu vernetzen (Abbildung 1-9). Für die Reaktion ist die Anwesenheit einer γ -Carboxamidgruppe eines protein- oder peptidgebundenen Glutamins (Acyl-Donor) essentiell. Hinsichtlich der Lysinkomponente (Acyl-Akzeptor) werden auch verschiedene andere primäre Amine als Substrat erkannt [Ohtsuka *et al.*, 2000b; Gundersen *et al.*, 2013]. Dies ermöglicht eine zielgerichtete Immobilisierung glutaminhaltiger Proteine auf aminofunktionalisierten Trägermaterialien [Tanaka *et al.*, 2008; Moriyama *et al.*, 2011].

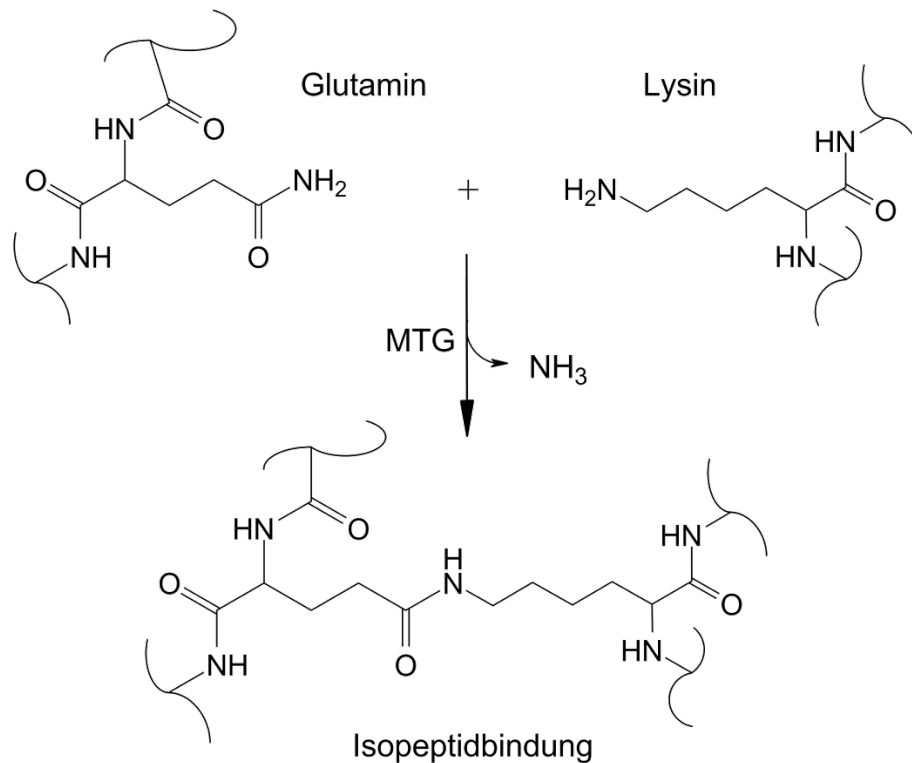


Abbildung 1-9: Transglutaminasekatalysierte Verknüpfungsreaktion von Proteinen über Glutamin- und Lysinseitenketten.

Tabelle 1-1: Zielgerichtete Immobilisierung von Proteinen mittels MTG.

Zielprotein	tag-Sequenz	Trägermaterial	Funktionalisierung	Referenz
Glutathion-S-Transferase	LLQG	Polystyrenoberfläche	Beschichtung mit Casein	[Tanaka <i>et al.</i> , 2007]
<i>Enhanced green fluorescent protein</i> (EGFP)	LLQG	Glasoberfläche	Modifikation mit Diaminen	[Tanaka <i>et al.</i> , 2008]
Alkalische Phosphatase	MLAQGS	Polystyrenoberfläche	Beschichtung mit Casein bzw. BSA	[Kamiya <i>et al.</i> , 2007]
Alkalische Phosphatase	MLAQGS	Magnetische Glaspartikel	Modifikation mit Amino-PEG	[Moriyama <i>et al.</i> , 2011]
Alkalische Phosphatase	MKHKGS	Polyacrylharz	Beschichtung mit Casein über <i>N</i> -Hydroxysuccinimid	[Tominaga <i>et al.</i> , 2004]
Alkalische Phosphatase	MKHKGS	Polystyrenmatrix	Beschichtung mit Casein	[Kamiya <i>et al.</i> , 2005]
Alkalische Phosphatase	MKHKGS	Glasoberfläche	Modifikation mit <i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-L-Gln-Gly	[Sung <i>et al.</i> , 2010]

Zur Durchführung der Kopplungsreaktion müssen vorhandene Glutaminreste jedoch oberflächenexponiert und in flexiblen Bereichen des Proteins vorliegen [Matsumura *et al.*, 1996; Fontana *et al.*, 2008]. Alternativ kann eine Immobilisierung über proteinogene Lysinseitenketten realisiert werden, wenn der Träger entsprechend reaktive Glutaminreste aufweist. Die Funktionalisierung des Trägers kann durch chemische Modifikation der Oberfläche mit definierten Glutamyl-Peptiden erfolgen [Sung *et al.*, 2010] oder durch Beschichtung der Oberfläche mit bekannten MTG-Substratproteinen wie Casein und BSA erreicht werden [Tominaga *et al.*, 2005; Kamiya *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2007].

Die MTG-vermittelte Immobilisierung wurde vorwiegend auf Modellproteine angewendet, deren biologische Aktivität einfach nachweisbar ist. Eine Immobilisierung von Lipasen mittels MTG wurde bisher nicht untersucht. Zur Kopplung kamen überwiegend proteinbeschichtete Oberflächen zum Einsatz, die zwar exponierte K- bzw. Q-Reste für die Kopplungsreaktion zur Verfügung stellen können, allerdings auch verschiedene Nachteile mit sich bringen. Dies betrifft insbesondere adsorptionsbedingte Heterogenitäten der Beschichtung sowie mögliche unerwünschte Protein-Protein-Interaktionen, weshalb prinzipiell Trägermaterialien mit definierter Oberflächenchemie für die Immobilisierung zu bevorzugen sind. Hinsichtlich des *tag*-Designs wurde vorrangig auf Peptidsequenzen bekannter MTG-Substratproteine und entsprechender Variationen zurückgegriffen. Als Beispiele sind das S-Peptid der Ribonuklease A oder die F-Helix des Myoglobins aus Pferdeherz zu nennen [Kamiya *et al.*, 2003b; Takazawa *et al.*, 2004]. Zur Untersuchung der Substratspezifität der MTG und Identifizierung neuer Substrate wurden mehrere Untersuchungen durchgeführt, die auf dem Screening von Peptid-Bibliotheken über verschiedene Techniken wie z.B. *phage display* oder *mRNA display* beruhten [Ohtsuka *et al.*, 2000a; Sugimura *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2013; Malešević *et al.*, 2015]. Eine Anwendung der dabei identifizierten Peptidsequenzen für die zielgerichtete Immobilisierung industriell relevanter Enzyme ist bisher nicht beschrieben.

1.3 Potentielle Lipase-Anwendungen in Bioraffinerieprozessen

Fette und Öle - die natürlichen Substrate der Lipasen - stellen begehrte Rohstoffe für zahlreiche Industriezweige dar [Braun *et al.*, 2006; Meier *et al.*, 2007]. Wichtige Anwendungsgebiete sind vor allem der Nahrungsmittelbereich und die Erzeugung von Biokraftstoffen. Sie bilden außerdem wertvolle Grundstoffe für die chemische Industrie und können u.a. als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Polymeren, Tensiden, Kosmetika, und Schmierstoffen genutzt werden.

Aufgrund ihrer Anwendungsmöglichkeiten sind besonders Fettsäuren als vielseitige Synthesebausteine von hohem Interesse für die Oleochemie [Metzger und Bornscheuer, 2006]. Hierbei spielen insbesondere ungesättigte Fettsäuren eine wichtige Rolle, deren C=C-Doppelbindungen als Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Synthesereaktionen herangezogen werden [Biermann *et al.*, 2011]. Grundsätzlich sind für die Funktionalisierung von Fettsäuren zahlreiche Synthesewege bekannt, wodurch verschiedene Fettsäurederivate wie z.B. Fettalkohole, Fettamine, Fettsäureester und Dicarbonsäuren hergestellt werden können [Metzger, 2009; Salimon *et al.*, 2012]. Neben den Fettsäuren kann auch Glycerin in industriell relevante Synthesebausteine wie 1,3-Propandiol, Polyglycerol sowie verschiedene

Ester- und Oxiranderivate überführt werden oder alternativ als Ausgangsstoff zur Produktion von „grünem“ Wasserstoff mittels Pyrolyse dienen [Pagliaro *et al.*, 2007; Lin, 2013].

Mit der Nutzung von Fetten und Ölen als nachwachsende Rohstoffe und der systematischen Verwertung der einzelnen Rohstoffbestandteile kann dem Konzept einer Bioraffinerie Rechnung getragen werden [Braun *et al.*, 2006; FNR, 2012]. Dabei wird das Ziel verfolgt, nachwachsende Rohstoffe als Alternative zu fossilen Brennstoffen möglichst effizient zu verwenden. Neben Fetten und Ölen kommen auch andere biomassebasierte Rohstoffe wie Holz, Stärkepflanzen oder Pflanzenabfälle für eine Nutzung in Frage. Die verschiedenen Rohstoffquellen sollen nachhaltig zur Erzeugung von Chemikalien, Werkstoffen, Bioenergie und Biokraftstoffen, unter vollständiger Verwertung aller anfallenden Koppelprodukte, eingesetzt werden [Cherubini, 2010; FNR, 2012]. Die Konversion der Rohstoffe kann dabei, abhängig vom Zielprodukt, rein chemisch oder unter Einsatz von Biokatalysatoren erfolgen. Ein enzymatischer Ansatz ist dann besonders geeignet, wenn das Ziel eine möglichst selektive Umsetzung der Substrate ist. Für das Beispiel einer pflanzenölbasierten Bioraffinerie bietet sich insbesondere der Einsatz von Lipasen zur Modifikation von TAG sowie deren Bestandteilen an. Als Beispielreaktion kann die selektive Abspaltung von Fettsäuren, aus Triacylglyceriden genannt werden [Shimada *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 2009]. Ebenso spielen Umesterungsreaktionen zum gezielten Austausch von Fettsäuren innerhalb der TAG eine wichtige Rolle, um ernährungsphysiologisch hochwertige, strukturierte Lipide zu produzieren, die einen hohen Gehalt an langkettigen, mehrfach ungesättigter Fettsäuren aufweisen [Hoshino *et al.*, 1990; Balcão *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2012]. Weiterhin können durch Hydrolyse freigesetzte Fettsäuren mit einer Reihe verschiedener Alkoholkomponenten verestert werden, wodurch sich beispielsweise Aromastoffe und Biotenside auf Zuckerbasis synthetisieren lassen [Deng *et al.*, 2003; Gumel *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2012]. Über einen chemo-enzymatischen Ansatz können unter Verwendung von Lipasen Epoxidierungsreaktionen an freien und TAG-gebundenen, ungesättigten Fettsäuren durchgeführt werden. Die daraus resultierenden, epoxidierten Produkte eignen sich als Weichmacher und Stabilisatoren in Kunststoffen wie Polyvinylchlorid (PVC) oder Polylactiden (PLA) [Klaas und Warwel, 1997; Al-Mulla *et al.*, 2010; Aouf *et al.*, 2014].

Zur Verfolgung des Bioraffinerie-Konzepts wurden im Rahmen eines Verbundprojektes Untersuchungen zur Verarbeitung und stofflichen Verwertung heimischer Pflanzenöle durchgeführt. Zu diesem Zweck erfolgte ein Screening verschiedener Biokatalysatoren, um die Lipide der betreffenden Öle über Hydrolyse-, Umesterungs- und Epoxidierungsreaktionen gezielt zu modifizieren (unveröffentlicht). Bei den Untersuchungen haben sich Lipasen aus verschiedenen *Bacillus*-Spezies als geeignet für die Umsetzung der relevanten Substrate erwiesen, deren Produktion, Modifikation und Immobilisierung Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

1.4 Motivation

Lipasen können als Biokatalysatoren in zahlreichen Anwendungen eingesetzt werden (Abschnitt 1.1.3). In vielen Fällen bietet sich zur Verringerung der Kosten und zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit des biotechnologischen Prozesses die Verwendung des Enzyms in immobilisierter Form an, um nach Prozessende ein Recycling des Biokatalysators zu ermöglichen. Wichtige Faktoren, die den effizienten Einsatz eines Immobilisats mitbestimmen, sind dabei dessen trägergebundene Aktivität und Stabilität. Die erreichbare Aktivität auf dem Träger wird maßgeblich von der entsprechenden Immobilisierungsmethode und den gewählten Bedingungen beeinflusst [Hanefeld *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013]. Bei den oft angewendeten Immobilisierungsmethoden der Adsorption und kovalenten Kopplung geht häufig ein nicht unerheblicher Teil der eingesetzten Enzymaktivität dadurch verloren, dass die Interaktionen zwischen Enzym und Träger zu ungünstigen Orientierungen führen [Camarero, 2007; Garcia-Galan *et al.*, 2011]. Aufgrund sterischer Hinderungen kann so die Zugänglichkeit des Substrates zum aktiven Zentrum beeinträchtigt sein. Ein Ansatz zur Vermeidung orientierungsbedingter Aktivitätsverluste besteht in der Durchführung einer zielgerichteten Immobilisierung, bei der die Kopplung über festgelegte Bereiche auf der Proteinoberfläche abläuft [Hernandez und Fernandez-Lafuente, 2011]. Besonders im Fall von Lipasen wirkt sich die Enzymorientierung auf dem Träger entscheidend auf die Aktivität und Selektivität nach Immobilisierung aus [Grazu *et al.*, 2010; Godoy *et al.*, 2013]. Bei Auswahl der Kopplungsmethode und -bedingungen sollten dementsprechend die lipasetypischen Konformationsänderungen, die bei der Öffnung der Deckelstruktur auftreten, Berücksichtigung finden [Hanefeld *et al.*, 2009]. Dies trifft besonders bei einer beabsichtigten Kopplung durch Mehrpunktfixierung zu. Während der Grenzflächenaktivierung ist für den Übergang von der geschlossenen in die geöffnete Konformation ein gewisses Maß an Flexibilität notwendig, die durch die Interaktion mit dem Träger nicht eingeschränkt werden sollte. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Ansatz verfolgt, Lipasen über eine definierte Ebene auf der Proteinoberfläche zu koppeln, die auf der vom aktiven Zentrum bzw. Deckel entgegengesetzten Seite des Proteins liegt (Abbildung 1-10). Durch gezielte Modifikationen innerhalb der Proteinsequenz sollte ein besonders reaktiver Bereich geschaffen werden, der eine Kontrolle der Orientierung auf dem Träger erlaubt. Zur Erhöhung der lokalen Reaktivität wurden verschiedene Strategien untersucht, die entweder auf dem Einfügen von Punktmutationen oder auf der Fusion mit *tags* beruhen. Dadurch sollte neben einer gezielten Kopplung eine Stabilisierung der Lipasen erreicht werden, um eine Wiederverwendbarkeit im Prozess zu ermöglichen.

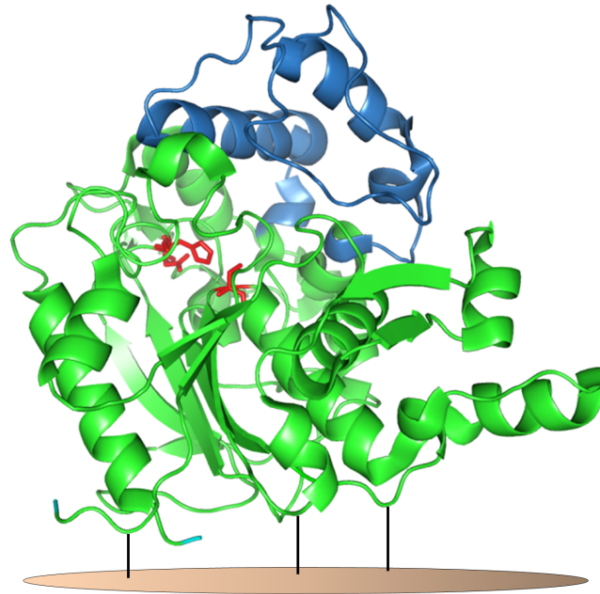


Abbildung 1-10: Schematische Darstellung der Lipase LipT1 aus *G. zalihae* mit bevorzugter Orientierung nach Immobilisierung. Aminosäureseitenketten des aktiven Zentrums (S113, D317, H358) in rot (*sticks*); Deckelregion (L170 – A240) in blau. *Ribbon*-Darstellung erstellt mit *pymol* basierend auf PDB-Eintrag 2DSN [Matsumura *et al.*, 2008].

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die rekombinante Herstellung und Immobilisierung verschiedener *Bacillus*-Lipasen. Zu diesem Zweck sollte zunächst ein skalierbares Verfahren zur Produktion der Lipasen LipT1 aus *Geobacillus* sp. T1, LipA aus *Bacillus subtilis* 168 und LipL1 aus *Geobacillus stearothermophilus* L1 etabliert werden. Ausgehend vom 0,5 L-Schüttelkolbenmaßstab sollte die Produktion stufenweise bis zum 50 L-Bioreaktormaßstab vergrößert werden. Im Vorfeld der Immobilisierung galt es proteinogene Verunreinigungen abzureichern, wozu eine Affinitätsreinigung über einen C-terminalen His₆-tag genutzt werden sollte. Für die Immobilisierung sollten auf Basis eines rationalen Protein-Design Lipase-Varianten generiert werden, die zielgerichtet auf funktionalisierte Trägermaterialien gekoppelt werden können. Dies sollte über Mutanten mit exponierten Cysteinresten bzw. mit einer veränderten Aminogruppenverteilung auf der Proteinoberfläche erreicht werden. Außerdem sollten Varianten mit Glutamin-tags erzeugt werden, die enzymatisch unter Einsatz einer mikrobiellen Transglutaminase auf einen Träger fixiert werden können. Des Weiteren galt es die Möglichkeit der Nutzung des His₆-tags zur Immobilisierung zu prüfen. Neben dem Kopplungsverhalten der verschiedenen Lipase-Varianten sollte deren Stabilität bei mehrmaligem Einsatz des Immobilisats in einer Hydrolysereaktion untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien sind in der Tabelle 2-1 zusammengestellt.

Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit [%]
Aceton	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9372.3	> 99,8
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung (30%)	Applichem (Darmstadt)	A0947.1000	≥ 99,9
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5210.2	-
Ampicillin-NaSalz	Applichem (Darmstadt)	A0839	-
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	05479	> 96
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9592.3	≥ 98
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	K298.2	≥ 99,5
Benzonase (Emprove)	Merck KgaA (Darmstadt)	1.01695.001	-
N-Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminylglycin (Z-Gln-Gly)	Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)	C-1635	-
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5239.1	≥ 99
Coomassie-Brillantblau G 250	Merck KgaA (Darmstadt)	9598.1	-
Dansylcadaverin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	D4008-1g	-
Dansyl-Tryptophan-Glutaminyl-Arginin	Dr. M. Malešević (MPI Halle/ Saale)	-	-
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6908.1	≥ 99
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3788.5	100
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8043.2	≥ 99
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4979.1	≥ 37
Glucose-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6887,5	-
L-Glutaminsäure γ -monohydroxamat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	G2253	-
Glutaraldehyd	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4995.1	50
Glutathion (Red.)	Merck KgaA (Darmstadt)	1.04090.0005	≥ 98
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3783.2	≥ 99,5
Glycerin	Caldic Deutschland (Düsseldorf)	706400	99,5
Glycin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3908.2	≥ 99
Gummi Arabicum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	G9752-500G	Reagent Grade
Gummi Arabicum	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4159.1	Ph.Eur.
Eisen(III)-chlorid-hexahydrat	Merck KgaA (Darmstadt)	1.03943.0250	> 99
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9065.4	> 99,8

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit [%]
Eisen(III)-chlorid-hexahydrat	Merck KGaA (Darmstadt)	1.03943.0250	> 99
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9065.4	> 99,8
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	2363.2	-
Hefeextrakt Ohly KAV	Ohly GmbH (Hamburg)	10801001	-
Hydroxylammonium-chlorid	Merck KGaA (Darmstadt)	1.04616.0100	> 99
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	X998.4	> 99
Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	CN08.4	> 99
Kaliumchlorid	KMF Optichem (Leipzig)	KMF.08-248.1000	99,5
Kaliumdihydrogen-phosphat	Riedel-de Haën (Seelze)	30407	99,5
Kaliumdihydrogen-phosphat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3904.1	> 99
Dikaliumhydrogen-phosphat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P749.3	> 99
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6751.1	> 85
Kupfer(II)chlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	61174	\geq 99
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	2189.1	> 99
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P027.1	> 99
Dimethyladipimidat (DMA)	Thermo Scientific (Braunschweig)	20660	-
<i>N,N</i> -Dimethyl-dodecylamine <i>N</i> -oxid (LDAO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	40234	> 99
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4227.2	-
Natriumcaseinat	Rovita GmbH (Engelsberg)	0222	-
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3957.2	> 99,5
Natriumcyanoborhydrid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	156159	95
Natriumdihydrogen-phosphat -Dihydrat	Riedel-de Haën (Seelze)	04269	98-100,5
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA (Darmstadt)	1.06329.0500	99,7
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3957.1	\geq 99,5
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P034.2	\geq 99,5
Natriumtetraborat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	S9640	ACS reagent
Dinatriumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	A135.2	> 99,8
Dinatriumhydrogen-phosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4984.3	\geq 99,5
Nickel(II)chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	22,338-7	-
Nickel(II)sulfat-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	T111.1	> 99
<i>p</i> -Nitrophenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	104-8	-
<i>p</i> -Nitrophenolpalmitat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	N2752	-
Olivenöl	Bertolli (Tavarnelle Val di Pesa, Italien)	Extra Vergine	-
<i>o</i> -Phthaldialdehyd OPA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	7976	> 99

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit [%]
<i>o</i> -Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6366.2	> 85
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6752.5	≥ 99,7
<i>Protein molecular weight marker</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	#SM0431	-
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4625.2	37
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	7908.1	≥ 99,9
<i>Silica gel orange</i> (Trockenmittel)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	T199.1	-
Struktol J673	Schill & Seilbacher (Hamburg)	3029673	-
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	2367.3	-
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3744.2	> 99
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4855.3	≥ 99,9
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	3051.2	reinst
Trypton / Pepton	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8952.4	-
<i>n</i> -Valeraldehyd	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4873.1	97

2.2 Geräte

Sämtliche verwendeten Geräte sind in der Tabelle 2-2 zusammengestellt.

Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Chromatographieanlage	Äkta Explorer	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Chromatographie-säulenmaterial	Streamline™ Chelating	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Gelfiltrationssäule	PD-10	GE Healthcare, Berlin, Deutschland
Dispergiersystem	Micra R-T D-1	ART moderne Labortechnik, Mühlheim, Deutschland
Fermentationsanlage	Biostat C 30 L	B.Braun International GmbH, Melsungen, Deutschland
	Biostat Dplus 75	Sartorius Stedim Systems GmbH, Melsungen, Deutschland
Geldokumentationssystem	GeneGenius Biolmaging System	Syngene, Cambridge, UK
Hochdruckhomogenisator	Emulsiflex C5	Avestin Inc., Ottawa, Kanada
	APV-2000	APV Products, Albertslund, Dänemark

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
pH-Meter	FE20	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Rollermixer	SRT1	Stuart Scientific, Staffordshire, UK
Schüttelinkubator	Multitron II	Infors HT AG, Bottingen, Schweiz
	Innova 4230	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
SDS-PAGE Anlage und Zubehör		Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Spektrophotometer	Genesys 6	ThermoSpectronic Rochester, New York, USA
	Helios Zeta UV-Vis	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
	Ultrospec 2100 pro Ultrospec 3300 pro	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Thermoblock	Thermostat plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermostat	DC 10	Thermo Haake, Karlsruhe, Deutschland
Titrimat	799 GPT Titrimo	Deutsche Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt, Deutschland
UV-Transilluminator	GenoSmart M	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vakuumpzentrifuge	Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexer	labDancer S40	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wärmeschrank	UFE 500	Memmert, Schwabach, Deutschland
Waage	BP221S BL310	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	APX-153	Denver Instrument, Göttingen, Deutschland
Wipptisch	Rocky 1000	Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5810 R, 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Avanti™ J-30I Rotor JA-10 Rotor JA-30.50	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
	CEPA Z41G CEPA Z61G	Padberg, Lahr, Deutschland

2.3 Puffer

Sämtliche in der Arbeit verwendeten Puffer sind in der Tabelle 2-3 zusammengestellt.

Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Puffer.

Bezeichnung	Komponente / Konzentration	pH
Lysepuffer	50 mM Tris 2 mM MgCl ₂ 1 mg/mL Lysozym 10 U/mL Benzonase	8
Aufschlusspuffer	50 mM Na-Phosphat 300 mM NaCl 2 mM MgCl ₂	8
Bindepuffer	50 mM Na-Phosphat 300 mM NaCl 20 mM Imidazol	8
Elutionspuffer	50 mM Na-Phosphat 300 mM NaCl 500 mM Imidazol	8
Elutionspuffer II	50 mM Na-Phosphat 500 mM NaCl 500 mM Imidazol 1 % (v/v) Triton X-100	8
Dialysepuffer	50 mM Na-Phosphat	8
Assay-Puffer (Lösung B)	100 mM Na-Phosphat 0,5 % (w/v) Triton X-100 0,1 % (w/v) Gummi Arabicum	7
MTG-Kopplungspuffer (MKP)	50 mM Tris 300 mM NaCl	8
MTG-Waschpuffer (MWP)	50 mM Tris 500 mM NaCl 0,5 % (w/v) Triton X-100	8
MTG-Waschpuffer II (MWP II)	50 mM Tris 1 M NaCl 1 % (w/v) Triton X-100	8
Reduktionspuffer	50 mM Na-Phosphat 25 mM DTT	8
Cys-Kopplungspuffer (CKP)	50 mM Na-Phosphat 300 mM NaCl 0,5 % (w/v) Triton X-100	7
Cys-Waschpuffer (CWP)	50 mM Na-Phosphat 500 mM NaCl 1 % (w/v) Triton X-100	7
Blockpuffer	50 mM Na-Phosphat 1 % (v/v) β -ME	7

Bezeichnung	Komponente / Konzentration	pH
Puffer Thermostabilität	50 mM Na-Phosphat	7
Glutaraldehyd- / His ₆ -Kopplungspuffer (KP I)	50 mM Na-Phosphat 500 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100	8
Glutaraldehyd-Kopplungspuffer (KP II)	50 mM Carbonat-Bicarbonat 500 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100	10
Äquilibrierpuffer Glutaraldehyd-Trägeraktivierung	200 mM Na-Phosphat	7
KP-Recycling	50 mM Na-Phosphat 500 mM NaCl	8
Sepabeads- Kopplungspuffer (SP-KP I)	1M Na-Phosphat	7
Sepabeads- Kopplungspuffer (SP-KP II)	0,5 M Na-Phosphat 1 % (v/v) Triton X-100	7
Sepabeads- Waschpuffer (SP-WP I)	50 mM Na-Phosphat 1 M NaCl	7
Sepabeads- Waschpuffer (SP-WP II)	50 mM Na-Phosphat 0,5 % (v/v) Triton X-100	7
Probenpuffer	vgl. Abschnitt 2.8.5	
Kathodenpuffer	vgl. Abschnitt 2.8.5	
Trenngelpuffer	vgl. Abschnitt 2.8.5	
Sammelgelpuffer	vgl. Abschnitt 2.8.5	

2.4 Nährmedien

Die Zusammensetzungen der verwendeten Medien sind in den folgenden Tabellen dargestellt. Alle Medien wurden für mindestens 20 min bei 121 °C hitzesterilisiert. Die Medien zur Kultivierung von plasmidhaltigen Zellen enthielten zur Aufrechterhaltung eines Selektionsdruckes jeweils Ampicillin mit einer Zielkonzentration von 100 µg/mL.

Für die Zielproteinproduktion in der jeweiligen Hauptkultur wurde ein literaturbeschriebenes Komplexmedium gewählt, das auf der Verwendung eines pastösen Hefeextraktes (Ohly KAV) mit verschiedenen Zusätzen beruht [Gerber *et al.*, 2008]. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 2-5 aufgeführt. Für das Batch-Medium der Fermentation wurde aus Gründen einer anlagebedingten Limitierung des Sauerstoffeintrags die Start-Glycerin-Konzentration von 10 g/L auf 5 g/L herabgesetzt.

Tabelle 2-4: Medien für die Kultivierung von *Escherichia coli* (Transformation und Vorkulturführung).

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkungen
LB-Medium	10 g/L Pepton 10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt	Einstellung pH-Wert auf 7 mit NaOH
LB-Agar-Medium	wie LB-Medium, zusätzl. 15 g/L Agar-Agar	
SOB-Medium modifiziert nach [Hanahan, 1983]	5 g/L Hefeextrakt 20 g/L Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂	Einstellung pH-Wert auf 7 mit NaOH MgCl ₂ -Stammlösung separat autoklaviert und nachträglich zugesetzt
SOC-Medium	wie SOB-Medium, zusätzl. 20 mM Glucose	Glucose-Stammlösung separat autoklaviert und nachträglich zugesetzt

Tabelle 2-5: Zusammensetzungen der verwendeten Medien zur Produktion der Lipasen (modifiziert nach [Gerber et al., 2008]).

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkungen
Produktions- medium PM für Schüttelkolben	50 g/L Hefeextrakt (Ohly KAV) 10 g/L Glycerin 0,5 g/L NH ₄ Cl 8,4 g/L K ₂ HPO ₄ 0,1 g/L MgSO ₄ x7H ₂ O	Stammlösungen für K ₂ HPO ₄ und MgSO ₄ x 7 H ₂ O wurden separat autoklaviert Einstellung auf pH-Wert 7 mit 1 mL NaOH (100 g/L)
Produktions- medium PM für Bioreaktor; Batch-Phase	50 g/L Hefeextrakt (Ohly KAV) 5 g/L Glycerin 0,5 g/L NH ₄ Cl 8,4 g/L K ₂ HPO ₄ 0,1 g/L MgSO ₄ x7H ₂ O	Stammlösungen für K ₂ HPO ₄ und MgSO ₄ x 7 H ₂ O wurden separat autoklaviert pH-Regelung im Bioreaktor über Dosage von NaOH (100 g/L) bzw. 20 % (v/v) H ₃ PO ₄
Feed-Lösung	15 % (w/v) Hefeextrakt (Ohly KAV) 25 % (v/v) Glycerin	

2.5 Enzyme

Die in der Arbeit eingesetzten, kommerziell erhältlichen Enzyme sind in Tabelle 2-6 aufgeführt. Informationen zur eingesetzten Variante S2P der mikrobiellen Transglutaminase (MTG) können Abschnitt 2.9.9 entnommen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit produzierten Wildtyp-Lipasen sind in Tabelle 2-7 angegeben. Die Nukleotidsequenzen der Lipasen wurden an die *codon usage* von *E. coli* angepasst und durch Gensynthese erzeugt (DNA 2.0 Inc, USA). Die nativen Signalsequenzen aus den jeweiligen Herkunftsorganismen wurden nicht synthetisiert. Zur Reinigung der Lipasen wurde ein C-terminaler His₆-tag integriert. Die Klonierung in den Vektor pJExpress-404, der einen T5 Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase) enthielt, erfolgte extern (DNA 2.0 Inc, USA). Die daraus resultierenden Plasmide wurden von Eucodis Biosciences zur Verfügung gestellt [Modregger, 2010].

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Lipasen sind im Anhang aufgeführt (Abbildung 8-1 bis Abbildung 8-6). Die Erstellung der Plasmide der einzelnen LipT1-Varianten aus Tabelle 2-8 erfolgte analog zu den Wildtyp-Lipasen.

Tabelle 2-6: Übersicht zur Verwendung kommerzieller Enzympräparate.

Enzympräparat	Lieferant	Bestellnummer
Lysozym	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8259.1
Benzonase	Merck KgaA (Darmstadt)	1.01695.001
Trypsin	Promega GmbH (Mannheim)	V5117

Tabelle 2-7: Übersicht der produzierten *Bacillus*-Lipasen.

	LipT1-WT	LipA	LipL1
Organismus	<i>Geobacillus</i> sp. T1 * [Leow <i>et al.</i> , 2004]	<i>Bacillus subtilis</i> 168 [Dartois <i>et al.</i> , 1992]	<i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> L1 [Kim <i>et al.</i> , 1998]
Gene Accession #	AY260764	M74010	U78785
PDB-Eintrag	2DSN [Matsumura <i>et al.</i> , 2008]	1I6W [Pouderoyen <i>et al.</i> , 2001]	1KU0 [Jeong <i>et al.</i> , 2002]
Plasmid	pJExpress-LipT1-WT	pJExpress-LipA	pJExpress-LipL1

* Neuklassifizierung: *Geobacillus zalihae* T1 [Rahman *et al.*, 2007]

Tabelle 2-8: Übersicht der zur zielgerichteten Immobilisierung erstellten Mutanten der Lipase LipT1. Alle Aminosäurepositionen basieren auf der veröffentlichten Struktur der Lipase LipT1 (PDB: 2DSN) [Matsumura *et al.*, 2008].

Lipase-Bezeichnung	Zielgerichtete Immobilisierung über	Modifikation: Mutationen bzw. tags
LipT1-KXR	Aminogruppen	K28R K84R K185R K207R K229R K251R K329R
NQ-LipT1	Glutaminreste	N-terminaler tag: MLYQRSGGGS
LipT1-CQ	Glutaminreste	C-terminaler tag: GGGSMLYQRRSLEHHHHHH
LipT1-S2C	Cysteinreste	C64S, C295S, S2C
LipT1-S259C	Cysteinreste	C64S, C295S, S259C
LipT1-S333C	Cysteinreste	C64S, C295S, S333C
LipT1-SXC	Cysteinreste	C64S, C295S, S2C, S259C, S333C

2.6 Trägermaterialien

Zur Immobilisierung wurden folgende Trägermaterialien verwendet:

Tabelle 2-9: Übersicht der verwendeten Trägermaterialien zur Immobilisierung der Lipasen.

Name Trägermaterial	Hersteller	Funkt. Gruppen	Dichte funkt. Gruppen	Matrix	spacer	Partikelgröße	Mittl. Porendurchmesser
EAH-Sepharose [1]	GE, Healthcare	Aminogruppen	7-12 $\mu\text{mol/mL}$	4 % Agarose	1,6-Diaminohexan	45 - 165 μm	30 nm [2]
CPC - Silica Carrier silane coated [3] (CPG-NH ₂)	Fluka	Aminogruppen	17,3 \pm 2 $\mu\text{mol/g}$ [4]	Silica	k.A.	354 – 595 μm	37,5 nm
Lewatit VP OC 1065 [5]	LanXess	Aminogruppen	3,3 mmol/g	vernetztes Divinylbenzen	Benzylamin	315 – 1250 μm	25 nm
Sepabeads EC-EP/S [6]	Resindion	Oxirangruppen	> 100 $\mu\text{mol/g}$	Poly-methacrylat	k.A.	100 – 300 μm	10 – 20 nm
Streamline Chelating [7]	GE, Healthcare	Carboxygruppen	k.A.	6 % Agarose; Quatzkern	Iminodiessigsäure	100 – 300 μm	k.A.
PEG/MAL-Objekt-träger [8]	Micro-Surfaces, Inc.	Maleinimid	10 ¹³ – 10 ¹⁴ /cm ²	Glas + PEG-Beschichtung	k.A.	Fläche: 19,4 cm ²	-

Sofern nicht anders vermerkt basieren die Einträge auf folgenden Herstellerangaben: [1] [GE-Healthcare, 2009]; [2] [Sigma-Aldrich, 2006]; [3] [Fluka, 2012]; [4] Bestimmung der Aminogruppendichte mit *o*-Phtaldialdehyd nach [Janolino und Swaisgood, 1992]; [5] [Lanxess, 2011]; [6] [Resindion, 2010]; [7] [GE-Healthcare, 2013]; [8] [Micro-Surfaces, 2013].

2.7 Inkubationskammern für Objektträger

Zur Immobilisierung der Lipasen auf funktionalisierte Objektträger wurden eigens dafür angefertigte Inkubationskammern eingesetzt. Ausgangspunkt war ein PVC-Block, in den jeweils drei Kammern für Glasobjektträger (1 x 3 Zoll) gefräst wurden. Eine schematische Zeichnung ist in Abbildung 2-1 dargestellt. In jede der drei Kammern wurde eine zusätzliche Vertiefung mit den Maßen 2 mm x 77 mm x 27 mm (H x B x T) eingefräst, damit die Kanten des Objektträgers bündig mit der Kammerwand abschließen. Somit sollte eine Benetzung der Objektträgerunterseite vermieden werden.

Zur Realisierung der Temperierung sowie der Durchmischung wurde der Kammerblock in Kombination mit einem Mikrotiterplattenaufsatz des Thermomixer comfort (Eppendorf) verwendet. Die Reinigung der Kammern erfolgte mit 4 M NaOH und dH₂O. Die Verwendung der Kammern ist detailliert in Abschnitt 2.9.15 beschrieben.

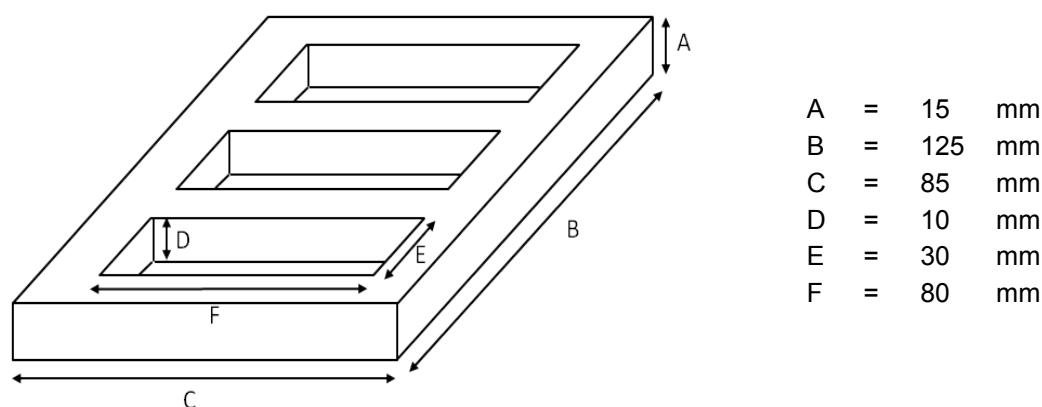


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Kammern zur Inkubation von Glasobjektträgern.

2.8 Analytik

2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford [Bradford, 1976]. Für das Farbreagens wurden 100 mg Coomassie-Brillantblau G-250 in 50 mL 95 %-igem Ethanol gelöst, 100 mL 85 %-ige Phosphorsäure zugesetzt und mit dH₂O auf 600 mL aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung filtriert, 100 mL Glycerin dazugegeben und mit dH₂O auf 1 L aufgefüllt. Nach 24 h konnte das Reagenz verwendet werden.

Für den Test wurden 50 µL Proteinlösung mit 2 mL Farbreagens versetzt, gemischt und die Extinktion bei 595 nm gegen einen Blindwert ermittelt. Als Kalibrierprotein wurde BSA eingesetzt. Der lineare Bereich für den Test lag zwischen 5 und 500 µg Protein / mL.

2.8.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

2.8.2.1 Titrimetrische Bestimmung der Lipase-Aktivität

Die Bestimmung der Lipase-Aktivität nach Zellaufschluss und während der Reinigung erfolgte mit einem Auto-Titrator (799 GPT Titrimo; Metrohm). Die Substratlösung bestand aus 2 % (w/v) Gummi Arabicum und 5 % (v/v) Olivenöl, das durch Ultraturax-Behandlung (3 min; 18000 rpm) emulgiert wurde. Vor Reaktionsstart wurden zu 70 mL - Emulsion noch 1,65 mL 1,98 M CaCl₂ zugesetzt (Endkonzentration 46 mM) [Schmid *et al.*, 1999]. Die Lipase-Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µL Enzymlösung in geeigneter Verdünnung gestartet und verlief unter kontinuierlichem Rühren (Stufe 3,5 Stabrührer 802; Metrohm) bei einer Temperatur von 37 °C. Die Freisetzung von Fettsäuren wurde durch die integrierte pH-Elektrode registriert und der pH-Wert durch automatische Zugabe von 0,01 N NaOH auf 8 konstant gehalten (pH-Stat-Modus). Das zudosierte Natronlauge-Volumen stellt ein Maß für die enzymatische Aktivität der eingesetzten Lipase dar. Die in Kontrollansätzen ohne Enzymzugabe gemessene NaOH-Dosage infolge der Autohydrolyse des Substrats wurde jeweils von der Messung abgezogen. Die volumetrische Aktivität der Lipase-Probe wurde nach Gl. 1 berechnet. Eine Unit (U_T) im titrimetrischen Test wurde definiert als die Enzymmenge, die 1 µmol Fettsäure pro Minute freisetzt.

$$\text{Vol. Lipase-Aktivität (Titration) } A_T \left[\frac{U_T}{\text{mL}} \right] = \frac{\dot{V}_{\text{NaOH}} \cdot c_{\text{NaOH}} \cdot F_V}{V_{\text{Enzym}}} \quad (\text{Gl. 1})$$

mit	\dot{V}_{NaOH}	NaOH-Dosage [mL/min]
	c_{NaOH}	Konzentration NaOH-Stammlösung [µmol/mL]
	V_{Enzym}	Volumen der Enzymlösung [mL]
	F_V	Verdünnungsfaktor der Enzymlösung [-]

2.8.2.2 Colorimetrische Bestimmung der Lipase-Aktivität

Die colorimetrische Bestimmung der Lipase-Aktivität wurde, unter Anpassung verschiedener Parameter, nach Bornscheuer *et al.* durchgeführt [Bornscheuer *et al.*, 1994]. Als Substrat diente *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP). Zur Herstellung der Substratlösung wurden 1 mL Lösung A (5 mM *p*NPP in Isopropanol) mit 9 mL Lösung B (0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7, 0,5 % (w/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) Gummi Arabicum) gemischt und im Wasserbad bei 25 °C vorinkubiert.

Zur Aktivitätsbestimmung löslicher Lipase wurde 1 mL Substratlösung in einem temperierbaren Photometer (Ultrspec 2100 bzw. 3300) bei 25 °C vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 20 µL Lipase-Probe gestartet. Der Verlauf der Reaktion wurde durch Bestimmung der Extinktion bei 405 nm über 3 min verfolgt. Als Blank diente der jeweils zur Verdünnung der Lipase verwendete Puffer. Die volumetrische Lipase-Aktivität gegenüber *p*NPP wurde nach Gl. 2 berechnet. Unter Verwendung von *p*-Nitrophenol in einem Konzentrationsbereich von 0 – 3 mM wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von

9,093 cm²/μmol bestimmt. Eine Unit (U_C) im colorimetrischen Lipase-Aktivitätstest wurde definiert als die Enzymmenge, die die Freisetzung von 1 μmol *p*-Nitrophenol pro Minute katalysiert.

$$\text{Vol. Lipase-Aktivität (pNPP) } A_C \left[\frac{U_C}{\text{mL}} \right] = \frac{\Delta E_{405\text{nm}}}{\Delta t} \cdot \frac{V_{\text{Test}}}{\epsilon_{405\text{nm}} \cdot d \cdot V_{\text{Enzym}}} \cdot F_V \quad (\text{Gl. 2})$$

mit	$\frac{\Delta E_{405\text{nm}}}{\Delta t}$	Extinktionsänderung pro Zeit abzgl. Blank [1/min]
	V_{Test}	Gesamtvolumen [mL]
	V_{Enzym}	Volumen der Enzymlösung [mL]
	F_V	Verdünnungsfaktor der Enzymlösung [-]
	$\epsilon_{405\text{nm}}$	Mol. Extinktionskoeffizient bei 405 nm [cm ² /μmol]
	d	Schichtdicke in der Küvette [cm]

Zur Bestimmung der Lipase-Aktivität nach Immobilisierung wurde das Immobilisat mittels Glasfritte (POR 4) und Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) 20 s filtriert, um die Wasch- bzw. Lagerlösung zu entfernen. Anschließend wurden 10 mg Immobilisat in 2 mL-Reaktionsgefäße eingewogen, mit 1,5 mL Substratlösung versetzt und im Thermomixer bei 25 °C und 900 rpm für mindestens 3 min inkubiert. Als Referenz diente Substratlösung, die unter gleichen Bedingungen mit Trägermaterial ohne Enzymbeladung inkubiert wurde. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurde mit Hilfe von 2 mL-Einwegspritzen (SE20; Hartenstein) in Kombination mit Stumpf-Kanülen (Braun Sterican Ø 0,8 x 40 mm) und CME-Spritzenfilter (Carboxymethylcellulose; 0,45 μm; Roth P819.1) das Immobilisat abgetrennt und die Extinktion des Filtrats bei 405 nm vermessen. In Vorversuchen zur Filtration von *p*NP-Lösungen mit CME-Filtern wurde eine 5 %-ige Abnahme der Extinktion infolge des Filtrationsschrittes beobachtet, die in der Aktivitätsberechnung berücksichtigt wurde.

Zur Bestimmung von nicht kovalent gebundener Lipase, die sich während der Reaktion vom Träger löste (*leaching*), wurde der Extinktionsverlauf im Filtrat über mindestens 60 s verfolgt. Der allein durch ausgewaschenes Enzym verursachte Signalanstieg wurde vom Gesamtanstieg während der Reaktion abgezogen. Die Berechnung der trägergebundenen Aktivität A_C^{Im} erfolgte nach Gl. 3.

$$\text{Trägergeb. Aktivität } A_C^{\text{Im}} \left[\frac{U_C}{\text{g}} \right] = \left(\left(\frac{\Delta E_{405\text{nm}}}{\Delta t} \right)_G - \left(\frac{\Delta E_{405\text{nm}}}{\Delta t} \right)_L \right) \cdot \frac{V_{\text{Test}}}{\epsilon_{405\text{nm}} \cdot d \cdot m_{\text{Im}}} \quad (\text{Gl. 3})$$

mit	$\left(\frac{\Delta E_{405\text{nm}}}{\Delta t} \right)_G$	Gesamtextinktionsänderung pro Zeit abzgl. Blank [1/min]
	$\left(\frac{\Delta E_{405\text{nm}}}{\Delta t} \right)_L$	Extinktionsänderung pro Zeit <i>leaching</i> abzgl. Blank [1/min]
	m_{Im}	Immobilisat-Einwaage [g]

Zur Beurteilung der Immobilisierungsergebnisse wurden folgende Parameter verwendet:

$$\text{Theoretische Trägerbeladung} \quad A_{\text{theo}}^{\text{Im}} \left[\frac{U_C}{g} \right] = \frac{(A_C^0 - A_C^{\text{Ende}}) \cdot V_{\text{Ansatz}}}{m_{\text{Im}}} \quad (\text{Gl. 4})$$

$$\text{Kopplungsausbeute} \quad Y^{\text{Im}} [\%] = \frac{A_C^0 - A_C^{\text{Ende}}}{A_C^0} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 5})$$

$$\text{Wiederfindung Aktivität} \quad R^{\text{Im}} [\%] = \frac{A_C^{\text{Im}} \cdot m_{\text{Im}}}{(A_C^0 - A_C^{\text{Ende}}) \cdot V_{\text{Ansatz}}} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 6})$$

mit $A_C^0 - A_C^{\text{Ende}}$ Theoretisch gebundene Aktivität $[U_C]$ ermittelt über Akt.
im Überstand vor (A_C^0) und nach Kopplung (A_C^{Ende})
 V_{Ansatz} Volumen Kopplungsansatz [mL]

Zur Ermittlung der auf Glasobjektträger (OT) immobilisierten Lipase-Aktivität wurde die Hydrolyse von pNPP in den in Abschnitt 2.7 beschriebenen Inkubationskammern durchgeführt. Nach Reinigung der Kammern mit EtOH und 4 M NaOH sowie anschließendem Waschen mit dH₂O inkl. Trocknung wurde der zu untersuchende Objektträger in die Kammer positioniert. Durch Zugabe von 4 mL Substratlösung wurde die Reaktion gestartet und der Ansatz über mindestens 5 min bei 350 rpm und 25 °C im Thermomixer inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde 1 mL Reaktionslösung in eine Küvette überführt, die Extinktion bei 405 nm bestimmt und die Lösung wieder in die Kammer transferiert. Als Blank diente Substratlösung, die ohne Objektträger unter gleichen Bedingungen in der Kammer inkubiert wurde. Die Berechnung der Lipase-Aktivität auf Objektträgern (A_C^{OT}) erfolgte nach Gl. 7.

$$\text{Objektträger-Aktivität } A_C^{\text{OT}} \left[\frac{U_C}{\text{OT}} \right] = \left(\left(\frac{\Delta E_{405\text{nm}}}{\Delta t} \right)_G - \left(\frac{\Delta E_{405\text{nm}}}{\Delta t} \right)_L \right) \cdot \frac{V_{\text{Test}}}{\epsilon_{405\text{nm}} \cdot d} \quad (\text{Gl. 7})$$

2.8.2.3 Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität

Zur Bestimmung der MTG-Aktivität wurde der colorimetrische Hydroxamattest eingesetzt [Folk und Cole, 1966]. N-Benzoyloxycarbonyl-L-Glutaminylglycin (Z-Gln-Gly) diente hierbei als Glutamin-Substrat, das von der MTG mit Hydroxylamin zu Z-γ-Glutaminyl-Hydroxamat-Gly umgesetzt wird. Mit Eisenionen (Fe^{3+}) bildet sich ein Farbkomplex, der bei 525 nm photometrisch detektiert werden kann. Für den Test wurden die Substrat- und Stopplösung entsprechend der Tabelle 2-10 bzw. der Tabelle 2-11 hergestellt. Für die Substratlösung

wurden 5 g dH₂O vorgelegt. Nach Tris-Zugabe wurden 400 µL 1 M Essigsäure zugesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe aller weiteren Bestandteile, die Einstellung des pH-Wertes mit 1 M Essigsäure auf 6 und das Auffüllen mit dH₂O auf 10 g. Für den Test waren keine zusätzlichen Additive erforderlich, daher wurden zusätzlich 833 µL dH₂O zugesetzt.

Tabelle 2-10: Bestandteile der Substratlösung des Hydroxamat-Tests.

Konzentration im Test	Molekulargewicht [g/mol]	Einwaage für 10 g [g]
0,20 M Tris-Acetat (pH 6.0)	121,1	0,303
0,10 M Hydroxylamin	69,5	0,087
0,01 M GSH	307,3	0,038
0,03 M Z-Gln-Gly	337,3	0,127

Tabelle 2-11: Zusammensetzung der Stopplösung des Hydroxamat-Tests. Die drei Lösungen wurden zu gleichen Teilen in der angegebenen Reihenfolge gemischt.

Konzentration	Reihenfolge
12 % (w/v) Trichloressigsäure	1
5 % (w/v) FeCl ₃ · 6 H ₂ O (in 0,1 M HCl)	2
3 M HCl	3

$$\text{MTG-Aktivität } A_{\text{MTG}} \left[\frac{\text{U}_{\text{MTG}}}{\text{mL}} \right] = \frac{E_{525\text{nm}} \cdot V_{\text{Test}}}{\epsilon_{525\text{nm}} \cdot t_{\text{Rea}} \cdot d \cdot V_{\text{Enzym}}} \cdot F_V \quad (\text{Gl. 8})$$

mit	$E_{525\text{nm}}$	Extinktion bei 525 nm [-]
	V_{Test}	Gesamtvolumen [mL]
	V_{Enzym}	Volumen der Enzymlösung [mL]
	F_V	Verdünnungsfaktor der Enzymlösung [-]
	t_{Rea}	Reaktionszeit [min]
	$\epsilon_{525\text{nm}}$	Mol. Extinktionskoeffizient bei 525 nm [cm ² /µmol]
	d	Schichtdicke in der Küvette [cm]

Zur Durchführung des Tests wurden 455 µL Substratlösung für 3 min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend mit 70 µL Enzymlösung versetzt. Nach 10 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 525 µL Stopplösung beendet und das Reaktionsgemisch für 2 min bei 16.100 x g zentrifugiert. Vom erhaltenen Überstand wurde die Extinktion bei 525 nm gegen einen Blindwert bestimmt. Bei Messung des Blindwertes wurden statt

Enzymlösung 70 μL des jeweiligen Puffers zugesetzt, der zur Resolubilisierung des MTG-Präparates zum Einsatz kam (abhängig vom jeweiligen Versuch: Puffer MKP bzw. MWP). Für die Messung der MTG-Aktivität wurde mit Hilfe von γ -Glutaminyl-Hydroxamat (0-10 mM) ein molarer Extinktionskoeffizient von $0,4995 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ bei einer Wellenlänge von 525 nm ermittelt.

2.8.3 Bestimmung der Glycerinkonzentration

Die Ermittlung der Glycerinkonzentration wurde mit einem enzymatischen Analyse-Kit (Glycerin-UV-Test; R-Biopharm AG) durchgeführt. In einer dreistufigen enzymatischen Reaktion, bei der im ersten Schritt Glycerin als Edukt dient, wird reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid ($\text{NADH}+\text{H}^+$) zu NAD^+ oxidiert. Die verbrauchte Menge $\text{NADH}+\text{H}^+$ entspricht dabei der in der Probe enthaltenen Menge Glycerin und wird bei einer Wellenlänge von 340 nm detektiert. Für die Probenvorbereitung wurden 1 mL Kulturbrühe 2 min bei 16.100 g und 4 °C zentrifugiert. Nach 15-minütiger Inkubation des Überstandes bei 80 °C wurde dieser erneut unter den vorgenannten Bedingungen zentrifugiert. Die Lösung wurde, abhängig von der zu erwartenden Glycerin-Konzentration, mit dH_2O verdünnt. Der Test wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.8.4 Untersuchung der Plasmidstabilität

Zur Untersuchung der segregativen Plasmidstabilität wurden Fermentationsproben zu ausgewählten Zeitpunkten (nach 1,5 h, vor Induktion (6 h) und 0,5 h vor Prozessende) mit steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt. Von den Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} wurden jeweils 100 μL auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 100 Kolonien mittels sterilen Zahnstochern auf je eine LB- und LB_{AMP} -Agar-Platte übertragen und erneut bei 37 °C kultiviert. Nach 24 h wurden die antibiotikaresistenten Kolonien der LB_{AMP} -Agar-Platte ausgezählt und mit den auf der LB-Agar-Platte gewachsenen Kolonien verglichen. Das Verhältnis der beiden Kolonienzahlen beschreibt die segregative Plasmidstabilität [Vyas *et al.*, 1994].

2.8.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte nach Laemmli [Laemmli, 1970]. Die Gele bestanden aus je einem Trenn- und einem Sammelgel, deren Zusammensetzung in Tabelle 2-12 dargestellt ist. Die zu analysierenden Proben wurden, falls nicht anders angegeben, 1:2 mit SDS-Probenpuffer verdünnt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Es wurden 10 μL Probe und 5 μL Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in zwei Stufen durchgeführt: 1. Stufe 300 V, 80 mA, 6 min; 2. Stufe: 300 V, 60 mA, 40 min.

Tabelle 2-12: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele (Dicke je 1 mm).

Komponente	2 Trenngele 12,5 % T	2 Sammelgele 4,5 % T
Gelpuffer	2,5 mL	1,25 mL
Acrylamid/ Bisacrylamid	4,2 mL	0,75 mL
deionisiertes Wasser	3,3 mL	3,00 mL
TEMED	10 µL	10 µL
gesättigtes APS	20 µL	8 µL

Tabelle 2-13: Lösungen und Reagenzien zur Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkungen zur Herstellung
Trenngelpuffer	181,8 g Tris 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN ₃ -Lösung pH 8,8	Substanzen in 800 mL dH ₂ O gelöst, pH mit HCl eingestellt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt
Sammelgelpuffer	60,6 g Tris 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN ₃ -Lösung pH 6,8	Substanzen in 800 mL dH ₂ O gelöst, pH mit HCl eingestellt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %); Mix 32:1	290,9 g/L Acrylamid 9,1 g/L Bisacrylamid	-
APS-Lösung (gesättigt)	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	In einem Reaktionsgefäß dH ₂ O vorgelegt und eine entsprechende Menge APS hinzugefügt, bis sich keine Kristalle mehr lösten
Kathodenpuffer (10x konzentriert)	30,28 g Tris 144 g Glycin 50 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN ₃ -Lösung	Substanzen in 800 mL dH ₂ O gelöst und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt
SDS-Probenpuffer	27,2 g Tris 30 mL HCl (3 M) 250 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 500 mg Bromphenolblau 500 g Glycerin pH 6,8	Substanzen in etwas dH ₂ O gelöst, pH mit 3 M HCl eingestellt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt. Vor Verwendung wurden 10 µL Mercaptoethanol pro mL SDS-Probenpuffer zugesetzt

2.8.5.1 Färbung mittels Coomassie

Das SDS-PAGE-Gel wurde über Nacht in Färbelösung auf einem Wipptisch geschüttelt. Nach der Färbung wurde das Gel mit Entfärbelösung bis zum maximalen Kontrast entfärbt (Wechsel der Lösung nach 30 min). Nach Spülen mit dH₂O (5 min) wurde das Gel für 30 min in Geltrocknerlösung inkubiert. Das Gel wurde luftblasenfrei zwischen zwei mit dH₂O

benetzte Cellophanfolien gespannt und für zwei Tage bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2-14 aufgelistet.

Tabelle 2-14: Lösungen zur Durchführung der Coomassie-Färbung.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkungen zur Herstellung
Färbelösung	1 g/L Coomassie Brillant Blau G-250 20 % (v/v) 2-Propanol 10 % (v/v) Essigsäure	Coomassie Brillant Blau in 700 mL dH ₂ O gelöst, danach Zugabe der Lösungsmittel
Entfärbelösung	20 % (v/v) 2-Propanol 10 % (v/v) Essigsäure	Lösungsmittel gemischt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt
Geltrocknerlösung	20 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Glycerin	Substanzen in 500 mL dH ₂ O gemischt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt

2.8.5.2 Silberfärbung

Um eine sensitivere Färbung des SDS-PAGE-Gels zu erlangen, wurde die Silberfärbung nach Blum *et al.* eingesetzt [Blum *et al.*, 1987]. Die Durchführung ist in Tabelle 2-15 dargestellt. Die Lösungen zum Sensitivieren, Färben und Entwickeln wurden kurz vor Verwendung frisch hergestellt. Nach den genannten Schritten wurde das Gel in 50 % (v/v) Methanol aufbewahrt oder analog zur Coomassie-Färbung getrocknet.

Tabelle 2-15 : Protokoll zur Durchführung der Silberfärbung nach [Blum *et al.*, 1987]. Pro Gel wurden je 100 mL Lösung verwendet.

Schritt	Lösung	Inkubationsdauer
1. Fixieren	500 mL Methanol 120 mL Essigsäure (100 %) 0,5 mL Formaldehyd (37 %) mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt	mind. 2 h
2. Waschen	50 % (v/v) Ethanol	3 x 20 min
3. Sensitivieren	0,2 g/L Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	1 min
4. Waschen	dH ₂ O	3 x 20 s
5. Färben	0,4 g AgNO ₃ 150 µL Formaldehyd (37 %) mit dH ₂ O auf 0,2 L aufgefüllt	30 min
6. Waschen	dH ₂ O	2 x 20 s
7. Entwickeln	12 g Na ₂ CO ₃ 100 µL Formaldehyd (37 %) 4 mL Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O-Lösung [0,2 g/L] mit dH ₂ O auf 0,2 L aufgefüllt	bis gewünschte Färbung erreicht (3-5 min)

Schritt	Lösung	Inkubationsdauer
8. Stoppen	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure	10 min
9. Waschen	50 % (v/v) Methanol	1 min

2.9 Methoden

2.9.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* - Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen des Stamms *E. coli* BL21 Gold(DE3) wurden ausgehend von einer auf LB-Agar-Medium gewachsenen Einzelkolonie 5 mL LB-Medium angeimpft und für 16 h bei 37 °C inkubiert (180 rpm im Schüttelinkubator; Infors). Von dieser Vorkultur wurden 2 mL auf eine 50 mL LB-Schüttelkolbenkultur übertragen und weiterhin bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 - 0,6 kultiviert (110 rpm im Schüttelinkubator; Infors). Anschließend erfolgte die Zellernte durch Überführen der Kultur in ein auf 4 °C vorgekühltes Zentrifugengefäß und einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei $3.220 \times g$ und 4 °C. Das erhaltene Zellpellet wurde in 25 mL 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde erneut für 10 min bei $3.220 \times g$ (4 °C) zentrifugiert und das Pellet in 5 mL 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden daraufhin mit 750 μ L eiskaltem, sterilem Glycerin (99 % (w/v)) versetzt und davon jeweils Aliquote zu 100 μ L mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.9.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* - Zellen

Die Transformation des Stamms *E. coli* BL21 Gold(DE3) erfolgte mittels Hitzeschock-Methode. Die verwendeten Lipase-Nukleotidsequenzen und entsprechenden Plasmide pJExpress-LipT1, pJExpress-LipL1 und pJExpress-LipA sind in Abschnitt 2.5 näher beschrieben. Zur Transformation wurden Aliquote der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 μ L Plasmid-DNA (min. 0,2 μ g) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgten eine Inkubation für 45 s bei 42 °C (Wasserbad), eine Abkühlung für 2 min auf Eis und die Zugabe von 400 μ L SOC-Medium. Nach Inkubation der Transformationsansätze mit SOC-Medium für 1 h bei 37 °C (1000 rpm; Thermomixer) wurden jeweils 100 μ L auf LB_{Amp} -Agarplatten ausgestrichen und im Brutschrank für 16 h bei 37°C kultiviert.

Bei erfolgreicher Transformation der Zellen konnten entsprechende Einzelkolonien gepickt und zum Anlegen von Kryokulturen in 5 mL LB_{Amp} -Medium überführt werden. Die Anzucht der plasmidhaltigen Zellen wurde bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator durchgeführt.

Bei einer OD_{600} von ~ 1 wurden Aliquote angelegt, indem jeweils 500 μ L Kultur mit 500 μ L sterilem Glycerin (99 % (w/v)) gemischt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert wurden.

2.9.3 Kultivierung von *E. coli* im Schüttelkolben

Die Produktion der Zielproteine im 500 mL - Schüttelkolbenmaßstab wurde an eine literaturbeschriebene Vorgehensweise angelehnt [Gerber *et al.*, 2008]. Die Zusammensetzungen der Medien für Vor- und Hauptkulturen sind in Abschnitt 2.4 beschrieben. Zur Verfolgung des Wachstums der Kulturen wurde in regelmäßigen Zeitabständen Probe entnommen und nach geeigneter Verdünnung die optische Dichte (OD_{600}) bestimmt. Als Referenz diente das jeweils verwendete, zellfreie Medium. Ausgangspunkt der Kultivierung waren die bei -80 °C gelagerten Kryokulturen der einzelnen Produktionsstämme. Zur Selektion plasmidhaltiger Zellen wurden diese zunächst auf LB_{Amp} -Agar-Medium ausplattiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Einzelkolonien wurden jeweils in 50 mL LB_{Amp} überführt und bei 37 °C für weitere 16 h kultiviert (110 rpm, Infors). Mit den Zellen der Vorkultur wurde die Hauptkultur (500 mL PM_{Amp} Medium im 2 L-Schikane-Schüttelkolben) angeimpft. Die Start- OD_{600} wurde auf 0,1 eingestellt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 80 rpm. Bei einer OD_{600} von 0,5 wurde die Zielproteinproduktion durch Zugabe des Induktors IPTG (Zielkonzentration 1 mM) gestartet. Im Fall der Produktion von LipA wurde die Inkubationstemperatur vor Induktion auf 34 °C abgesenkt. Zur Verfolgung der Produktbildung wurden stündlich 1/OD-Proben angelegt. Das dafür benötigte Probenvolumen wurde nach der Messung der OD_{600} nach Gl. 9 berechnet:

$$V_{\text{Probe}} [\mu\text{L}] = \frac{1}{OD} 1000 \quad (\text{Gl. 9})$$

Die 1/OD-Proben wurden 5 min bei $16.100 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das resultierende Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor der Analyse der Proben mittels SDS-PAGE wurden diese in 100 μL Probenpuffer (PP, Abschnitt 2.8.5) resuspendiert und 5 min bei 99 °C inkubiert.

Nach einer Induktionsphase von 6 h erfolgte die Ernte der Hauptkultur mittels Zentrifugation bei $4.000 \times g$ und 4 °C für 10 min. Die erhaltene Biofeuchtmasse (BFM) wurde bei -20 °C gelagert.

2.9.4 Biotrockenmassebestimmung

Die zur Bestimmung der Korrelation zwischen Biotrockenmasse (BTM) und optischer Dichte verwendeten 2 mL-Reaktionsgefäße wurden zunächst bei 80 °C für 16 h im Trockenschrank inkubiert, anschließend im Exsikkator (Trockenmittel: Silica Gel) abgekühlt und das Leergewicht gemessen. Zu ausgewählten Zeitpunkten der Fermentation wurde je 1 mL Bakteriensuspension in die vorgetrockneten Gefäße (Dreifachbestimmung) überführt, 2 min bei $16.100 \times g$ zentrifugiert und die erhaltenen Pellets zweimal mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend folgten eine Trocknung bei 80 °C über 22 h, eine Abkühlphase im Exsikkator (Silica) über 18 h und das Auswiegen der Zellpellets. Der Zusammenhang zwischen BTM-Konzentration und optischer Dichte der verschiedenen Produktionsstämme ist in Abbildung 8-7 dargestellt.

2.9.5 Kultivierung von *E. coli* im Bioreaktor

Die Kultivierungen zur Lipase-Produktion wurden im Fermentationssystem Biostat® C (12 L Startvolumen) bzw. Biostat® Dplus 75L (36 L Startvolumen) durchgeführt. Die Prozesssteuerung erfolgte über das Software-Paket MFCS/win 3.0.

Das Kultivierungsmedium setzte sich wie in Abschnitt 2.4 beschrieben zusammen. Die Vorkultur wurde folgendermaßen hergestellt: Ausgehend von Kryokulturen (Abschnitt 2.9.2) wurden LB_{AMP}-Agar-Platten beimpft und 20 h bei 37 °C inkubiert. Erhaltene Einzelkolonien wurden in 50 mL LB_{AMP}-Medium überführt und 14 h bei 37 °C geschüttelt (110 rpm, Infors). Anschließend wurde auf 100 mL LB_{AMP}-Medium überimpft (Start-OD_{600nm} = 0,1) und für weitere 11 h bei 37 °C und 110 rpm inkubiert. Im nächsten Schritt folgte ein Überimpfen auf zweimal 500 mL PM_{AMP}-Medium (für 12 L *fed batch*) bzw. sechsmal 500 mL PM_{AMP}-Medium (für 36 L *fed batch*) mit einer Start-OD_{600nm} von 0,1 und einer Inkubation bei 30 °C und 80 rpm für 10 h. Die Schüttelkolbenkulturen wurden steril vereinigt und direkt zur Inokulation der Hauptkultur eingesetzt.

Während der Kultivierung wurde der Fermenter auf 37 °C temperiert und der pH-Wert durch automatische Korrekturmittelzugabe (100 g/L NaOH bzw. 20 % (v/v) H₃PO₄) konstant bei 7 gehalten. Der Prozessdruck im Bioreaktor betrug 0,4 bar_ü. Der Sollwert der Gelöstsauerstoffkonzentration (pO₂ = 25 %) wurde in einer Kaskade über die Rührerdrehzahl und die Begasungsrate (Druckluft) geregelt. Der Verbrauch des Start-Glycerins wurde durch ein sprunghaftes Ansteigen des pO₂-Wertes angezeigt (nach ca. 4,5 h), woraufhin mit der Zufütterung begonnen wurde. Während der *feed*-Phase wurde mit einer konstanten Rate von 180 g/h (bei 12 L-Startvolumen) bzw. 540 g/h (36 L-Startvolumen) *feed*-Lösung zudosiert. Zur Reduzierung der Schaumbildung wurde bei Bedarf Antischaummittellösung (20 % (w/v) Struktol J673) zugegeben. Die Induktion der Produktbildung erfolgte nach 6 h durch die Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM. Im Fall der Produktion von LipA wurde die Inkubationstemperatur vor Induktion auf 34 °C abgesenkt. Die Induktionsphase zur Lipase-Produktion verlief über 6 h (LipA: 4 h). Die Zellernte erfolgte mittels Röhrenzentrifuge (CEPA Z41G bzw. Z61G; Padberg) bei 17.000 x g. Die erhaltene Biofeuchtmasse wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.9.6 Zellaufschluss

2.9.6.1 Hochdruckhomogenisation

Für den Zellaufschluss im kleinen Maßstab (z.B. Aufarbeitung von BFM aus Schüttelkolbenkultivierung) wurde der Hochdruckhomogenisator (HDH) EmulsiFlex-C5 der Firma Avestin verwendet. Hierzu wurden ca. 3 g BFM in 50 mL Aufschlusspuffer (Tabelle 2-3) aufgetaut und mittels Stabrührer bei 5.000 rpm (Micra R-T D-1) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte in vier Passagen bei einem Druck von 1.000 bar. Die Zellsuspension und der HDH wurden während des Prozesses im Eisbad gekühlt. Im Anschluss wurde zur Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile für 40 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt, RE) wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Der Zellaufschluss größerer Mengen BFM wurde unter Verwendung des HDH APV-2000 (APV Products, Dänemark) durchgeführt. Hierfür wurden 60 g BFM mit 240 mL Aufschlusspuffer wie oben beschrieben aufgetaut und resuspendiert. Zur Reduzierung der

Viskosität infolge der Freisetzung von DNA wurde Benzonase (100 U pro Gramm BFM) zugesetzt. Die Zellen wurden in drei Passagen bei jeweils 1.000 bar aufgeschlossen. Die erhaltene Suspension wurde zwischen den Passagen auf Eis gekühlt und nach dem letzten Durchgang bei 17.000 x g und 4 °C für 40 min zentrifugiert. Der so erhaltene RE stellte das Ausgangsmaterial für die sich anschließende Reinigung der Lipase dar.

Für Untersuchungen zu Löslichkeitsverhalten und Verteilung des Zielproteins wurden SDS-PAGE-Proben von der Zellsuspension vor HDH-Aufschluss (Gesamtzellprotein; G), vom Überstand nach Zentrifugation (RE) und vom erhaltenen Pellet (unlösliches Zellprotein; U) angelegt. Für die Fraktionen „G“ und „RE“ wurden jeweils 50 µL Probe mit 50 µL PP versetzt und für 5 min bei 99 °C inkubiert. Zum Anlegen der Pellet-Probe „U“ wurde zunächst das Volumen des Überstandes nach Zentrifugation bestimmt und anschließend das erhaltene Pellet im gleichen Volumen Aufschlusspuffer resuspendiert. Hiervon wurden 50 µL entnommen und wie oben beschrieben behandelt.

2.9.6.2 Enzymatischer Zellaufschluss mittels Lysozym

Die angelegten 1/OD-Proben (Abschnitt 2.9.3) wurden nach Lagerung bei -20 °C auf Eis aufgetaut (30 min), in 130 µL Lysepuffer resuspendiert und anschließend 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 16.100 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und nach entsprechender Verdünnung zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt (Abschnitt 2.8.2.1).

2.9.7 Lipase-Reinigung über His₆-tag

Die Aufarbeitung der Lipasen erfolgte mit *Streamline Chelating* (GE Healthcare). Dabei handelt es sich um quervernetzte Agarose-Partikel (6 %) mit Quartz-Kern [GE-Healthcare, 2013]. Als Ligand diente Iminodiessigsäure (IDA). Die Beladung des Materials mit Ni²⁺-Ionen erfolgte nach Herstellerangaben. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 2-3 aufgeführt.

2.9.7.1 Säulenchromatographie

Die initialen Reinigungsversuche wurden mit einem automatisierten Chromatographie-System (Äkta Explorer; GE Healthcare) durchgeführt. Die Steuerung und Datenaufzeichnung erfolgten mit der Software Unicorn 4.1. Die verwendete Säule XK 26/20 enthielt 65 mL Säulenmaterial (Ni²⁺-*Streamline Chelating*) und wurde in 20 % (v/v) Ethanol gelagert. Vor Verwendung der Säule erfolgte ein Spüldurchgang mit drei Säulenvolumina (CV) dH₂O sowie die Äquilibrierung mit vier CV Bindepuffer. Zur Vermeidung unspezifischer Proteinbindung an die Säulenmatrix wurde dem RE Elutionspuffer im Verhältnis 1:25 zugesetzt, um die gleiche Imidazolkonzentration wie im Bindepuffer (20 mM Imidazol) einzustellen. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit weiteren drei CV Bindepuffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Elution über einen Stufengradienten (200 mL Elutionspuffer). Die Flussrate betrug bei allen Schritten 8 mL/min. Während des gesamten Prozesses wurde das Absorptionssignal bei 280 nm aufgezeichnet.

2.9.7.2 Batch-Adsorption

Die Affinitätsreinigung der Lipasen erfolgte mit suspendiertem Chromatographiematerial unter Nutzung von verschließbaren Schraubgefäßen (50 bzw. 370 mL) auf einem Rollermixer bei 23 °C (RT). Für die Reinigung wurde je Gramm zum Aufschluss eingesetzter Biofeuchtmasse 1 mL Ni²⁺ - *Streamline Chelating* (Ni²⁺-SC) verwendet. Zur Vorbereitung wurde die entsprechende Menge des in 20 % (v/v) EtOH gelagerten Chromatographie-Materials dreimal mit dem 5-fachen Volumen dH₂O gewaschen und anschließend dreimal mit dem 5-fachen Volumen Bindepuffer äquilibriert. Die Abtrennung der verschiedenen Lösungen vom Trägermaterial erfolgte durch Schwerkraft-Sedimentation und Dekantieren bzw. Absaugen mittels Pipette. Zur Vermeidung unspezifischer Proteinbindung an das Material wurde dem RE Elutionspuffer im Verhältnis 1:25 zugesetzt, um die gleiche Imidazolkonzentration wie im Bindepuffer (20 mM Imidazol) einzustellen. Der RE wurde für 30 min auf dem Rollermixer mit dem Trägermaterial inkubiert, anschließend der Überstand („Durchlauf“) entfernt und dreimal mit dem 5-fachen Volumen Bindepuffer für je 10 min gewaschen. Die Elution erfolgte in drei Durchgängen durch Inkubieren des Materials mit dem Doppelten Volumen Elutionspuffer für je 10 min.

Vor Bestimmung der Lipase-Aktivität (Abschnitt 2.8.2.1) und der Proteinkonzentration (Abschnitt 2.8.1) wurden die jeweiligen Proben für 2 min bei 16.100 x g zentrifugiert. Zur Überprüfung des Reinigungserfolges wurden Proben für die SDS-PAGE-Analyse angelegt. Die jeweilige Verdünnung ist im Ergebnisteil angegeben. In Abhängigkeit der eluierbaren Aktivität wurden die Elutionsfraktionen E1 – E2 bzw. E3 vereinigt und nach Abschnitt 2.9.8 dialysiert.

2.9.8 Dialyse und Lagerung

Zur Entfernung des zur Reinigung eingesetzten Imidazols wurden die vereinigten Elutionsfraktionen dialysiert. Die Zusammensetzung des Dialysepuffers ist in Tabelle 2-3 aufgeführt. Es kamen je nach Molekulargewicht des Zielproteins folgende Dialyseschläuche zum Einsatz: Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO 15.000 und MWCO 25.000. Zur Vorbereitung des Dialyseschlauchs und zur Entfernung der Natriumazid-haltigen Lagerlösung wurde dieser mehrmals mit dH₂O gespült. Die Dialyse erfolgte bei 4 °C unter Rühren. Die Proteinproben wurden zweimal für je 1,5 h gegen jeweils 2 L Puffer dialysiert. Nach Entfernung der Probe aus dem Dialyseschlauch wurde die Enzymlösung für 10 min bei 3220 x g zentrifugiert, der Überstand mit Glycerin versetzt (50 % v/v) und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

2.9.9 Produktion der mikrobiellen Transglutaminase

Zur enzymatischen Immobilisierung der Lipasen wurde die rekombinant gewonnene Punktmutante S2P der mikrobiellen Transglutaminase (MTG) aus *Streptomyces mobaraensis* genutzt [Marx *et al.*, 2008]. Die Produktion sowie die Reinigung der rekombinanten Transglutaminase-Variante wurde nach Sommer *et al.* durchgeführt [Sommer *et al.*, 2010; Sommer *et al.*, 2012].

Das in Aliquots bei -80 °C gelagerte MTG-Präzipitat wurde vor Verwendung je nach Versuchsziel mit Puffer MKP (50 mM Tris / HCl, pH 8, 300 mM NaCl) beziehungsweise mit Puffer MWP (50 mM Tris / HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 0,5 % (w/v) Triton X-100) resolubilisiert. Der jeweils verwendete Puffer ist im entsprechenden Ergebnisteil angegeben. Nach Zentrifugation der Lösung bei 16.100 x g für 2 min wurde die MTG-Aktivität des Überstands mittels Hydroxamattest (Abschnitt 2.8.2.3) bestimmt.

2.9.10 Nachweis MTG-reaktiver Glutaminreste

Zum Nachweis reaktiver Glutaminreste innerhalb der Zielproteine, die durch den Einsatz der MTG modifiziert werden können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Monodansylcadaverin (MDC) verwendet.

Die Konzentrationen der Komponenten im Reaktionsansatz können Tabelle 2-16 entnommen werden. Die Verdünnung des jeweiligen gereinigten Lipase-Präparates auf 0,1 mg/mL erfolgte mit 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8. Zur Resolubilisierung des gelagerten MTG-Präzipitates wurde Puffer MKP (Abschnitt 2.9.9) verwendet. Der Farbstoff MDC wurde in 0,1 M Essigsäure gelöst. Die Lipase-Lösung wurde mit MDC gemischt, 3 min bei 37 °C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 5 µL MTG-Lösung (1 U_{MTG}) gestartet. Als Kontrolle diente ein Ansatz, in dem MTG durch 5 µL Puffer (50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8) ersetzt wurde. Ebenso wurde eine Kontrolle mit den Komponenten MTG und MDC sowie Puffer (anstatt Lipase-Lösung) angelegt.

Während der einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden periodisch jeweils 25 µL Probe entnommen und mit 25 µL SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt. Die Probenvorbereitung und Durchführung der SDS-PAGE erfolgten nach Abschnitt 2.8.5. Zur Visualisierung der kovalenten Verknüpfung der Zielproteine mit MDC wurde ein UV-Transilluminator (GenoSmart M; VWR) bei 312 nm genutzt. Anschließend wurden die Gele der Coomassie-Färbung unterzogen.

Tabelle 2-16: Reaktionsansätze zum Nachweis reaktiver Glutaminreste.

Komponente	Volumen [µL]	Konzentration im Ansatz
Lipase	975	0,1 mg/mL
MDC	20	0,5 mM
MTG	5	1 U _{MTG} /mL

2.9.11 Nachweis MTG-reaktiver Aminogruppen

Der Nachweis trägergebundener Aminogruppen, die sich für eine MTG-katalysierte Kopplung des Zielproteins eignen, erfolgte analog zum Nachweis proteinogener Glutaminsubstrate. Das potentielle Trägermaterial wurde mit MTG und dem fluoreszenzmarkierten Tripeptid Dansyl-WQR versetzt und die Kopplung des Farbstoffes an den Träger mittels UV-Transilluminator detektiert.

Zur Vorbereitung wurde das in 20 % (v/v) EtOH gelagerte Trägermaterial EAH-Sepharose 4B (GE Healthcare; Abschnitt 2.6) mit Hilfe einer Glasfritte (POR 4) und Wasserstrahlpumpe filtriert und nach Herstellerangaben mehrfach mit dH₂O gewaschen. Anschließend wurden je 50 mg des feuchten Materials in 2 mL-Reaktionsgefäße überführt. Die Lösung des Farbstoffes Dansyl-WQR (Molekulargewicht: 721,83 g/mol) erfolgte in 0,1 M Essigsäure. Zur Resolubilisierung des gelagerten MTG-Präzipitates wurde Puffer MKP (Abschnitt 2.9.9) verwendet.

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und Kontrollen ist in Tabelle 2-17 aufgeführt. Alle Ansätze wurden nach Mischen für 1 h bei 37 °C und 800 rpm (Thermomixer, Eppendorf) inkubiert und für 3 min bei 16.100 x g zentrifugiert. Anschließend wurde fünfmal mit je 1 mL Puffer gewaschen. Hierfür wurden die Ansätze mit Puffer versetzt, 10 min bei 800 rpm geschüttelt und 3 min bei 16.100 x g zentrifugiert. Nach Abtrennung der Waschlösung des letzten Waschschruttes erfolgte die Detektion der Farbstoff-Kopplung mittels UV-Transilluminator bei 312 nm.

Tabelle 2-17: Reaktionsansätze zum Nachweis reaktiver, trägergebundener Aminogruppen.

Komponente	Kontrolle 1 MTG	Kontrolle 2 EAH-Sepharose	Kontrolle 3 Adsorption	Reaktionsansatz
EAH-Sepharose	-	50 mg	50 mg	50 mg
Dansyl-WQR (20 mM)	125 µL	-	125 µL	125 µL
MTG (135 U _{MTG} /mL)	74 µL	-	-	74 µL
Puffer MKP	301 µL	500 µL	375 µL	301 µL

2.9.12 Lipase-Immobilisierung mittels MTG

Die Untersuchung der MTG-katalysierten Immobilisierung von Lipasen erfolgte unter Verwendung des Trägermaterials EAH-Sepharose 4B (Abschnitt 2.6). Zur Vorbereitung wurde die benötigte Menge des in 20 % (v/v) EtOH gelagerten Trägermaterials mit Hilfe einer Glasfritte (POR 4) filtriert, dreimal mit je 15 mL dH₂O gewaschen sowie mit 15 mL Puffer MKP (Abschnitt 2.3) äquilibriert. Nach Absaugung des Puffers wurden je 100 mg des Materials in 2 mL-Reaktionsgefäße überführt. Im Vorfeld der Kopplung wurde die jeweils nach Abschnitt 2.9.8 hergestellte Lipase-Variante mit Puffer MKP verdünnt (Zielkonzentration 1,5 U_C/mL). Die Kopplungsreaktion wurde durch Mischen des Trägermaterials mit 1,5 U_C Lipase und 0,5 U MTG gestartet. Als Kontrollen dienten Ansätze, die nur Träger und Lipase (Kontrolle „Adsorption“) bzw. nur Lipase und MTG (Kontrolle „Stabilität“) enthielten. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37 °C und 800 rpm (Thermomixer) wurden die Ansätze für 3 min bei 16.100 x g zentrifugiert und die Lipase-Restaktivität im Überstand nach Abschnitt 2.8.2.2 bestimmt. Zur Entfernung nicht kovalent gebundener Lipase wurde das Trägermaterial mit Puffer MWP (Abschnitt 2.3) gewaschen. Insgesamt wurden vier Waschzyklen durchgeführt. Die Bestimmung der trägergebundenen Lipase-Aktivität erfolgte nach Abschnitt 2.8.2.2. Soweit nicht anders angegeben fand eine Dreifachbestimmung statt. Abweichungen in der Durchführung sind im jeweiligen Ergebnisteil angegeben.

2.9.13 Nachweis der Proteinmodifikation mittels ESI-MS

Die Analyse der Lipase-Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Heinz (AG Biopharmazie, MLU Halle). Zur Vorbereitung wurden die Proben aufkonzentriert (Concentrator 5301; Eppendorf), anschließend Trypsin (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) im Verhältnis 1:20 zugesetzt und über 4 h bei 37 °C inkubiert. Die verdauten Proben wurden unter Verwendung von ZipTip-Pipettenspitzen (C18, MerckMillipore) nach Herstellerangaben entsalzt. Die MS-Analyse wurde mit einem Ultimate 3000 nanoHPLC System (Dionex, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Details zur NanoHPLC-nanoESI-qTOF-Messung können Heinz *et al.* entnommen werden [Heinz *et al.*, 2010]. Abweichend dazu wurde im Massenspektrometer eine Kapillarspannung von 2000 V eingestellt und die Peptide nach kollisionsinduzierter Dissoziation mittels datenabhängiger Erfassung ausgewählt.

2.9.14 Recycling von Lipase-Immobilisat

Zur Untersuchung der Wiederverwendbarkeit der mittels MTG gekoppelten Lipase wurde das Immobilisat zunächst mit Puffer MWP II (Abschnitt 2.3) und anschließend mit Assay-Puffer („Lösung B“ Abschnitt 2.8.2.2) gewaschen. Hierzu wurde das Immobilisat mit 1,5 mL Puffer versetzt, 10 min bei 900 rpm und 25 °C inkubiert und der Überstand entfernt. Dieser Vorgang wurde mit Wasch- und Assay-Puffer jeweils dreimal durchgeführt. Anschließend wurden 30 mg Immobilisat im *p*NPP-Assay eingesetzt (Abschnitt 2.8.2.2). Nach Abtrennung des Immobilisats mittels CME-Filter wurde der Überstand photometrisch bei 405 nm vermessen. Zur Rückgewinnung des Immobilisats wurde der CME-Filter in entgegengesetzter Richtung mit 10 mL Waschpuffer ohne Triton X-100 (50 mM Tris/HCl, pH 8, 0,5 M NaCl) gespült und das Trägermaterial auf einer POR4-Glasfritte aufgefangen. Durch Waschen des Immobilisats mit weiteren 40 mL des Waschpuffers ohne Triton X-100 wurden die Reaktionslösung und verbliebene *p*NP-Reste entfernt. Nach Spülen mit 1 mL MWP (Abschnitt 2.3) und Absaugen der Flüssigkeit konnte das Immobilisat für den nächsten Zyklus eingewogen werden.

2.9.15 Lipase-Kopplung an funktionalisierte Glasobjektträger

Vor der Durchführung der Kopplung an maleinimidfunktionalisierte Glasobjektträger (#MAL_02; „high density“; μ Surfaces Inc., Englewood, USA) wurden die gereinigten Lipase-Varianten (Konzentration > 1 U₀/mL) zur Reduktion intermolekularer Disulfidbrücken mit DTT-haltigem Reduktionspuffer (Tabelle 2-3) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde zur Entfernung von DTT mittels Gelchromatographiesäule PD-10 (GE Healthcare) gemäß Herstellerangaben ein Pufferwechsel auf Puffer CKP (Tabelle 2-3) durchgeführt. Um während der Kopplung eine messbare Aktivitätsabnahme in der Lösung zu erhalten, wurde ein weiterer Verdünnungsschritt mit Puffer CKP auf 0,1 U₀/mL durchgeführt.

Die Kopplungsversuche erfolgten in speziell angefertigten Inkubationskammern für Glasobjektträger (Abschnitt 2.7), die auf einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) installiert werden konnten. Alle Kammern wurde vor Versuchsbeginn zunächst mit 4 M NaOH (10 mL bei 300 rpm) für 10 min gereinigt und anschließend mit dreimal 10 mL dH₂O gewaschen.

MAL-Objekträger, die zur Untersuchung der Kopplung eingesetzt werden sollten, wurden vor Verwendung mit zweimal 9 mL Puffer CKP bei 350 rpm für 5 min gewaschen. Zur Untersuchung der unspezifischen Proteinadsorption wurden MAL-Objekträger mit 5 mL Blockpuffer (Abschnitt 2.3) für 30 min bei 350 rpm inkubiert. Daran anschließend wurden die geblockten Träger mit dreimal 9 mL Puffer CKP bei 350 rpm für 5 min gewaschen.

Bei den Kopplungs- und Adsorptionsversuchen wurden pro Objekträger 3 mL Lipase-Lösung (0,1 U_C/mL) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C und 350 rpm. Zur Verfolgung des Kopplungsfortschrittes wurden periodisch Proben der Enzymlösung entnommen und mittels pNPP-Assay vermessen. Nach 2 h wurde der Vorgang durch Entnahme der Lipase-Lösung abgebrochen und die Objekträger mit dreimal 5 mL Puffer CWP für 15 min gewaschen. Die Durchführung der Aktivitätsmessung auf dem Träger ist in Abschnitt 2.8.2.2 beschrieben.

2.9.16 Bestimmung der Thermostabilität der Cys-Varianten

Vor Untersuchung der Thermostabilität der auf MAL-Objekträger immobilisierten Lipasen (Einfachmutante LipT1-S333C, Dreifachmutante LipT1-SXC) wurde zunächst deren Aktivität nach Lagerung (14 d, bei 4 °C in Puffer CWP) bestimmt. Daraufhin wurden die Objekträger dreimal mit 5 mL 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 gewaschen. Die Hitzeinkubation der Träger erfolgte in 50 mL Reaktionsgefäßen, gefüllt 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7, im Wasserbad bei 60 °C für 30 min [Godoy *et al.*, 2011b]. Anschließend wurde die Restaktivität gegenüber pNPP ermittelt.

Zur Bestimmung der Restaktivität der löslichen Lipasen LipT1-S333C und LipT1-SXC wurden die Enzympräparate jeweils mit 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 auf 1,4 U_C/mL (500 µL) verdünnt, 30 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend erneut die Aktivität gegenüber pNPP gemessen.

2.9.17 Modifikation löslicher Lipasen mit Glutaraldehyd

Zur Durchführung der Modifikation wurde 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 bzw. 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10 mit jeweils 1 % (v/v) Triton X-100 und 500 mM NaCl verwendet. Vor der Reaktion wurde die gereinigte Lipase-Variante mit entsprechendem Puffer auf 2 U_C/mL verdünnt. Die Verdünnung der Glutaraldehydlösung (GA) erfolgte in sechs Stufen (jeweils 1:10) unter Verwendung des gleichen Puffers. Die verschiedenen Konzentrationen sind in Tabelle 2-18 aufgeführt. Zum Start der Reaktion wurden 995 µL Enzymlösung mit 5 µL der jeweiligen GA-Verdünnungsstufe gemischt und bei 25 °C und 550 rpm im Thermomixer inkubiert.

In manchen Fällen wurde im Anschluss an die Modifikation der Lipasen mit GA eine Reduktion der gebildeten Schiff'schen Basen mittels NaCNBH₄ durchgeführt [Bartolini *et al.*, 2004]. Hierfür wurde durch Zugabe von 0,5 M NaCNBH₄ (in 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer, pH 10) eine Zielkonzentration von 0,1 M eingestellt und für eine weitere Stunde bei 25 °C und 550 rpm inkubiert.

Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung der Aktivität gegenüber pNPP und zur Analyse mittels SDS-PAGE entnommen. Zusätzliche vorgenommene Änderungen des Versuchsablaufs sind im entsprechenden Ergebnisteil angegeben.

Tabelle 2-18: Übersicht der eingesetzten GA-Konzentration zur Lipase-Modifikation.

Molares Verhältnis NH ₂ -Gruppen : GA	GA-Konzentration im Ansatz [μ M]
„Kontrolle“	0
100 : 1	0,03
10 : 1	0,27
1 : 1	2,70
1 : 10	27,0
1 : 100	270

2.9.18 Immobilisierung auf GA-aktivierte Träger

Die Trägeraktivierung mit GA wurde nach Betancor *et al.* durchgeführt [Betancor *et al.*, 2006]. Alle Inkubationsschritte erfolgten in verschließbaren Reaktionsgefäßen auf einem Rollermixer bei 25 °C. Zunächst wurden 5 g des jeweiligen Trägermaterials dreimal mit je 20 mL dH₂O für 10 min gewaschen. Anschließend folgte die Äquilibration mit zweimal 20 mL 200 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 für je 5 min. Die Flüssigkeit wurde durch Unterdruck-Filtration mithilfe einer Glasfritte POR3 abgetrennt. Zur Aktivierung wurden 10 mL 15 % (v/v) GA in 200 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 zugegeben. Der Ansatz wurde für 15 h bei 25 °C inkubiert und anschließend mit 20 mL 200 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 sowie zweimal 20 mL dH₂O gewaschen. Das aktivierte Trägermaterial wurde nach Entfernung der Waschlösung ohne Lagerung direkt zur Kopplung eingesetzt.

Die Kopplung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 mit 500 mM NaCl und 1 % (v/v) Triton X-100. Es wurden jeweils 10 mL Lipase-Lösung (2,5 U_C/mL) mit 0,5 g, 1,5 g sowie 2,5 g des GA-aktivierten CPG (bei Lewatit VPOC 1065: 5 g) gemischt und für 6 h bei 25 °C mittels Rollermixer inkubiert. Zur Verfolgung des Kopplungsverlaufs wurden regelmäßig Proben entnommen, für 2 min bei 16.100 x g zentrifugiert und anschließend die Lipase-Aktivität im Überstand bestimmt. Nach Abschluss der Kopplung wurden die Immobilisate zunächst dreimal mit je 5 mL Puffer (s.o.) sowie dreimal mit 10 mL dH₂O gewaschen, die Flüssigkeit mittels Glasfritte abgetrennt und im Anschluss die Aktivität gegenüber pNPP gemessen. Die Lagerung erfolgte in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 bei 4 °C.

2.9.19 Immobilisierung auf oxiranaktivierte Träger

Für die Lipase-Immobilisierung über Oxirangruppen wurde das Trägermaterial Sepabeads EC-EP/S verwendet (Abschnitt 2.6). Die Durchführung erfolgte nach Mateo *et al.* mit Anpassung der Beladung [Mateo *et al.*, 2000b; Mateo *et al.*, 2002]. Zunächst wurde das Material mit dH₂O gewaschen. Nach Filtration über eine POR3-Glasfritte wurden 2,5 g des Trägers mit 15 U_C (in 1 M Na-Phosphatpuffer pH 7 oder 0,5 M Phosphatpuffer pH 7 mit 1 % (v/v) Triton X-100) für 24 h bei 22 °C auf einem Rollermixer inkubiert. Um den Kopplungsverlauf zu verfolgen, wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, 2 min bei 16.100 x g zentrifugiert und die Aktivität gegenüber pNPP vermessen. Nach Abschluss der Kopplung wurden folgende Waschschriffe durchgeführt: dreimal 10 mL 50 mM

Na-Phosphatpuffer pH 7 mit 1 M NaCl; dreimal 10 mL 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 und dreimal 10 mL dH₂O. Anschließend wurde die Flüssigkeit über eine POR3-Glasfritte entfernt und die gekoppelte Aktivität gegenüber pNPP bestimmt. In manchen Fällen wurden nach der Kopplung Stabilisierungs- und Blockschritte angeschlossen [Mateo *et al.*, 2002; Mateo *et al.*, 2003]. Zur Stabilisierung wurde das Immobilisat mit 0,1 M Na-Phosphatlösung pH 10 für 23 h bei 22 °C inkubiert. Das nachfolgende Blocken erfolgte entweder mit 3 M Glycin pH 8,5 oder mit 5 % (v/v) β-ME pH 7,8.

2.9.20 Immobilisierung mittels His₆-tag

Zur Immobilisierung über Histidinreste wurde als Träger *Streamline chelating* eingesetzt (Abschnitt 2.6). Die Beladung des Materials mit Ni²⁺-Ionen erfolgte mit 0,1 M NiSO₄ nach Herstellerangaben („Ni²⁺-SC“). Vor der Kopplung wurde das Material zunächst mehrfach mit dH₂O und Puffer KP I (50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,5 M NaCl) gewaschen. Anschließend wurde der Überstand über eine Glasfritte (POR 3) mittels Unterdruck abgetrennt. Die Lipase LipT1-WT wurde mit Puffer KP I auf die benötigte Zielkonzentration verdünnt. Die verwendeten Verhältnisse von Lipase-Menge zu Trägermaterial sind im entsprechenden Ergebnisteil angegeben. Zur Kopplung wurde das eingewogene Trägermaterial (i.d.R. 0,5 g) mit 10 mL Enzymlösung gemischt und für 1 h bei 25 °C auf einem Rollermixer inkubiert. Anschließend wurde die Restaktivität im Überstand mittels pNPP-Test bestimmt. Nach Abschluss der Kopplung wurde die Flüssigkeit erneut über eine Glasfritte (POR 3) abgetrennt und das Immobilisat jeweils dreimal mit 10 mL Puffer KP I sowie dreimal mit 10 mL 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 (je 10 min; Rollermixer) gewaschen. Die Bestimmung der Aktivität auf dem Träger erfolgte wie in Abschnitt 2.8.2.2 beschrieben. Zur Elution des gekoppelten Zielenzyms wurden 0,4 g des Immobilisats fünfmal mit je 10 mL Elutionspuffer II über 20 min inkubiert (Rollermixer).

Im Fall der Kopplung GA-modifizierter Lipase wurde die Behandlung mit GA und die Reduktion mit NaBH₃CN nach Abschnitt 2.9.17 durchgeführt. Die Startaktivität wurde an die benötigte Trägerbeladung angepasst (Abschnitt 3.2.5.2). Vor der Kopplung wurde zur Entfernung von überschüssigem GA / NaBH₃CN ein Pufferwechsel auf Puffer KP I mittels Gelfiltration (PD-10; GE Healthcare) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.9.21 Recycling His₆-tag gekoppelter Lipase

Nach Durchführung der Kopplung (Abschnitt 2.9.20) wurde das Immobilisat zunächst mit Puffer KP I und anschließend mit Assay-Puffer („Lösung B“ Abschnitt 2.8.2.2) gewaschen. Das Immobilisat wurde mit 1,5 mL Puffer versetzt, 10 min bei 900 rpm und 25 °C inkubiert und der Überstand entfernt. Dieser Vorgang wurde mit Wasch- und Assay-Puffer jeweils dreimal durchgeführt. Anschließend wurden 25 mg Immobilisat im pNPP-Assay eingesetzt (Abschnitt 2.8.2.2). Nach Abtrennung des Immobilisats mittels CME-Filter wurde der Überstand photometrisch bei 405 nm vermessen. Zur Rückgewinnung des Immobilisats wurde der CME-Filter in entgegengesetzter Richtung mit 10 mL 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 mit 0,5 M NaCl gespült und das Trägermaterial auf einer POR3 Glasfritte aufgefangen. Durch Waschen des Immobilisats mit weiteren 40 mL des o.g. Puffers ohne Triton X-100 wurden die Reaktionslösung und verbliebene pNP-Reste entfernt. Nach Spülen mit 1 mL Puffer KP I und Absaugen der Flüssigkeit konnte das Immobilisat für den nächsten Zyklus eingewogen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Produktion der Lipasen LipT1-WT, LipA und LipL1

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit erfolgte ein Screening kommerzieller Lipasen, mit denen langkettige Fettsäurereste aus Triacylglyceriden ungewöhnlicher Pflanzenöle (z.B. Drachekopfl, Krambeöl, Senöl) hydrolysiert, umgeestert und epoxidiert werden können. Die drei identifizierten Lipasen (LipT1 aus *Geobacillus* sp. T1, LipA aus *Bacillus subtilis* 168 und LipL1 aus *Geobacillus stearothermophilus* L1) sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit produziert werden. Ziel war in diesem Zusammenhang die Entwicklung eines skalierbaren Produktionsverfahrens. Dieses Verfahren sollte nachfolgend auf verschiedene Lipase-Varianten übertragen werden, um deren Einsatz für eine zielgerichtete Immobilisierung zu untersuchen.

Die Nukleotidsequenzen der ausgewählten Lipasen wurden mittels Gensynthese erzeugt (DNA 2.0, Inc; USA) und vom Projektpartner zur Verfügung gestellt (Abschnitt 2.5). Die Sequenzen wurden an die *codon usage* des Produktionsorganismus *E. coli* angepasst. Dadurch sollte die Expression der Zielgene verbessert werden, da so eine mögliche Limitierung der Produktbildung aufgrund seltener tRNA-Moleküle in *E. coli* vermieden werden kann [Jana und Deb, 2005]. Die erzeugten Plasmide pJExpress-X mit der jeweiligen Lipase-Sequenz (LipT1-WT, LipA oder LipL1) enthielten neben einer Ampicillin-Resistenz das T5-Promoter-System zur Regulierung der Genexpression [Gentz und Bujard, 1985]. Die Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen sind in Abbildung 8-1 bis Abbildung 8-6 aufgeführt.

Die Transformation der chemisch kompetenten *E. coli* BL21 Gold(DE3) - Zellen mit dem jeweiligen Plasmid ist in Abschnitt 2.9.2 beschrieben. Zur Kultivierung der Zellen wurde ein literaturbeschriebenes Komplexmedium gewählt [Gerber *et al.*, 2008], das neben Hefeextrakt und verschiedenen Nährsalzen Glycerin als eine zusätzliche Kohlenstoffquelle enthielt (Abschnitt 2.4). Die Verwendung des Mediums sollte, im Vergleich zum *E. coli*-Standardmedium LB, eine einfachere Übertragung der Lipase-Produktion vom Schüttelkolben auf den Bioreaktor ermöglichen [Hillger *et al.*, 2005; Gerber *et al.*, 2008; Oschmann, 2008].

Vor Beginn der eigentlichen Kultivierungsversuche waren verschiedene Anpassungen hinsichtlich der verwendeten Komponenten und Konzentrationen notwendig, die im Folgenden aufgeführt sind. Bei der Herstellung des Batch-Mediums nach Angaben von Gerber *et al.* wurde nach Mischen aller Komponenten die Bildung von Präzipitaten beobachtet. Durch Verringerung der $MgSO_4$ -Konzentration von 0,68 g/L auf 0,1 g/L konnte die Präzipitation von Medienbestandteilen verhindert werden. Weiterhin war aufgrund der begrenzten Löslichkeit des verwendeten Hefeextraktes eine Verringerung der Konzentration in der *feed*-Lösung von 300 g/L auf 150 g/L erforderlich. Als Kohlenstoffquelle im Batch-Medium wurde Glycerin eingesetzt.

Die Untersuchungen zur Produktion wurden für die drei Lipasen LipT1-WT, LipA und LipL1 durchgeführt. Im Folgenden wird beispielhaft die Produktion der Lipase LipT1-WT dargestellt.

3.1.1 Untersuchung der Produktion der Lipase LipT1-WT im Schüttelkolbenmaßstab

Zur rekombinanten Produktion der Lipase LipT1-WT wurde der Stamm *E. coli* BL21 Gold(DE3) pJExpress-LipT1-WT verwendet (Abschnitt 2.5). Zunächst sollte im Schüttelkolbenmaßstab untersucht werden, ob unter Verwendung des zuvor in Abschnitt 2.4 beschriebenen PM-Mediums die Kultivierung der Zellen möglich ist und die Expression des Lipasegens erfolgt. Das Anlegen der Vorkultur und die Bedingungen der Hauptkultur einschließlich der Induktion sind in Abschnitt 2.9.3 aufgeführt. Das Wachstum der Zellen wurde durch regelmäßiges Messen der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Zur Untersuchung der Zielproteinbildung wurden zu entsprechenden Zeitpunkten 1/OD-Proben angelegt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Abbildung 3-1 zeigt den Verlauf der Wachstumskurve (A) sowie die SDS-PAGE zur Analyse der Veränderungen des Proteinbandenmusters (B) während der Kultivierung. Nach Animpfen der Hauptkultur zeigte sich eine typische Zunahme der optischen Dichte bei 600 nm. Nach 2 h wurde bei einer OD_{600nm} von 0,5 der Induktor IPTG (Zielkonzentration 1 mM) zugegeben. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer (besonders nach 6 h) verlangsamte sich das Wachstum, was entweder auf eine Substratlimitation oder auf die Belastung der Zellen durch die Zielproteinproduktion zurückgeführt werden könnte (*metabolic burden*).

Anhand der 1/OD-Proben in Abbildung 3-1 B ist zu erkennen, dass die Intensität einer Proteinbande mit einem Molekulargewicht (MW) zwischen 35 und 45 kDa während der Induktionsphase deutlich zunimmt. Da die betreffende Lipase ein theoretisches Molekulargewicht von 44 kDa besitzt, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Bande um das Zielprotein LipT1-WT handelt.

Die Tatsache, dass bereits vor der Zugabe des Induktors eine Bande auf Höhe der Lipase auftritt (Abbildung 3-1 B; Bahn 2), kann entweder durch das Vorhandensein eines *E. coli* eigenen Proteins mit ähnlichem Molekulargewicht oder durch eine Basalexpression des Lipasegens auch ohne Anwesenheit von IPTG erklärt werden.

Die Produktion des Zielproteins nach Zugabe des Induktors wurde über einen Zeitraum von 6 h verfolgt. Anhand des Bandenverlaufs in Abbildung 3-1 B ist zu erkennen, dass eine Verlängerung der Induktionsphase (> 6 h) unter den gewählten Bedingungen vermutlich nicht zu einer nennenswerten Steigerung der Zielproteinausbeute führen würde.

Nach Kultivierungsende konnten aus 500 mL Medium durchschnittlich 3,2 g Biofeuchtmasse (BFM) geerntet werden. Zur Untersuchung, ob die Lipase in einer aktiven Form gebildet wurde, folgte nach der Ernte ein Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisation (HDH; Abschnitt 2.9.6.1). Die unlöslichen Zellbestandteile wurden mittels Zentrifugation abgetrennt. Die im Rohenzymextrakt (RE) enthaltene Lipase-Aktivität (U_T) wurde titrimetrisch bestimmt. Als Substrat diente Olivenöl (Abschnitt 2.8.2.1). Bei der Produktion im Schüttelkolbenmaßstab konnte eine Aktivität der Lipase LipT1-WT von $6,8 \pm 0,6 \cdot 10^4 U_T/L_{\text{Medium}}$ erhalten werden ($n = 4$). Bezogen auf die zum Zellaufschluss eingesetzte BFM ergab sich eine Aktivität von $1,1 \pm 0,1 \cdot 10^4 U_T/g_{\text{BFM}}$. Im Vergleich dazu konnte bei der Negativkontrolle mit Rohextrakt aus *E. coli* BL21 Gold(DE3) ohne das Plasmid pJExpress-LipT1 keine Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass unter den gewählten Wachstums- und Induktionsbedingungen die rekombinante Produktion der Lipase LipT1-WT in aktiver Form möglich ist.

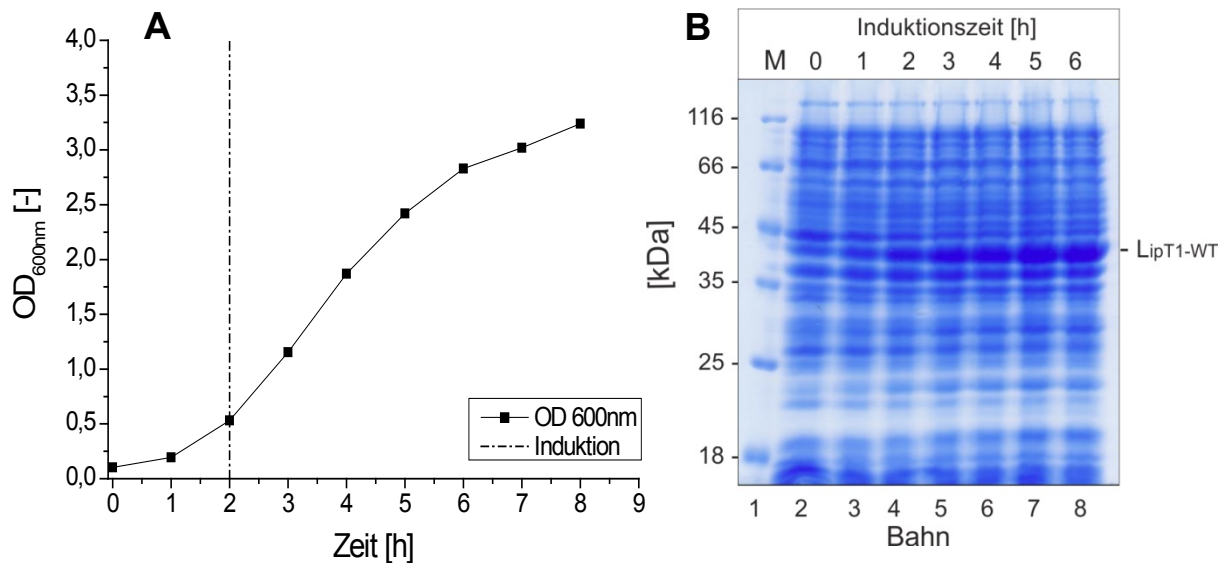


Abbildung 3-1: Wachstumskurve von *E. coli* BL21 Gold(DE3) pJExpress-LipT1-WT (A) und Verlauf der Expression der Lipase LipT1-WT (B). Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 80 rpm in 500 mL PM_{Amp}-Medium ab einer Start-OD von 0,1. Bei einer OD_{600nm} von 0,5 wurde mit 1 mM IPTG induziert. Die optische Dichte der Kultur wurde in entsprechender Verdünnung bei 600 nm gegen einen Blank (PM-Medium) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung. Zur SDS-PAGE-Analyse wurden 1/OD-Proben angelegt. Die Zellpellets wurden in 50 µL Probenpuffer resuspendiert und 5 min bei 99 °C inkubiert. Aufgetragene Volumina: Marker 5 µL; Proben: 10 µL. Bahn 1: Marker; Bahn 2 - 8: 0 - 6 h nach Induktion. Theoretisches MW von LipT1-WT: 44 kDa.

3.1.2 Untersuchung der Lipase-Produktion im Bioreaktor

Nach erfolgreicher Gewinnung von aktiver Lipase im Schüttelkolbenmaßstab wurde das Produktionsverfahren auf den Bioreaktor übertragen. Neben der Vergrößerung des Kultivierungsvolumens bietet die Nutzung eines Bioreaktors weitere Vorteile. So sind u.a. wichtige Prozessgrößen des Verfahrens messtechnisch besser zugänglich und können für den Einsatz entsprechender Regelalgorithmen herangezogen werden. Als Beispiele seien der pH-Wert der Kultur und die Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) genannt. Infolge der gezielten Regelung ausgewählter Prozessparameter können somit, im Vergleich zum Schüttelkolben, für den Produktionsorganismus optimale Wachstumsbedingungen geschaffen werden. Die daraus resultierenden höheren Biomassekonzentrationen lassen sich in Verbindung mit einer geeigneten Substratzuführungsstrategie während der Kultivierung noch zusätzlich steigern [Yee und Blanch, 1992; Lee, 1996].

Die Entwicklung des Fermentationsverfahrens zur Lipase-Produktion mit anschließender Maßstabsvergrößerung erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurde zur Festlegung geeigneter Prozess- und Regelparameter eine Batch-Fermentation im 12 L-Maßstab durchgeführt. Darauf aufbauend erfolgte die Kultivierung des Produktionsstammes im Fed-Batch-Verfahren mit einem Startvolumen (V_0) von 12 L (F12-LipT1). Anschließend wurde der Produktionsmaßstab auf 36 L (V_0) vergrößert (F36-LipT1). Basierend darauf erfolgte ein weiteres Scale-Up auf einen Maßstab von 200 L, das jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war.

Die Bedingungen zur Durchführung der Lipase-Produktion im Bioreaktor sind in Abschnitt 2.9.5 beschrieben. Die Ermittlung einer Korrelation zwischen OD_{600nm} und BTM-Konzentration wurde nach Abschnitt 2.9.4 durchgeführt (Abbildung 8-7). Nachfolgend werden exemplarisch die Ergebnisse der Fermentation im größten Produktionsmaßstab (F36-LipT1) dargestellt und anschließend mit den kleineren Produktionsstufen verglichen.

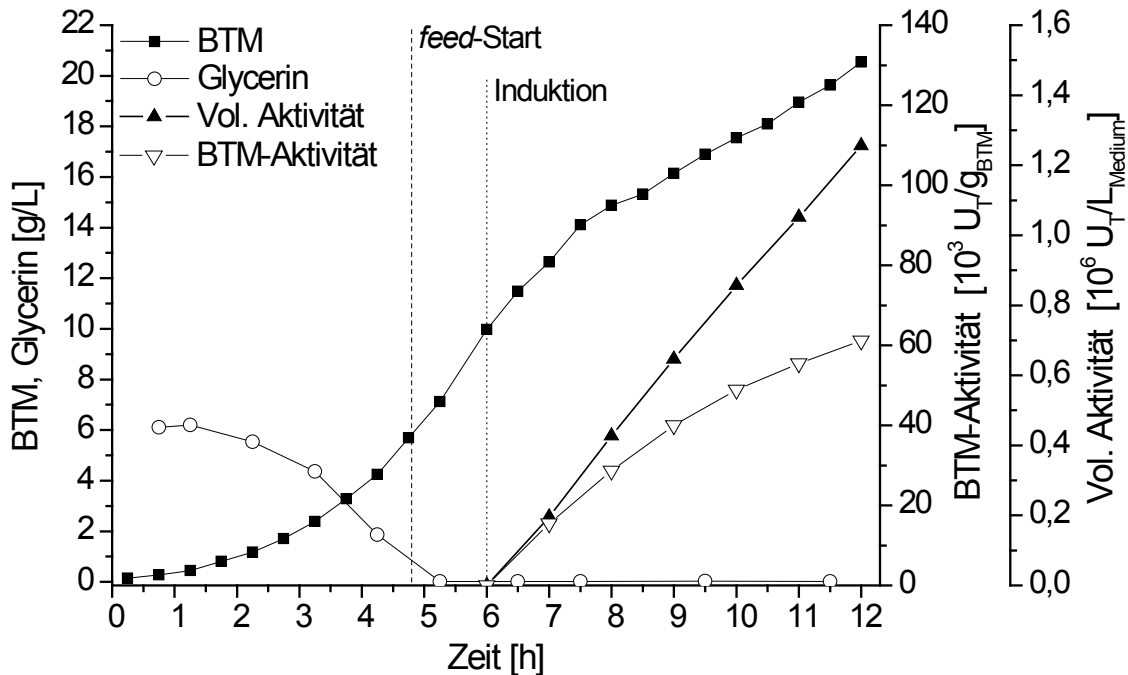


Abbildung 3-2: Fed-Batch-Fermentation (F36-LipT1) zur Produktion der Lipase LipT1-WT in *E. coli* BL21 Gold(DE3) pJExpress-LipT1-WT. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und pH 7 in einem Startvolumen von 36 L PM_{Amp} -Medium. Der pO_2 wurde auf 25 % geregelt. Nach 4,8 h wurde mit einer konstanten Zufütterungsrate von 540 g/h *feed*-Lösung zudosiert. Die Induktion erfolgte nach 6 h mit 1 mM IPTG. Die BTM-Konzentration wurde über die OD_{600nm} ermittelt. Die Bestimmung der Glycerinkonzentration wurde mittels enzymatischem Test (Abschnitt 2.8.3) durchgeführt. Zur Verfolgung der Produktbildung wurden angelegte 1/OD-Proben enzymatisch aufgeschlossen und die Aktivität gegenüber Olivenöl titrimetrisch vermessen (2.8.2.1).

In Abbildung 3-2 sind beispielhaft die Verläufe der Offline-Daten der BTM- und Glycerinkonzentrationen sowie der volumetrischen und BTM-bezogenen Aktivität während der Induktionsphase dargestellt. Unter Verwertung von Glycerin als Hauptkohlenstoffquelle des Mediums zeigten die Zellen nach Inokulation ein typisches Wachstumsverhalten. Der Verbrauch des vorgelegten Glycerins wurde nach 4,8 h durch einen sprunghaften Anstieg des pO_2 -Signals angezeigt (Daten nicht gezeigt), woraufhin zur weiteren Substratversorgung der Zellen die Zufütterung mit *feed*-Lösung gestartet wurde.

Die Induktion erfolgte nach 6 h bei einer BTM-Konzentration von 10 g/L durch Zugabe von IPTG (Zielkonzentration 1 mM). Die Analyse der angelegten 1/OD-Proben (Abschnitt 2.9.6.2) ergab, dass infolge der Induktorzugabe innerhalb der Zellen aktive Lipase gebildet wurde. Dabei zeigte die volumetrische Aktivität einen nahezu linearen Anstieg. Nach einer Induktionszeit von 6 h konnten $1,25 \cdot 10^6 U_T/L_{Medium}$ gemessen werden. Hinsichtlich der BTM-bezogenen Aktivität ist ein Sättigungsverlauf erkennbar. Nach 6 h wurde ein Wert von rund

$6,1 \cdot 10^4$ U_T/g_{BTM} erreicht. Die SDS-PAGE-Analyse der 1/OD-Proben entsprach den Ergebnissen des Schüttelkolbenversuchs aus Abschnitt 3.1.1 (Daten nicht gezeigt).

Zur Untersuchung der segregativen Plasmidstabilität im Produktionsstamm wurden in der Batch-Phase (1,5 h), vor Induktion (6 h) und zum Ende der Kultivierung (11,5 h) Proben entnommen und wie in Abschnitt 2.8.4 beschrieben analysiert. Zum Induktionszeitpunkt (6 h) lag die Plasmidstabilität, wie zu Beginn des Prozesses, bei 100 % und nach 11,5 h bei 99 %. Der Anteil plasmidfreier Zellen war demnach unter den gewählten Prozessbedingungen vernachlässigbar klein.

Die BTM-Konzentration erreichte zum Ende der *feed*-Phase (12 h) 20,5 g/L. Nach Abtrennung der Zellen vom Medium mittels Röhrenzentrifuge konnten 3,44 kg Biofeuchtmasse geerntet werden. Die erhaltene Biomasse diente als Ausgangsmaterial für die sich anschließenden Untersuchungen zur Reinigung der Lipase (Abschnitt 3.1.3).

Zur Beurteilung der Prozessübertragung von Schüttelkolben auf Bioreaktor sowie der anschließenden Maßstabsvergrößerung wurde die pro Gramm BFM produzierte Lipase-Aktivität bestimmt und die einzelnen Produktionsstufen miteinander verglichen. Zu diesem Zweck wurden jeweils 3 g BFM der verschiedenen Kultivierungen mittels HDH aufgeschlossen und nach Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile die Lipase-Aktivität im Rohextrakt titrimetrisch gemessen (Abschnitte 2.9.6.1 und 2.8.2.1). Die Nutzung des HDH erweist sich in diesem Zusammenhang, aufgrund der Möglichkeit eines effizienten und einfach skalierbaren Zellaufschlusses, als vorteilhaft gegenüber einer enzymatischen Zellyse (vgl. 1/OD-Proben-Analyse). Daher wurde auch für die spätere Lipase-Reinigung im präparativen Maßstab (Abschnitt 3.1.3) der Zellaufschluss mittels HDH durchgeführt.

Der Vergleich der verschiedenen Produktionsstufen hinsichtlich der erhaltenen BFM-bezogenen Aktivitäten ist in Abbildung 3-3 dargestellt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass unabhängig von Kultivierungsmethode und Maßstab ähnliche Mengen aktiver Lipasen während der Induktionsphase in den Zellen gebildet wurden. Die BFM-Aktivität der einzelnen Produktionsstufen schwankt zwischen 10.000 U_T/g_{BFM} und 12.000 U_T/g_{BFM} . Demnach konnte die Produktion ohne eine signifikante Veränderung der Aktivität vom Schüttelkolbenmaßstab auf den Bioreaktor übertragen werden. Ebenso war eine Maßstabsvergrößerung des Fed-Batch-Prozesses möglich.

Außerhalb der vorliegenden Arbeit wurde das entwickelte Produktionsverfahren am Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse (CBP) in Leuna zusätzlich auf einen Maßstab von 200 L vergrößert. Die erhaltene BFM-Aktivität entsprach mit 11.800 U_T/g_{BFM} den Ergebnissen der entsprechend kleineren Produktionsstufen.

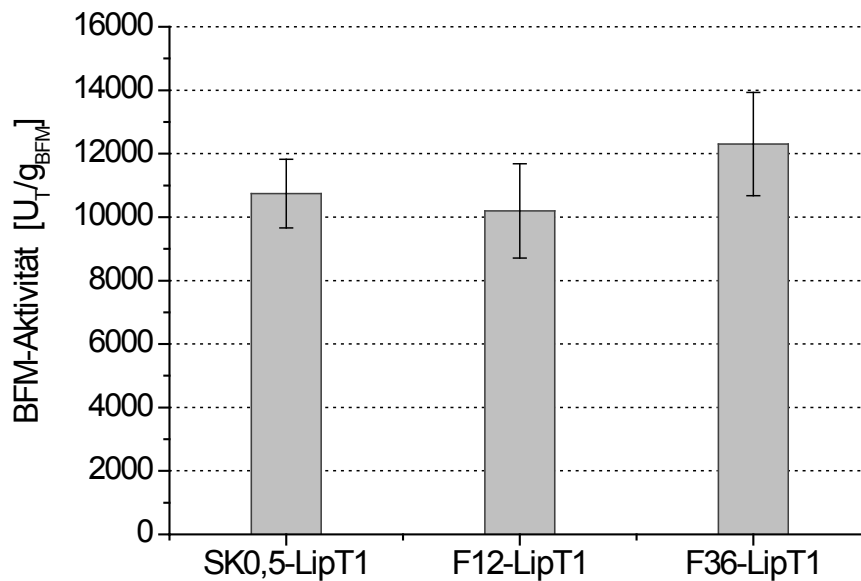


Abbildung 3-3: BFM-Aktivität der verschiedenen Produktionsstufen bei der Maßstabsvergrößerung der LipT1-Produktion. Die Lipase-Produktion erfolgte mit Stamm *E. coli* BL21 Gold(DE3) pJExpress-LipT1 im 0,5 L - Schüttelkolbenmaßstab (SK0,5-LipT1) sowie im Fed-Batch-Verfahren mit Startvolumen von 12 L (F12-LipT1) bzw. 36 L (F36-LipT1). Details zur Kultivierung können den Abschnitten 2.9.3 und 2.9.5 entnommen werden. Zur Bestimmung der BFM-Aktivität wurden 3 g BFM mittels HDH (vier Passagen; 1000 bar) aufgeschlossen, die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (40 min; 20.000 x g) abgetrennt und die Lipase-Aktivität im Rohextrakt titrimetrisch vermessen (Substrat: Olivenöl-Emulsion; n ≥ 3).

Das für die Lipase LipT1-WT entwickelte Produktionsverfahren wurde auch für die Herstellung der anderen, relevanten Lipasen angewendet. Die Produktion der Lipasen LipA und LipL1 wurde grundsätzlich nach der gleichen Vorgehensweise wie bei Lipase LipT1-WT durchgeführt: Nach erfolgreicher Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab erfolgte die Übertragung des Prozesses auf den Bioreaktormaßstab (12 L) mit anschließendem Scale-Up auf 36 L (Abschnitt 2.9.5). Im Fall der Lipase LipA wurde eine Anpassung der Expressionsbedingungen vorgenommen [Heppner, 2011]. Zur Verringerung der *inclusion-body*-Bildung und Erhöhung des Anteils aktiver Lipase wurde die Temperatur zur Induktion auf 34 °C abgesenkt (Abbildung 8-8).

In Tabelle 3-1 sind exemplarisch die wichtigsten Ergebnisse der jeweiligen Fermentation im größten Produktionsmaßstab (36 L) aufgeführt. Hinsichtlich des Zellwachstums und Substratverbrauchs zeigten alle Fermentationen tendenziell den gleichen Verlauf (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zur Produktion von LipT1-WT trat bei LipA und LipL1 ein deutlicher Plasmidverlust auf. Weiterhin wurden starke Unterschiede in der volumetrischen Aktivität der verschiedenen Lipasen erhalten. Neben dem Einfluss der Plasmidstabilität und der Biomassekonzentration zu Prozessende lässt sich dieses Ergebnis dadurch erklären, dass die Lipasen Unterschiede in ihrer Substratspezifität aufweisen und somit dass im Aktivitätstest eingesetzte Substrat (Olivenöl) unterschiedlich gut umsetzen konnten [Lesuisse *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2000; Leow *et al.*, 2007]. In Abschnitt 4.1 wird auf die verschiedenen möglichen Einflüsse auf die rekombinante Lipase-Produktion näher eingegangen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ein Scale-Up des Produktionsprozesses für die drei Lipasen unter den gewählten Bedingungen möglich ist. Die in den Fermentationen

produzierte Biomasse diente als Ausgangsmaterial für weiterführende Untersuchungen zur Lipase-Reinigung und Immobilisierung.

Tabelle 3-1: Vergleich der Produktion verschiedener Lipasen mit Stamm *E. coli* BL21 Gold(DE3) im Fed-Batch-Verfahren (36 L). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte titrimetrisch mit Olivenöl als Substrat.

Parameter	LipT1-WT <i>G. zalihae</i>	LipA ⁽¹⁾ <i>B. subtilis</i>	LipL1 <i>G. stearothermophilus</i>
Prozessdauer [h]	12	10	12
BTM-Konzentration [g/L]	21	24	21
Volumetrische Aktivität [U_T/L_{Medium}]	$1,26 \cdot 10^6$	$7,4 \cdot 10^4$	$5,2 \cdot 10^5$
Plasmidstabilität (Prozessende) [%]	99	87	83

⁽¹⁾ [Heppner, 2011]

3.1.3 Affinitätsreinigung der Lipasen

Die Untersuchungen zur zielgerichteten Immobilisierung der Lipasen setzten nach erfolgreicher Produktion die Reinigung der Zielenzyme aus *E. coli*-Rohextrakt voraus. Durch eine Abreicherung der *E. coli*-eigenen Proteine vor Durchführung der Immobilisierung können störende Einflüsse während der Kopplung verringert werden. Zusätzlich wird eine Verringerung der Trägerkapazität durch Beladung mit proteinogenen Verunreinigungen vermieden.

Zur Aufarbeitung der Lipasen mittels Affinitätschromatographie wurde jeweils ein C-terminal fusionierter Polyhistidin-*tag* (His₆) genutzt. Die Anwendung eines His₆-*tags* ist eine weit verbreitete Methode zur Reinigung rekombinanter Proteine, mit der in einem Schritt der Großteil der *E. coli*-Wirtszellproteine abgetrennt werden kann [Terpe, 2003]. Aufgrund der geringen Größe des *tags* sind sterische Einflüsse auf die Enzymaktivität in der Regel nicht zu erwarten [Charlton und Zachariou, 2008]. Das Prinzip der Affinitätsreinigung mittels His₆-*tag* kam bereits für verschiedene *Bacillus*-Lipasen zur Anwendung [Schlieben *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2010; Shariff *et al.*, 2011].

Im Folgenden werden stellvertretend die Ergebnisse der Reinigung von LipT1-WT aufgeführt. Die Ergebnisse der beiden anderen Lipasen werden am Ende des Kapitels zusammengefasst.

Die initialen Reinigungsversuche erfolgten, wie in Abschnitt 2.9.7.1 beschrieben, unter Nutzung der Säulenchromatographie. Hierbei wurde beobachtet, dass nach Bindung des Zielproteins an das Säulenmaterial die Elution von aktiver Lipase nur bedingt möglich war. Während der Elution trat in den fraktionierten Proben eine deutliche Trübung auf. Die Analyse des entstandenen Präzipitats mittels SDS-PAGE ergab, dass es sich bei dem Niederschlag um ausgefallenes Zielprotein handelte (Daten nicht gezeigt). Dieser Zusammenhang spiegelte sich auch in der Aktivitätsbilanz wider. Nach Abtrennung des Präzipitats und Vereinigung der Elutionsfraktionen konnten ca. 4 % der ursprünglich eingesetzten Aktivität im Fraktionspool wiedergefunden werden. Ein Resolubilieren des

Präzipitats zur Rückgewinnung der Aktivität war nicht möglich. Es wurden verschiedene literaturbeschriebene Pufferlösungen auf ihre Eignung zum Rücklösen des Proteins untersucht [Schlieben *et al.*, 2004], jedoch konnten maximal 2 % der theoretisch möglichen Proteinmenge wieder in Lösung gebracht werden (verwendeter Puffer: 10 mM Tris/HCl, 5 % (v/v) Isopropanol; 2 mM Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO)).

Als Ursache für die unerwünschte Präzipitation und den damit verbundenen Aktivitätsverlust wurde die starke Aufkonzentrierung der Lipase während der Bindung an das Chromatographiematerial vermutet. Die anschließende Elution führte zur lokalen Übersättigung des Proteins, in dessen Folge es zur Präzipitation kam. Aufgrund der vergleichsweise hydrophoben Proteinoberfläche neigen Lipasen häufig zur Aggregation [Palomo *et al.*, 2003a]. Zur Vermeidung „kritischer“ Proteinkonzentrationen bei der Lipase-Reinigung wurde alternativ zur Nutzung einer gepackten Chromatographiesäule die Durchführung einer Batch-Adsorption bzw. -Desorption (BA) untersucht. Dies beinhaltete die sequenzielle Inkubation des suspendierten Chromatographiematerials mit der zielproteinhaltigen Lösung (Kopplung), mit Bindepuffer zum Waschen des Materials und schließlich mit Elutionspuffer zur Desorption des Zielproteins. Durch die beschriebene Vorgehensweise sollten lokale Übersättigungen der Lipase vermieden werden. Dadurch sollte insbesondere eine stufenweise und somit schonendere Elution realisiert werden. Die genaue Durchführung der Batch-Adsorption ist in Abschnitt 2.9.7.2 beschrieben. Die verwendeten Puffervolumina orientierten sich an den Herstellerangaben des Chromatographiematerials.

In Abbildung 3-4 sind die Ergebnisse der Reinigung der Lipase LipT1-WT dargestellt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels HDH. Nach Trennung der löslichen von den unlöslichen Zellbestandteilen mittels Zentrifugation wurde deutlich, dass der überwiegende Teil des Zielproteins in löslicher Form vorlag (Abbildung 3-4 B; Bahn 3 - unlösliches Protein; Bahn 4 - lösliches Protein). Die Inkubation des Rohextraktes (Proteinkonzentration 15,2 mg/mL) mit dem Trägermaterial führte zu einer nahezu vollständigen Kopplung der Lipase-Aktivität. Lediglich 1,5 % der zu Beginn eingesetzten Aktivität wurden in der Durchlaufraction wiedergefunden. Auffällig ist die vergleichsweise intensive Bande in der Durchlaufprobe (Abbildung 3-4 B; Bahn 5), die sich auf Höhe des Zielproteins befindet. Hierbei könnte es sich um ein *E. coli*-eigenes Protein mit einem dem Zielprotein ähnlichen Molekulargewicht handeln oder um inaktive Lipase LipT1-WT, deren His₆-tag durch mögliche Fehlfaltungen nicht zugänglich oder durch einen vorzeitigen Translationsabbruch nicht vorhanden ist. In den nachfolgenden Waschschrritten wurde neben *E. coli*-eigenen Proteinen auch ein geringer Teil des Zielproteins ausgelesen. Die Verluste durch Waschen des Trägermaterials beliefen sich auf 5,7 %. Die erhaltenen Elutionsfraktionen (Abbildung 3-4 B; Bahnen 9 - 11) zeigten außer der jeweiligen Zielproteinbande nahezu keine proteinogenen Verunreinigungen. Die Ausbeute nach drei Elutionsschritten betrug 59 %. Nach Vereinigung der Elutionsfraktionen ergab sich eine spezifische Aktivität von 2680 U₇/mg bei einem Reinigungsfaktor von 15 (Tabelle 3-2). Zur Entfernung des zur Elution eingesetzten Imidazols wurden die vereinigten Fraktionen nach Abschnitt 2.9.8 dialysiert. Während der insgesamt dreistündigen Dialyse trat erneut eine Präzipitation der Lipase auf. Dadurch verringerte sich die Ausbeute auf 25 %. Die spezifische Aktivität blieb nahezu unverändert. Nach Abtrennung der Präzipitate mittels Zentrifugation wurde das Enzym mit 50 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -20 °C gelagert. Dabei blieb die Lipase in Lösung und war mit einer Restaktivität von 80 % (nach 250 d) ausreichend stabil (Abbildung 8-9).

Tabelle 3-2: Reinigungstabelle zur Batch-Adsorption der Lipase LipT1-WT. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte titrimetrisch mit Olivenöl als Substrat. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradfordtest ermittelt.

Schritt	Volumen [mL]	Protein-Menge [mg]	Aktivität [U _T]	Spez. Aktivität [U _T /mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor [-fach]
Rohextrakt (RE)	250	3.788	678.000	179	100	1
Elutionspool E1-E3	300	150	402.000	2.680	59	15
Dialyse*	300	60	172.800	2.880	25	16

* Hochrechnung: zur Dialyse eingesetztes Volumen betrug 30 mL

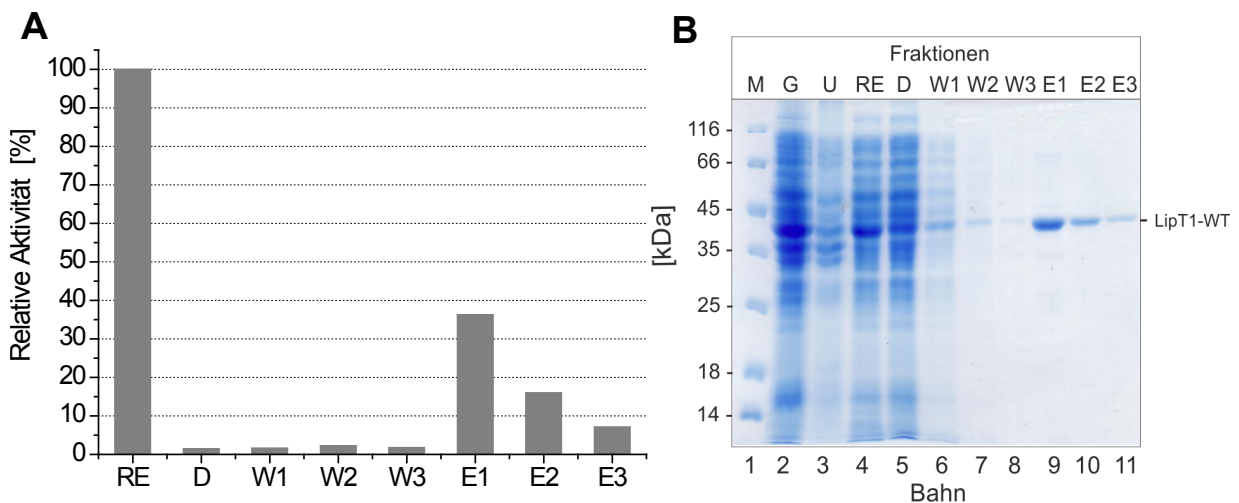


Abbildung 3-4: Reinigung der Lipase LipT1-WT mittels Batch-Adsorption. Die Produktion des Enzyms erfolgte in PM_{AMP}-Medium bei 37 °C in *E. coli* BL21Gold(DE3) pJExpress-LipT1 (Prozess F36-LipT1). 60 g BFM wurden in 240 mL Aufschlusspuffer resuspendiert und anschließend in drei Passagen bei 1000 bar mittels HDH aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (40 min; 17.000 x g) folgte die Inkubation von 250 mL Rohextrakt mit 50 mL Ni²⁺-Streamline Chelating (Rollermixer). Es wurden drei Waschschritte mit je 250 mL Bindingpuffer und drei Elutionsschritte mit je 100 mL Elutionspuffer durchgeführt. **A:** Aktivität der Reinigungsfraktionen bezogen auf die Aktivität des Rohextraktes (Substrat: Olivenöl). Angegeben sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung. **B:** SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen. Probenvorbereitung: Verdünnung mit PP im Verhältnis 1 : 7 und Inkubation bei 99 °C für 5 min. Aufgetragene Volumina: Marker 5 µL; Proben: 10 µL. Bahn 1: Marker; Bahn 2: Gesamtzellprotein (G); Bahn 3: Unlösliches Zellprotein (U); Bahn 4: Rohextrakt (RE); Bahn 5: Ungebundenes Protein im „Durchlauf“ (D); Bahn 6 - 8: Waschfraktionen W1 - W3; Bahn 9 - 11: Elutionsfraktionen E1 - E3. Theoretisches MW von LipT1-WT: 44 kDa.

Bei der Lipase-Reinigung mittels Batch-Adsorption konnten in den gesammelten Durchlauf-, Wasch- und Elutionsfraktionen insgesamt 67 % der zur Bindung eingesetzten Aktivität wiedergefunden werden. Im Vergleich zur Reinigung mittels Säulenchromatographie konnte somit die Aktivitätsausbeute nach Elution deutlich gesteigert werden. In der sich anschließenden Dialyse ging allerdings ein Drittel der Aktivität durch Bildung unlöslicher Aggregate verloren. Da die Lipase-Aggregation offensichtlich konzentrationsabhängig abläuft, würde eine zusätzliche Verdünnung der vereinigten Elutionsfraktionen vor Beginn der Dialyse zur Verringerung der Verluste führen. Mit der beschriebenen Vorgehensweise

konnte für nachfolgende Untersuchungen zur Immobilisierung ausreichend aktives und reines Protein gewonnen werden, daher wurde eine Optimierung der Reinigung nicht weiter verfolgt.

Die Methode der BA-Affinitätsreinigung konnte auf die Lipasen LipA und LipL1 sowie auf die verschiedenen zur zielgerichteten Immobilisierung konstruierten Mutanten der Lipase LipT1-WT mit vergleichbaren Ergebnissen übertragen werden (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Ausbeute und spezifische Aktivität der verschiedenen Lipasen nach BA-Reinigung. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte titrimetrisch unter Verwendung von Olivenöl als Substrat. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradfordtest ermittelt. „n.b.“ – nicht bestimmt.

Lipase	Aktivitäts- ausbeute Elutionspool [%]	Spezifische Aktivität Elutionspool [U _T /mg]	Aktivitäts- ausbeute nach Dialyse [%]	Spezifische Aktivität nach Dialyse [U _T /mg]
LipT1-WT	59	2.680	25	2.880
LipT1-KXR	72	2.520	44	2.310
NQ-LipT1	69	2.140	43	2.360
LipT1-CQ	66	2.920	10	2.400
LipT1-S2C	65	2.980	31	2.820
LipT1-S259C	64	2.840	51	2.830
LipT1-S333C	50	2.490	41	2.730
LipT1-SXC	59	2.590	20	2.450
LipA	82	153	n.b.	218
LipL1	n.b.	n.b.	n.b.	1.411

3.2 Immobilisierung der Lipasen

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der zielgerichteten Immobilisierung rekombinant hergestellter Lipasen. Dabei wurde der Ansatz verfolgt, durch Veränderungen in der Aminosäuresequenz der Lipasen gezielt reaktive Bereiche auf der Proteinoberfläche zu schaffen, über die die Proteine bevorzugt mit dem Trägermaterial interagieren können. Durch eine geeignete Wahl der Position der Sequenzveränderungen sollte somit die Orientierung der Enzyme auf dem Träger beeinflusst werden.

Ausgehend von der Proteinkristallstruktur der Wildtyp-Lipase LipT1 wurde eine spezielle Immobilisierungsebene auf der dem aktiven Zentrum abgewandten Seite des Enzyms definiert. Dadurch sollte erreicht werden, dass nach erfolgter Kopplung das aktive Zentrum möglichst direkt in das Reaktionsmedium exponiert wird. Das Auftreten ungünstiger Enzymorientierungen, bei denen für die Aktivität wichtige Bereiche des Enzyms direkt mit dem Träger interagieren und so beispielsweise die Substratbindung beeinträchtigt wird, würden in diesem Fall vermieden werden (Abschnitt 1.2.3 und 1.4).

Zur Realisierung der zielgerichteten Lipase-Immobilisierung wurden verschiedene Strategien untersucht. Zum einen wurden die Zielproteine mit speziell entwickelten Immobilisierungstags fusioniert. Zum anderen wurden verschiedene Punktmutationen durchgeführt, um entweder die Reaktivität der Aminosäureseitenkette an dieser Position zu erhöhen oder, um bestimmte, auf der Proteinoberfläche ungünstig verteilte Aminosäurereste zu entfernen. Auf die verschiedenen Ansätze zur zielgerichteten Immobilisierung wird in den folgenden Kapiteln im Detail eingegangen.

Grundsätzlich wird das Ergebnis einer Enzymimmobilisierung von zahlreichen Faktoren beeinflusst [Cao, 2006; Hanefeld *et al.*, 2009; Cantone *et al.*, 2013]. Neben den Trägereigenschaften können sich die Kopplungsbedingungen und die Mikroumgebung des gebundenen Enzyms auf dessen Aktivität nach Immobilisierung auswirken. Insbesondere können bei Verwendung von porösen Trägermaterialien Diffusions- und Verteilungseffekte der eingesetzten Substrate und Produkte einen großen Einfluss auf die nachweisbare Aktivität des Enzyms haben. Aus diesen Gründen ist eine vollständige Wiederfindung der zur Kopplung eingesetzten Aktivität nur selten möglich. Da die Aktivitätsbestimmung auf Trägermaterialien in der Regel von o.g. Faktoren und Effekten überlagert wird, handelt es sich bei trägerbezogenen Aktivitäten um apparente Aktivitäten. In Abschnitt 4.3.1 werden die verschiedenen Einflüsse auf die Immobilisierung diskutiert.

3.2.1 Lipase-Immobilisierung mittels mikrobieller Transglutaminase

Ein Ansatz zur zielgerichteten Immobilisierung bestand in der Verwendung enzymkatalysierter Kopplungsmethoden. Dabei ist entscheidend, dass sich das Kopplungsenzym durch eine hohe Spezifität gegenüber bestimmten Aminosäureresten innerhalb des zu koppelnden Proteins auszeichnet. Durch den Einsatz der mikrobiellen Transglutaminase (MTG) können proteingebundene Glutaminreste mit verschiedenen primären Aminen (z.B. Lysin-Derivate) kovalent verknüpft werden (Abschnitt 1.2.3). Dieses Prinzip eignet sich, um Zielproteine über Glutaminreste an aminogruppenhaltige Trägermaterialien zu koppeln. Hierfür können, abhängig von flankierenden Seitenketten,

native Glutaminreste im Protein genutzt werden. Alternativ besteht die Möglichkeit das Zielprotein mit entsprechenden glutaminhaltigen *tags* zu funktionalisieren.

3.2.1.1 Untersuchung der Verfügbarkeit MTG-reaktiver Glutaminreste innerhalb der Lipase LipT1-WT

Eine Grundvoraussetzung zur zielgerichteten Immobilisierung von Proteinen mit Hilfe der MTG ist die Kenntnis, ob das jeweilige Protein in nativer Form über zugängliche und reaktive Glutamin- bzw. Lysinreste verfügt. Durch das Vorhandensein reaktiver Glutamin-Seitenketten im Wildtyp-Enzym können „Nebenreaktionen“ auftreten, bei denen eine Kopplung außerhalb der definierten Immobilisierungsebene abläuft und so die Enzymorientierung auf dem Träger nicht direkt kontrollierbar ist. Werden zusätzlich auf der Oberfläche des Zielproteins Lysinreste als Substrat erkannt, kann es zu einer unerwünschten Protein-Quervernetzung kommen.

Da die Sequenz der Lipase LipT1-WT neben 11 Lysin- auch 13 Glutaminreste enthält (Abbildung 8-2), wurde in Vorversuchen überprüft, ob diese Seitenketten von der MTG als Substrate akzeptiert werden. Zum Nachweis reaktiver Glutaminreste wurde als Acyl-Akzeptor der Fluoreszenzfarbstoff Monodansylcadaverin (MDC) eingesetzt. Sind im Zielprotein zugängliche Glutamin-Seitenketten vorhanden, kann eine MTG-katalysierte Kopplung von MDC erfolgen. Diese Fluoreszenzmarkierung des Proteins ermöglicht eine einfache Detektion nach elektrophoretischer Trennung. Sind gleichzeitig reaktive Glutamin- und Lysinreste im Protein vorhanden, läuft neben der Markierung von Glutamin eine Protein-Quervernetzung ab, die durch die Entstehung höhermolekularer Banden nachweisbar ist. Die Durchführung der MDC-Kopplung ist in Abschnitt 2.9.10 beschrieben. Das Resolubilisieren der gelagerten MTG-Präzipitate erfolgte mit 50 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM NaCl.

Wie in Abbildung 3-5 A ersichtlich ist, blieb die Intensität der Lipase-Bande über 60 min konstant. Es entstanden keine höhermolekulare Banden im betrachteten Zeitraum. Da keine Quervernetzung des Zielproteins auftrat, konnte geschlossen werden, dass entweder keine Glutamin- oder keine Lysinreste zur Verfügung standen.

In Abbildung 3-5 B wurden zusätzlich zu den MDC-Banden keine weiteren fluoreszierenden Banden festgestellt. Demzufolge fand keine Verknüpfung des Fluoreszenzfarbstoffes mit den Lipase-Molekülen statt. Ebenso konnte unter den gewählten Bedingungen keine Fluoreszenz-Markierung der MTG beobachtet werden (Abbildung 3-5 B; Bahn 5). Als Positiv-Kontrolle für die Aktivität der MTG diente ein Ansatz mit MTG, MDC und Natrium-Caseinat, einem bekannten MTG-Substrat [Patzsch *et al.*, 2010]. Hierbei konnte sowohl die Quervernetzung von Natrium-Caseinat als auch die Modifikation mit MDC nachgewiesen werden (Abbildung 3-5 C,D).

Aus den Ergebnissen ging hervor, dass Lipase LipT1-WT kein Substrat für die enzymatische Quervernetzung darstellt. Die in der Lipase enthaltenen Glutaminreste waren für die MTG nicht zugänglich und standen für eine Kopplung an ein aminogruppenhaltiges Trägermaterial nicht zur Verfügung. Diese Ausgangslage bot die Möglichkeit die Proteinsequenz mit zusätzlichen Glutaminresten zu erweitern, um über diese Seitenketten eine gezielte Kopplung der Lipase zu realisieren.

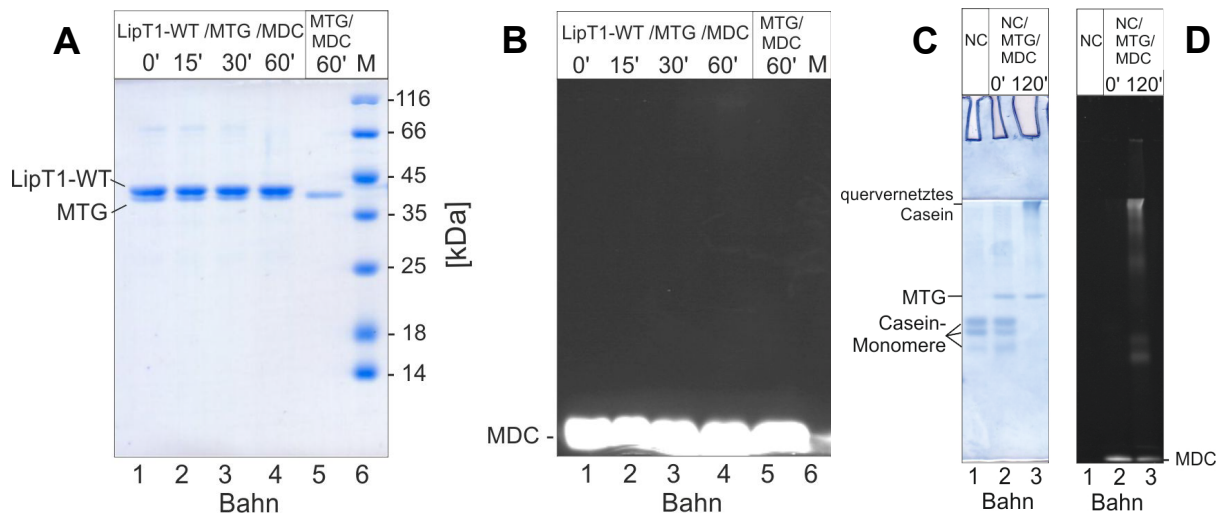


Abbildung 3-5: SDS-PAGE-Analyse der Modifikation von LipT1-WT (A,B) bzw. Natrium-Caseinat (C,D) mit Monodansylcadaverin durch Einsatz von MTG. Der Nachweis erfolgte mittels Coomassie-Färbung (A,C) und UV-Licht (B,D). Die Reaktion wurde bei 37 °C unter Verwendung von 0,1 mg/mL LipT1-WT (in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8) bzw. 0,4 mg/mL Natrium-Caseinat (NC), 0,5 mM MDC und 1 U/mL MTG durchgeführt. Es wurden periodisch Proben entnommen, 1:2 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Nach Durchführung der SDS-PAGE wurde zur Visualisierung der Substrate und Reaktionsprodukte ein UV-Transilluminator bei 312 nm genutzt. Anschließend folgte die Färbung des Gels mit Coomassie. Aufgetragene Volumina: Marker 5 µL; Proben: 10 µL. **A** und **B**: Bahn 1 - 4: Reaktionsansatz mit LipT1-WT, MDC und MTG nach 0 - 60 min; Bahn 5: Kontrollansatz mit MDC und MTG nach 60 min; Bahn 6: Marker. **C** und **D**: Bahn 1: Natrium-Caseinat; Bahn 2 - 3: Reaktionsansatz mit Natrium-Caseinat, MTG und MDC nach 0 und 120 min. Theo. MW: LipT1-WT: 44 kDa; MTG: 39 kDa; Casein-Monomere: 19, 22 und 24 kDa.

3.2.1.2 Design eines Glutamin-Peptid-tags zur zielgerichteten Immobilisierung

Die „Funktionalisierung“ eines Proteins mit einer gewünschten Aminosäurespezies kann auf genetischer Ebene über zwei verschiedene Wege erfolgen. Zum einen kann eine Substitution bestehender Aminosäuren im Protein vorgenommen werden (Punktmutation). Zum anderen besteht die Möglichkeit der Erweiterung der Proteinsequenz mit entsprechenden Peptid-tags. Für die Untersuchungen zur Lipase-Immobilisierung unter Einsatz der MTG wurde die letztere Strategie verfolgt. Durch die Fusion von *tag* und Zielprotein muss nicht in ursprüngliche Sequenz des Proteins eingegriffen werden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit einer Störung nativer, intramolekularer Wechselwirkungen infolge der Modifikation verringert. Weiterhin ist die betreffende *tag*-Sequenz frei wählbar und kann hinsichtlich der flankierenden Aminosäuren des Glutaminrestes speziell an die Substratspezifität der Transglutaminase angepasst werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit in den *tag linker*-Sequenzen zu integrieren, die aufgrund ihrer Aminosäureanordnung eine geringe Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturelementen aufweisen. Diese strukturell flexiblen Bereiche wirken sich positiv auf die Substraterkennung der MTG aus und erleichtern die Zugänglichkeit des reaktiven Glutaminrestes [Kamiya *et al.*, 2003a; Tanaka *et al.*, 2005].

Im Fall der Lipase LipT1 ist die Verwendung eines tags an N- bzw. C- Terminus besonders vorteilhaft hinsichtlich der Integration eines zusätzlichen Glutaminrestes. Ausgehend von der

veröffentlichten Kristallstruktur der Lipase (PDB-Eintrag: 2DSN) befinden sich beide Termini auf der dem aktiven Zentrum abgewandten Seite des Proteins [Matsumura *et al.*, 2008]. Dies bietet eine gute Ausgangslage für eine zielgerichtete Immobilisierung, bei der nach Kopplung des Enzyms dessen aktives Zentrum in das Reaktionsmedium exponiert werden soll (Abbildung 3-6).

Die Festlegung der Sequenz des glutaminhaltigen Immobilisierungs-*tags*, im Folgenden auch als „Q-*tag*“ bezeichnet, basierte auf Untersuchungen zur Substratspezifität der rekombinanten MTG-Variante S2P [Malešević *et al.*, 2015]. In diesen Untersuchungen wurde mit Hilfe einer Tripeptid-Bibliothek der Einfluss der flankierenden Aminosäuren auf die Akzeptanz des zentralen Glutamins als Substrat der MTG ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass sich sowohl in N- als auch in C-terminaler Position des Glutaminrestes die Aminosäuren Tyrosin (Y), Tryptophan (W) und Arginin (R) positiv auf die Reaktivität auswirken. Eine hohe Präferenz der MTG wurde für das Tripeptid YQR identifiziert. Diese Sequenz wurde in der vorliegenden Arbeit als zentrales Element des zur Immobilisierung bestimmten Q-*tags* ausgewählt.

Zur Verlängerung des *tags* wurde für die angrenzenden Positionen des Tripeptids auf eine bekannte Sequenz der Literatur zurückgegriffen, die bereits für MTG-katalysierte Proteinmodifikationen zum Einsatz kam (ML-YQR-S) [Kamiya *et al.*, 2007; Moriyama *et al.*, 2011]. Zwischen reaktiver Q-Sequenz und Zielprotein wurde zusätzlich eine Linker-Sequenz (GGGS) integriert, die aufgrund ihrer strukturellen Flexibilität eine ausreichende Zugänglichkeit für die MTG gewährleisten sollte [Tanaka *et al.*, 2007; Sugimura *et al.*, 2008]. Zur Untersuchung, ob die Position des Q-*tags* einen Einfluss auf die Kopplung der Lipase besitzt, wurden zwei Varianten der Lipase LipT1 konstruiert, die jeweils am N- bzw. C-Terminus den Immobilisierungs-*tag* trugen.

In Anlehnung an die Produktions- und Reinigungsstrategie des Wildtyp-Enzym konnten beide Q-*tag*-Lipasen erfolgreich im Stamm *E. coli* BL21 Gold(DE3) produziert und in aktiver Form gereinigt werden (Tabelle 3-3).

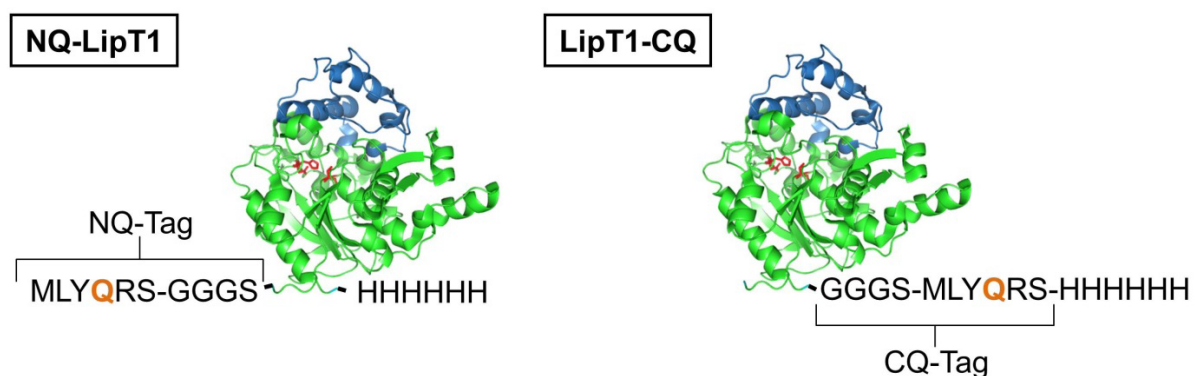


Abbildung 3-6: Schema der für die MTG-katalysierte Immobilisierung erstellten Lipase-Konstrukte. Der Q-*tag* wurde N-terminal (NQ-LipT1) bzw. C-terminal (LipT1-CQ) mit Lipase LipT1 fusioniert. Der reaktive Q-Rest ist orange hervorgehoben. Der His₆-*tag* befindet sich jeweils C-terminal. Die Strukturdarstellung (*ribbon*) erfolgte mit *pymol* basierend auf PDB-Eintrag 2DSN [Matsumura *et al.*, 2008]. Aminosäuren des aktiven Zentrums (S113, D317, H358) sind in rot (*sticks*), die Deckelregion (L170 - A240) in blau dargestellt.

3.2.1.3 Nachweis reaktiver Glutaminreste der Q-Tag-Lipasen

In Abschnitt 3.2.1.1 konnte gezeigt werden, dass innerhalb von LipT1-WT keine reaktiven Glutaminreste für eine Transglutaminase-Reaktion zur Verfügung standen. In weiterführenden Experimenten sollte untersucht werden, ob nach Fusion von Lipase und Q-tag eine Substraterkennung durch die MTG stattfindet. Aus diesem Grund wurde erneut eine Inkubation von Lipase, MTG und Fluoreszenzfarbstoff MDC durchgeführt. Die Reaktionen für die Lipasen LipT1-WT, NQ-LipT1 sowie LipT1-CQ wurden wie in Abschnitt 2.9.10 beschrieben durchgeführt.

Abbildung 3-7 zeigt exemplarisch das Ergebnis für die Lipase LipT1-CQ im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Im Fall von NQ-LipT1 wurden übereinstimmende Resultate erhalten (Daten nicht gezeigt). Im SDS-PAGE-Gel nach Coomassie-Färbung sind für LipT1-WT und LipT1-CQ während der Inkubation mit MTG keine Veränderungen der Proteinbanden erkennbar (Bahnen 1 - 4 bzw. 7 - 10). Eine Quervernetzung der Lipase fand demnach auch nach Fusion mit Q-tag nicht statt. Wie bereits in Abschnitt 3.2.1.1 gezeigt, wurden für die Wildtyp-Lipase keine fluoreszierenden Banden nach Inkubation mit MDC und MTG erhalten (Abbildung 3-7 B; Bahn 1 - 4).

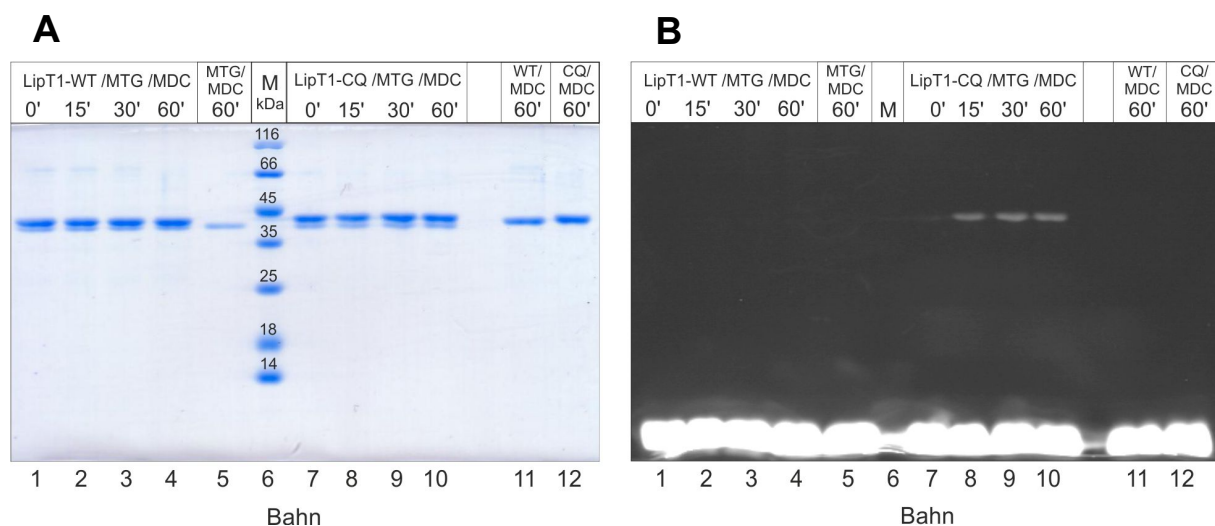


Abbildung 3-7: SDS-PAGE-Analyse der Modifikation von LipT1-WT bzw. LipT1-CQ mit Monodansylcadaverin durch Einsatz von MTG. Der Nachweis erfolgte mittels Coomassie-Färbung (A) und UV-Licht (B). Die Reaktion wurde bei 37 °C unter Verwendung von 0,1 mg/mL der jeweiligen Lipase (in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8), 0,5 mM MDC und 1 U/mL MTG durchgeführt. Es wurden periodisch Proben entnommen, 1:2 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Nach Durchführung der SDS-PAGE wurde zur Visualisierung der Substrate und Reaktionsprodukte ein UV-Transilluminator bei 312 nm genutzt. Anschließend folgte die Färbung des Gels mit Coomassie. Aufgetragene Volumina: Marker 5 µL; Proben: 10 µL. Bahn 1 - 4: Reaktionsansatz mit LipT1-WT, MDC und MTG nach 0 - 60 min; Bahn 5: Kontrollansatz mit MDC und MTG nach 60 min; Bahn 6: Marker; Bahn 7 - 10: Reaktion mit LipT1-CQ, MDC und MTG nach 0 - 60 min; Bahn 11: Kontrolle: LipT1-WT mit MDC nach 60 min; Bahn 12: Kontrolle: LipT1-CQ mit MDC nach 60 min. Theo. MW: LipT1-WT: 44 kDa; MTG: 39 kDa.

Im Fall von LipT1-CQ konnten deutliche Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden, woraus geschlossen werden kann, dass eine Verknüpfung zwischen Zielprotein und MDC

stattgefunden haben muss. Im Kontrollansatz mit LipT1-CQ und MDC, ohne Zusatz von MTG, wurde nach 60 min keine Fluoreszenzmarkierung beobachtet (Abbildung 3-7 B; Bahn 12). Demnach ist die Kopplung von MDC auf eine rein enzymatisch katalysierte Reaktion zurückzuführen. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Fusion mit Q-tag eine gezielte Modifikation der Lipasen durch MTG möglich ist.

3.2.1.4 Nachweis MTG-reaktiver Aminogruppen des Trägermaterials

Nachdem die Substraterkennung der Q-tag-Lipasen durch die MTG nachgewiesen werden konnte, folgte die Untersuchung geeigneter Trägermaterialien. Als Modellträger für die Immobilisierung wurde EAH-Sepharose 4B (GE Healthcare) ausgewählt. Hierbei handelt es sich um ein agarosebasiertes Trägermaterial, das mit Aminogruppen funktionalisiert ist (Abschnitt 2.6). Zur Funktionalisierung des Materials wurde 1,6-Diaminohexan verwendet. Das aliphatische Amin weist eine hohe Ähnlichkeit zur Seitenkette des natürlichen MTG-Substrates Lysin auf. Zur Überprüfung der Zugänglichkeit und Reaktivität der trägergebundenen Aminogruppen wurde analog zum Nachweis reaktiver Glutaminreste untersucht, ob eine MTG-katalysierte Modifikation dieser Gruppen möglich ist. Als Glutamin-Komponente diente in diesem Fall das fluoreszenzmarkierte Tripeptid Dansyl-WQR. Als Lösungsmittel für Dansyl-WQR wurde 0,1 M Essigsäure verwendet. Die Durchführung des Versuchs ist in Abschnitt 2.9.11 beschrieben.

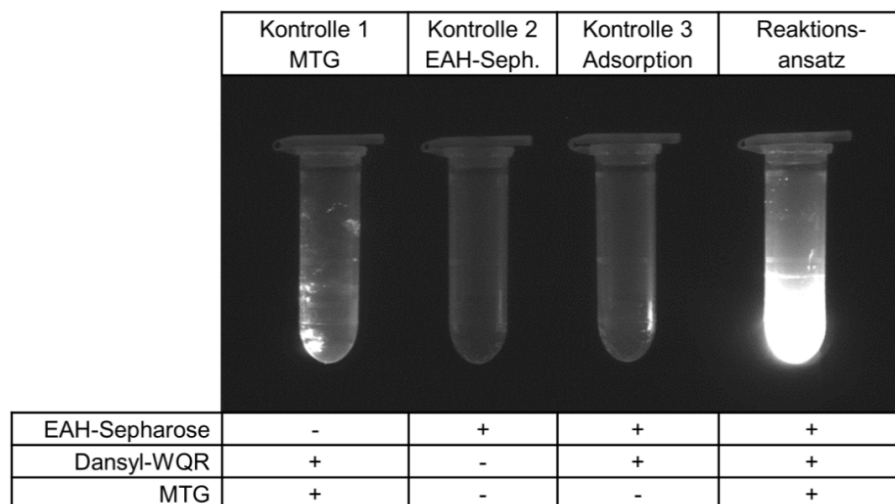


Abbildung 3-8: Kopplung von Dansyl-WQR an EAH-Sepharose mittels MTG. Die Reaktion wurde bei 37 °C und 800 rpm unter Verwendung von 50 mg EAH-Sepharose, 2,5 µmol Dansyl-WQR und 10 U MTG durchgeführt. Nach 60 min wurden alle Ansätze 5 mal mit je 1 mL Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8 mit 300 mM NaCl) gewaschen. Zur Visualisierung der Substrate und Reaktionsprodukte wurde ein UV-Transilluminator bei 312 nm genutzt.

Wie in Abbildung 3-8 zu erkennen ist, weist das Trägermaterial EAH-Sepharose im verwendeten Puffer (Kontrolle 2) keine Fluoreszenzeigenschaften auf. Ebenso wurde in Kontrolle 3, bei der Inkubation des Trägers mit Dansyl-WQR und anschließendem Waschen, kein Fluoreszenzsignal registriert. Offensichtlich wurde durch die vorangegangenen Waschschritte der Farbstoff vollständig aus dem Ansatz entfernt. Im Reaktionsansatz, der

die Komponenten EAH-Sepharose, Dansyl-WQR sowie MTG enthielt, konnte dagegen ein deutliches Fluoreszenzsignal detektiert werden. Dies deutet auf eine kovalente Verknüpfung von Farbstoff und Trägermaterial hin, da kein Auswaschen des Fluoreszenzmarkers, wie in Kontrolle 3, erfolgte.

Bei der Inkubation von MTG und Dansyl-WQR (Kontrolle 1) wurde die Bildung von Präzipitaten beobachtet, die nach Durchführung der Waschschriffe ebenfalls mittels UV-Transilluminator nachweisbar waren. Verglichen mit dem Reaktionsansatz war die Intensität jedoch deutlich geringer. Dieser Effekt ließ sich auf die im Ansatz enthaltene Essigsäure zurückzuführen, die im Verlauf der Inkubation eine Präzipitation der MTG bewirkte. In diesem Zusammenhang konnte allerdings nicht unterschieden werden, ob das Fluoreszenzsignal durch Einlagerung des Farbstoffes in die Agglomerate zustande kam oder, ob im Zuge einer Teilentfaltung der MTG nun zugängliche Lysinreste mit Dansyl-WQR verknüpft wurden.

Grundsätzlich konnte aus den Ergebnissen der Reaktions- und Kontrollansätze geschlossen werden, dass eine Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes Dansyl-WQR an EAH-Sepharose möglich ist und somit die Aminogruppen des Trägers als MTG-Substrat erkannt werden. Das ausgewählte Material konnte daher für weiterführende Untersuchungen zur Immobilisierung der Lipase-Varianten herangezogen werden.

3.2.1.5 Untersuchung der Kopplung verschiedener Varianten der Lipase LipT1 mittels MTG

Die Ergebnisse der in den Abschnitten 3.2.1.3 und 3.2.1.4 beschriebenen Experimente bestätigen, dass sowohl die Q-tag-Lipasen als auch die Aminogruppen der EAH-Sepharose Substrate der MTG sind. Im nächsten Schritt sollten nun die gezielte Kopplung der Lipase-Varianten mit dem Trägermaterial und die Analyse der Aktivität erfolgen. Als Referenz diente das Wildtyp-Enzym ohne Q-tag. In Tabelle 3-4 sind die spezifischen Aktivitäten der eingesetzten Lipasen-Präparate dargestellt. Der Vergleich der Aktivitätswerte der Q-tag-Varianten mit dem Wildtyp-Enzym zeigte, dass der Peptid-tag nur einen geringen Einfluss auf den Substratumsatz der Mutanten hat. Die Durchführung der Adsorptions- und Kopplungsversuche ist in Abschnitt 2.9.12 beschrieben.

Tabelle 3-4: Spezifische Aktivität von LipT1-WT und Q-tag-Varianten nach BA-Reinigung und Dialyse (50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8). Die Bestimmung der Aktivität erfolgte titrimetrisch unter Verwendung von Olivenöl als Substrat sowie colorimetrisch unter Einsatz von *p*NPP. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradfordtest bestimmt.

Substrat	Lip1-WT	NQ-LipT1	LipT1-CQ
Olivenöl [U_T /mg]	2.880	2.360	2.400
<i>p</i> NPP [U_C /mg]	167	154	155

Zur Bestimmung der Aktivität wurde in allen Immobilisierungsexperimenten das Substrat *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP) genutzt. Langkettige *p*NP-Ester werden sehr häufig als Lipase-Substrate eingesetzt, da die Hydrolysereaktion einfach spektrophotometrisch verfolgt werden kann und das Reaktionsprodukt *p*-Nitrophenolat aufgrund des hohen Extinktionskoeffizienten

im Bereich 405 - 420 nm sensitiv nachweisbar ist [Helistö und Korpela, 1998; Gupta *et al.*, 2002]. Die im Vergleich zum titrimetrischen Assay höhere Sensitivität sollte die Wiederfindung der Lipase-Aktivität in den einzelnen Fraktionen der Kopplungs- und Waschschritte erleichtern und somit eine genauere Bilanzierung der Aktivität ermöglichen.

Abbildung 3-9 zeigt die für die Varianten LipT1-WT, NQ-LipT1 und LipT1-CQ erhaltenen Ergebnisse. Zunächst konnte festgestellt werden, dass bei der Inkubation der drei Lipasen mit MTG keine Abnahme der Aktivität auftrat (Abbildung 3-9 A, Säulenblock „Stabilität“). Im Fall der WT-Lipase wurde dagegen eine geringe Zunahme der Aktivität erhalten. Die eingesetzten Lipase-Varianten waren demzufolge unter den gewählten Bedingungen stabil. Eine Inaktivierung infolge der MTG-Zugabe konnte ausgeschlossen werden.

Bei der Untersuchung der Adsorption der Lipasen an das Trägermaterial in Abwesenheit von MTG lag die Restaktivität der drei Enzyme im Überstand zwischen 40 % und 60 % (Abbildung 3-9 A, Säulenblock „Adsorption“). Demnach wurde ein großer Teil der eingesetzten Lipase-Moleküle unspezifisch an den Träger gebunden. Unter Berücksichtigung der gemessenen Schwankungen zeigten die drei Lipase-Varianten ein ähnliches Adsorptionsverhalten.

Im Vergleich dazu wurden im Fall der Zugabe von MTG deutliche Unterschiede zwischen der WT-Lipase und den Mutanten erhalten (Abbildung 3-9 A, Säulenblock „Kopplung“). Die Restaktivität der beiden Q-tag-Lipasen betrug nach der Reaktion rund 20 %. Diese Aktivität war zum einen deutlich niedriger als die der WT-Lipase während der Kopplung und lag zum anderen unter den erhaltenen Werten der Ansätze ohne MTG (Adsorption). Dies deutete darauf hin, dass in Anwesenheit von MTG die mit Q-tag fusionierten Lipasen stärker mit dem Trägermaterial interagieren konnten und eine spezifische Kopplung stattfand.

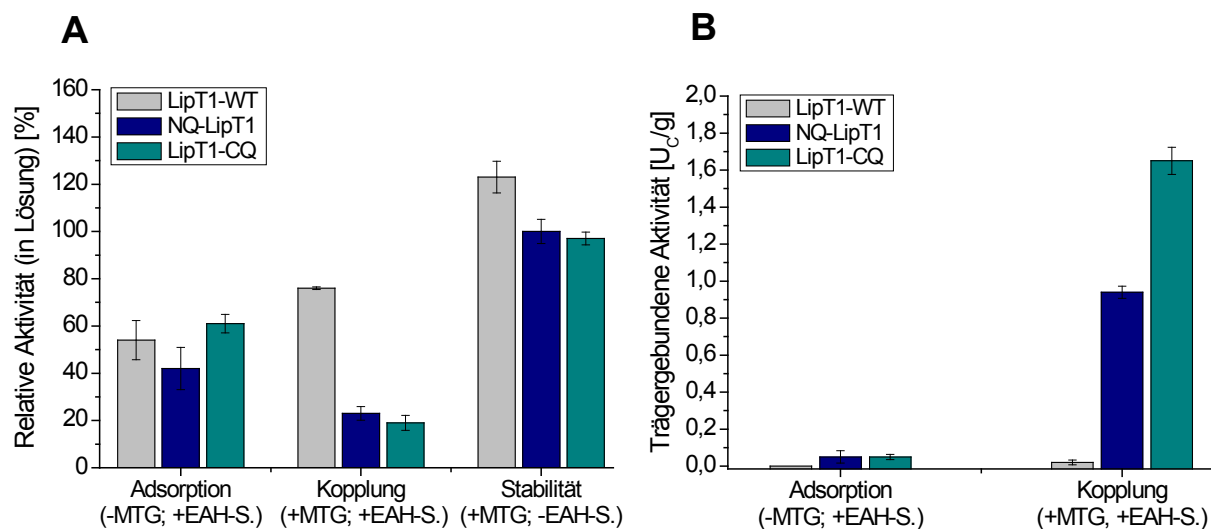


Abbildung 3-9: Aktivität löslicher (A) und trägergebundener (B) Lipase bei der Immobilisierung mittels MTG. Es wurden 100 mg des Trägers EAH-Sepharose mit 1,5 U_C der jeweiligen Lipase in Puffer MKP (50 mM Tris/HCl pH 8 mit 300 mM NaCl) in An- (Kopplung) und Abwesenheit (Adsorption) von 0,5 U MTG bei 37 °C und 800 rpm für 60 min inkubiert. Als Stabilitätskontrolle dienten Ansätze mit Lipase und MTG (ohne Träger). Das Waschen des Trägers erfolgte in vier Durchgängen mit Puffer MWP (50 mM Tris/HCl pH 8 mit 500 mM NaCl und 0,5 % (w/v) Triton X-100). Die Lipase-Aktivität wurde colorimetrisch mit Hilfe des Substrates pNPP bestimmt (n=3). Die relative Aktivität beschreibt die nach der Inkubation im Überstand messbare Lipase-Aktivität bezogen auf die zu Beginn eingesetzte Aktivität.

Diese Beobachtungen konnten durch die Bestimmung der trägergebundenen Aktivität der verschiedenen Ansätze bestätigt werden (Abbildung 3-9 B). Die Lipase-Aktivität auf dem Träger wurde mit dem Substrat *p*NPP wie in Abschnitt 2.8.2.2 beschrieben ermittelt. Zunächst konnte festgestellt werden, dass das Trägermaterial EAH-Sepharose ohne Lipase kein Signal im Aktivitätstest hervorruft (Daten nicht gezeigt). Gleiches galt für den Ansatz zur Adsorption von Lipase LipT1-WT an das Material (Abbildung 3-9 B).

Im Fall der Adsorption der beiden *Q-tag*-Lipasen wurden jeweils 0,05 U_C/g gemessen. Dies entspricht < 1 % der aus dem Überstand gebundenen Enzymaktivität. Demnach konnten über die durchgeführten Waschschriffe die adsorptiv gebundenen Lipase-Moleküle nahezu vollständig vom Träger entfernt werden.

In den Kopplungsansätzen mit MTG zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Enzymvarianten hinsichtlich der auf dem Träger nachweisbaren Aktivität. Während die Aktivität von LipT1-WT mit 0,02 U_C/g kaum nachweisbar war, wurden für die *Q-tag*-Lipasen NQ-LipT1 und LipT1-CQ 0,94 U_C/g bzw. 1,65 U_C/g erhalten. Daraus konnte geschlossen werden, dass unter der Verwendung von MTG eine zielgerichtete Kopplung der beiden *Q-tag*-Lipasen stattfand.

Anhand der Aktivitätsabnahme im Reaktionsansatz während der Kopplung lässt sich für beide Mutanten eine nahezu identische theoretische Trägerbeladung von rund 12 U_C/g ableiten. Allerdings zeigen die beiden *Q-Tag*-Lipasen in Abbildung 3-9 B deutliche Unterschiede. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die C-terminale Position des *Q*-Tags, im Vergleich zur N-terminalen Variante, positiv auf die trägergebundene Aktivität auswirkt.

Dies spiegelt sich auch in der Wiederfindung der Aktivität der Lipasen wider. Während bei NQ-LipT1 ca. 8 % der theoretisch gebundenen Aktivität auf dem Träger wiedergefunden werden konnte, wurde für Lipase LipT1-CQ mit 14 % annähernd der doppelte Wert erhalten. Grundsätzlich unterliegt die messbare Aktivität auf dem Trägermaterial und somit die Wiederfindung einer Reihe unterschiedlicher Einflüsse. Neben einer Inaktivierung während der Kopplung oder dem Auswaschen des Enzyms können auch Diffusions- und Verteilungseffekte eine Rolle spielen, so dass die messbare trägerbezogene Aktivität als apparente Aktivität einzuordnen ist. In Abschnitt 4.3.1 werden die verschiedenen Einflüsse auf die Immobilisierung und Aktivitätsbestimmung diskutiert.

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Daten, dass durch die Fusion von LipT1 und *Q-tag* eine zielgerichtete Immobilisierung der Lipase an das Trägermaterial EAH-Sepharose möglich ist. Im Fall von LipT1-CQ wurde, verglichen zum Wildtyp-Enzym ohne *tag*, eine 83-fach höhere trägergebundene Aktivität erhalten, was einen Beleg für die hohe Spezifität der MTG-katalysierten Kopplungsreaktion darstellt.

3.2.1.6 Einfluss der Pufferbedingungen auf Adsorptions- und Kopplungsverhalten

Die bisher dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass die Immobilisierung der *Q-tag*-Varianten mittels MTG unter den gewählten Bedingungen realisiert werden kann. Bei diesen Untersuchungen wurde allerdings auch beobachtet, dass ein nicht unerheblicher Teil der Lipasen (zwischen 40 – 60 %) auch ohne Zugabe von MTG vom Trägermaterial gebunden wird. Im Fall dieser unspezifischen Adsorption konnte eine verringerte Zugänglichkeit des *Q-tags* nicht ausgeschlossen werden. Folgt im Anschluss an die Adsorption keine kovalente

Kopplung durch MTG, würden diese Lipase-Moleküle während der Waschschriffe wieder ausgetragen. Daher wurde untersucht, ob durch Verringerung der unspezifischen Adsorption eine Erhöhung der trägergebundenen Aktivität erreicht werden kann. Durch die Wahl eines geeigneten Kopplungspuffers sollten die für die Adsorption verantwortlichen Wechselwirkungen zwischen Protein und Trägermaterial reduziert werden. Mit dem im vorherigen Versuch (Abschnitt 3.2.1.5) eingesetzten, Triton X-100-haltigen Waschpuffer MWP war es möglich, an das Trägermaterial adsorbierte Lipase-Moleküle nahezu vollständig zu entfernen. Aus diesem Grund sollte der Kopplungspuffer MKP durch MWP ersetzt werden. Die Unterschiede beider Puffer sind in Tabelle 3-5 aufgeführt. Die Durchführung des Versuchs erfolgte unter Verwendung von Lipase LipT1-CQ analog zu Abschnitt 3.2.1.5. Zunächst wurde untersucht, inwiefern sich eine Änderung der Pufferzusammensetzung auf die Aktivität der MTG auswirkt. Hierfür wurden die bei -80 °C gelagerten MTG-Präzipitate mit jeweils 1 mL des entsprechenden Puffers resolubilisiert, 1 : 50 verdünnt und die Aktivität im Hydroxamattest bestimmt (Abschnitt 2.9.9). In den gewählten Puffersystemen konnte kein Unterschied bezüglich der MTG-Aktivität festgestellt werden (Tabelle 3-5). Die Erhöhung der NaCl-Konzentration und der Zusatz von Triton X-100 in Puffer MWP scheinen die MTG im Aktivitätstest nicht zu beeinflussen. Eine Anpassung der MTG-Konzentration im Reaktionsansatz war demnach nicht notwendig.

Tabelle 3-5: Vergleich der Verwendung verschiedener Kopplungspuffer bei der Adsorption bzw. kovalenten Immobilisierung von LipT1-CQ an EAH-Sepharose mittels MTG. Prozentangaben sind bezogen auf eine Startaktivität von 1,5 U_C (n=3).

	Puffer MKP 50 mM Tris/HCl pH 8 300 mM NaCl	Puffer MWP 50 mM Tris/HCl pH 8 500 mM NaCl 0,5 % (w/v) Triton X-100
MTG-Aktivität / Aliquot	201 ± 5 U/mL	204 ± 2 U/mL
Restaktivität LipT1-CQ im Überstand (- MTG)	60 %	96 %
Restaktivität LipT1-CQ im Überstand (+ MTG)	20 %	33 %
Wiederfindung Aktivität auf Träger (+ MTG)	14 %	22 %
Trägergebundene Lipase-Aktivität (+ MTG)	1,65 ± 0,07 U _C /g	2,34 ± 0,18 U _C /g

Hinsichtlich der Adsorption der Lipase LipT1-CQ an EAH-Sepharose wurden deutliche Unterschiede für beide Puffer erhalten. Ohne Zusatz von MTG war bei Verwendung von Puffer MWP nahezu keine Abnahme der Lipase-Aktivität nach Inkubation mit Trägermaterial zu verzeichnen. Die Restaktivität von 96 % im Überstand weist darauf hin, dass durch die Veränderung der Zusammensetzung des Puffers die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Träger weitestgehend unterbunden wurden. NaCl und Triton X-100 sind häufig gewählte Zusätze in Kopplungspuffern, um eine unspezifische Adsorption über ionische und hydrophobe Wechselwirkungen zu verringern [Rodrigues *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2012]. Bei der Untersuchung der Kopplung von LipT1-CQ nach MTG-Zugabe konnten beim Einsatz von MWP 33 % der initial eingesetzten Lipase-Aktivität nicht an den Träger gebunden

werden. Im Fall der Verwendung von Puffer MKP lag dieser Wert bei 20 %. Dennoch wurde infolge des Pufferwechsels eine 1,4-fach erhöhte trägergebundene Aktivität (2,34 U_C/g) erhalten. Ebenso stieg der Anteil der auf dem Träger nachweisbaren Aktivität von 14 % auf 22 %.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Waschpuffer MWP auch zur Kopplung der Lipase LipT1-CQ eingesetzt werden kann. Die Veränderung der Pufferzusammensetzung bewirkt dabei eine Verringerung der unspezifischen Proteinadsorption.

Der Einfluss weiterer Kopplungsbedingungen wird in den Abschnitten 3.2.1.8 (Trägerbeladung) und 3.2.1.9 (Kopplungsdauer, MTG-Zugabe) behandelt.

3.2.1.7 Direkte Kopplung der Lipase-Varianten aus *E. coli* -Rohextrakt

Die vorangegangenen Versuche belegen, dass unter Einsatz von MTG eine gezielte Immobilisierung der Q-tag-Lipasen möglich ist. Die hohe Spezifität der MTG gegenüber diesen Lipasen-Varianten sollte nun ausgenutzt werden, um eine Kopplung ohne vorherige chromatographische Reinigung der Lipasen durchzuführen. Das Ziel dieser Versuche war die Untersuchung, ob eine Immobilisierung auch bei Verwendung von lipasehaltigem *E. coli* -Rohextrakt stattfindet. Zu diesem Zweck wurde der jeweils nach Zellaufschluss und Zentrifugation (Abschnitt 2.9.6.1) erhaltene Rohextrakt mit Puffer MWP auf eine Startaktivität von 1,5 U_C/mL verdünnt und anschließend mit MTG und Träger inkubiert (Abschnitt 2.9.12). Da Nebenreaktionen der MTG im Rohextrakt nicht ausgeschlossen werden konnten, wurde die Reaktionszeit auf 120 min verlängert.

Die Abbildung 3-10 A verdeutlicht, dass die Aktivität beider Lipasen in der Kontrolle ohne Träger („Stabilität“) nahezu konstant blieb. Daraus konnte geschlossen werden, dass während der Inkubation weder ein Lipase-Abbau durch *E. coli* - eigene Proteasen auftrat noch eine mögliche Quervernetzung der Zielproteine mit *E. coli* - Wirtszellproteinen deren Aktivität beeinträchtigte.

In den Kopplungsansätzen wurde für beide Lipase-Varianten eine ähnliche Abnahme der Aktivität im Überstand festgestellt (60 – 66 %), die jedoch deutlich niedriger ausfiel als in vorherigen Versuchen zur Kopplung gereinigter Lipasen. Folglich war auch die messbare trägergebundene Aktivität niedriger als in vorherigen Untersuchungen. Für NQ-LipT1 und LipT1-CQ wurden 0,9 U_C/g bzw. 1,3 U_C/g erhalten. Der Anteil der auf dem Träger wiedergefundenen Aktivität war allerdings vergleichbar mit den bisher erzielten Werten (NQ-LipT1: 18 %; LipT1-CQ: 22 %).

Eine zielgerichtete Kopplung war demnach auch direkt aus lipasehaltigem Rohextrakt möglich. Im Hinblick auf die verringerten Aktivitäten konnte nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzliche Interaktionen der *E. coli* -eigenen Proteine mit dem Trägermaterial bzw. den Lipase-Molekülen die Kopplungsreaktion negativ beeinflussten. Um diese möglichen Effekte bei der Immobilisierung ausschließen zu können, wurden in allen nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich gereinigte Lipase-Präparate eingesetzt.

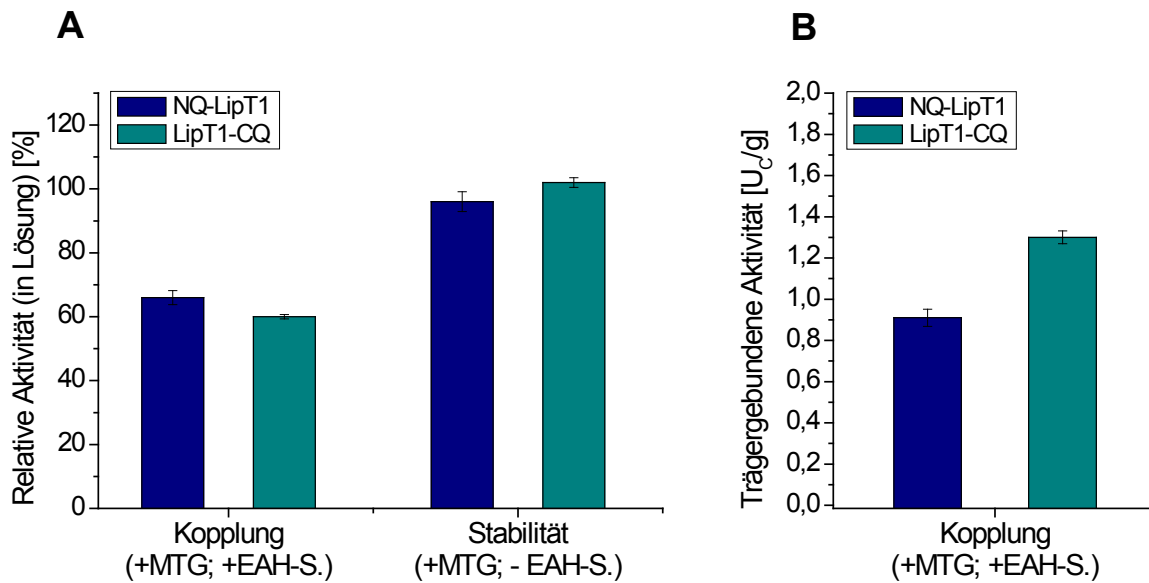


Abbildung 3-10: Aktivität löslicher (A) und trägergebundener (B) Lipase bei der Immobilisierung mittels MTG aus Rohextrakt. Es wurden 100 mg des Trägers EAH-Sepharose mit 1,5 U_C des jeweiligen lipasehaltigen *E. coli*-Rohextraktes in Puffer MWP (50 mM Tris/HCl pH 8 mit 500 mM NaCl und 0,5 % (w/v) Triton X-100) in Anwesenheit („Kopplung“) von 0,5 U MTG bei 37 °C und 800 rpm für 120 min inkubiert. Als Stabilitätskontrolle dienten Ansätze mit Lipase und MTG (ohne Träger). Das Waschen des Trägers erfolgte in vier Durchgängen mit Puffer MWP. Die Lipase-Aktivität wurde colorimetrisch mit Hilfe des Substrates *p*NPP bestimmt (n=3). Die relative Aktivität beschreibt die nach der Inkubation im Überstand messbare Lipase-Aktivität bezogen auf die zu Beginn eingesetzte Aktivität.

3.2.1.8 Untersuchung der Trägerbeladung

Bei allen durchgeführten Versuchen zur Immobilisierung mittels MTG wurde beobachtet, dass die Kopplung der Lipasen nie vollständig ablief sondern jeweils ein Teil der Aktivität im Kopplungsüberstand zurück blieb. Eine mögliche Ursache für die unvollständige Lipase-Kopplung könnte eine Überschreitung der Trägerkapazität darstellen. Dies wäre der Fall, wenn mehr *Q-tag*-haltige Lipase-Moleküle im Reaktionsansatz enthalten sind als Aminogruppen auf dem Trägermaterial zur Verfügung stehen. In allen Ansätzen wurde jedoch ein deutlicher molarer Überschuss an Aminogruppen (> 12.000-fach) eingesetzt. Allerdings ist davon auszugehen, dass nicht alle Aminogruppen des Trägers für die Kopplungsreaktion gleichermaßen zugänglich waren.

Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Trägerbeladung untersucht, um auszuschließen, dass die unvollständige Kopplung durch eine Überladung des Trägers hervorgerufen wurde. Zu diesem Zweck wurde bei konstanter Einwaage des Trägermaterials die Menge der Lipase LipT1-CQ im Ansatz variiert. Ausgehend vom bisherigen Verhältnis aus Startaktivität zu Trägermenge von 15 U_C/g wurde ein Bereich zwischen 0,75 U_C/g und 40 U_C/g gewählt. Die Kopplungs- und Waschschrte erfolgten wie in Abschnitt 2.9.12 beschrieben. Die MTG-Konzentration wurde in den Ansätzen nicht verändert (je 0,5 U_{MTG}/mL), um zusätzliche Effekte auf die Trägerkapazität zu vermeiden. Daraus ergaben sich jeweils unterschiedliche Enzym-Substrat-Verhältnisse, wodurch ein Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Reaktion nicht ausgeschlossen werden konnte. Aus diesem Grund wurde eine Reaktionszeit von 3 h gewählt und in regelmäßigen Abständen die Lipase-Aktivität im Überstand bestimmt.

Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abbildung 3-11 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass mit steigender Startaktivität die Lipase-Aktivität auf dem Träger zunimmt. Der Verlauf bis 30 U_c/g deutet auf eine lineare Abhängigkeit hin. Das abweichende Verhalten bei 40 U_c/g könnte ein Indiz dafür sein, dass mit zunehmender Startaktivität eine Sättigung der verfügbaren Bindeplätze auf dem Träger eintritt. Unter den gewählten Bedingungen wurde die maximale Trägerkapazität nicht erreicht.

In Tabelle 3-6 sind neben den trägergebundenen Aktivitäten auch die jeweils erhaltenen Restaktivitäten im Überstand aufgeführt. Daran ist ersichtlich, dass auch bei sehr niedrigen Trägerbeladungen die Lipase-Kopplung nicht vollständig ablief. Somit konnte, auch im Fall zuvor durchgeführter Versuche, eine Überladung des Trägers als Ursache für die unvollständige Kopplung ausgeschlossen werden.

Tabelle 3-6: Variation der Trägerbeladung bei der Immobilisierung von LipT1-CQ an EAH-Sepharose mittels MTG. Prozentangaben sind bezogen auf die jeweils eingesetzte Startaktivität (n=3).

Startaktivität/ Trägermenge [U _c /g]	Lipase-Restaktivität Überstand [%]	Trägergebundene Aktivität [U _c /g]	Wiederfindung Aktivität Träger [%]
0,75	33	0,12 ± 0,01	24
7,5	34	1,41 ± 0,04	28
15	35	2,47 ± 0,09	25
30	33	4,95 ± 0,03	25
40	43	5,99 ± 0,14	26

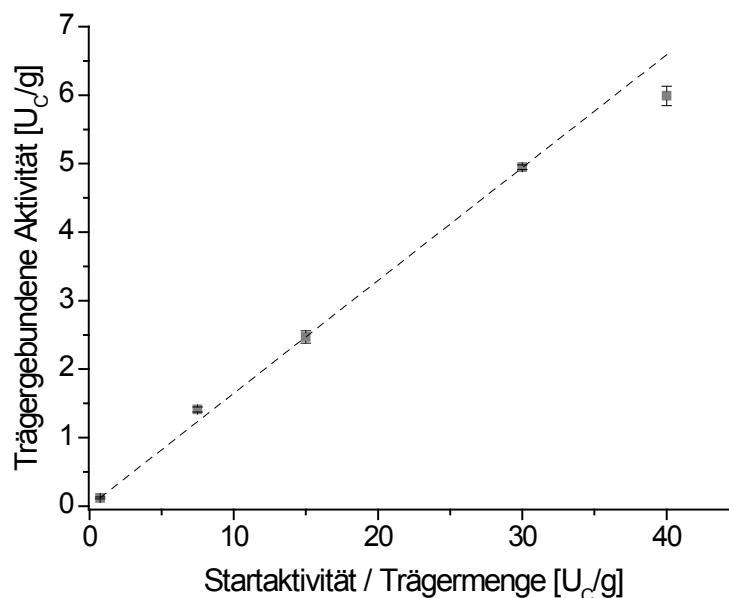


Abbildung 3-11: Trägergebundene Aktivität der Lipase LipT1-CQ in Abhängigkeit der zur Kopplung eingesetzten Startaktivität. Es wurden jeweils 100 mg des Trägers EAH-Sepharose mit unterschiedlichen Mengen LipT1-CQ in 1 mL Puffer MWP (50 mM Tris/HCl pH 8 mit 500 mM NaCl und 0,5 % (w/v) Triton X-100) in Anwesenheit von 0,5 U MTG bei 37 °C und 800 rpm für 3 h inkubiert. Das Waschen des Trägers erfolgte in vier Durchgängen mit Puffer MWP. Die Lipase-Aktivität wurde colorimetrisch mit Hilfe des Substrates pNPP bestimmt (n = 3).

Die Restaktivitäten im Überstand lagen in den meisten Ansätzen bei etwa 34 %. Demnach scheint der nicht koppelbare Anteil der Lipase-Aktivität über einen weiten Bereich unabhängig von der eingesetzten Lipase-Menge zu sein. Einzig bei einer Startbeladung mit 40 U₀/g stieg die Restaktivität im Überstand auf 43 % an. Ebenso war der Anteil der auf dem Träger wiederfindbaren Aktivität mit Werten zwischen 24 % und 28 % nahezu konstant. Scheinbar besteht unter den gewählten Beladungen keine direkte Abhängigkeit zwischen eingesetzter Aktivität und der Wiederfindung auf dem Träger.

Prinzipiell konnte aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die bisher beobachtete unvollständige Kopplung nicht durch eine Trägerüberladung hervorgerufen werden konnte. Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Versuchen der Einfluss des Kopplungsenzyms MTG genauer untersucht.

3.2.1.9 Einfluss der mehrmaligen MTG-Zugabe auf die Lipase-Kopplung

In Kapitel 3.2.1.8 konnte das Überschreiten der Trägerkapazität als mögliche Ursache für die unvollständige Kopplung der *Q-tag*-Lipase ausgeschlossen werden. Daher wurde anschließend untersucht, ob unter den gewählten Reaktionsbedingungen eine Inaktivierung des Kopplungsenzyms MTG auftritt und ob durch eine erneute Zugabe von MTG im Verlauf der Reaktion die koppelbare Lipase-Menge gesteigert werden kann.

Der Versuch wurde wie in Abschnitt 2.9.12 beschrieben durchgeführt. Die Kopplungsreaktion wurde durch Zugabe von 0,5 U MTG gestartet und die Lipase-Aktivität im Überstand über 3 h verfolgt. Nach 1 h wurde erneut die gleiche Menge MTG zugegeben. Am Verlauf der Restaktivität in Abbildung 3-12 ist zu erkennen, dass vor erneuter MTG-Zugabe ~ 38 % der eingesetzten Lipase-Menge nicht an den Träger gekoppelt wurden. Die Restaktivität blieb auch nach der zusätzlichen Zugabe des Kopplungsenzyms nach 1 h nahezu konstant. Die leichte Verringerung der Restaktivität im Kopplungsansatz nach 2 h auf 35 % konnte auf Messwertschwankungen zurückgeführt werden, die anhand der mitgeführten Kontrollprobe ohne Träger und MTG deutlich wurden. Die Kontrolle zeigte abgesehen von geringfügigen Schwankungen (< 5 %) im Verlauf der Inkubation keine wesentlichen Veränderungen der Aktivität.

Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass die Kopplungsreaktion nach 1 h abgeschlossen war und eine zweite MTG-Zugabe die Lipase-Restaktivität im Überstand nicht beeinflusste. Demnach konnte eine Inaktivierung des Kopplungsenzyms MTG nicht als Ursache für die unvollständige Immobilisierung der Lipase identifiziert werden.

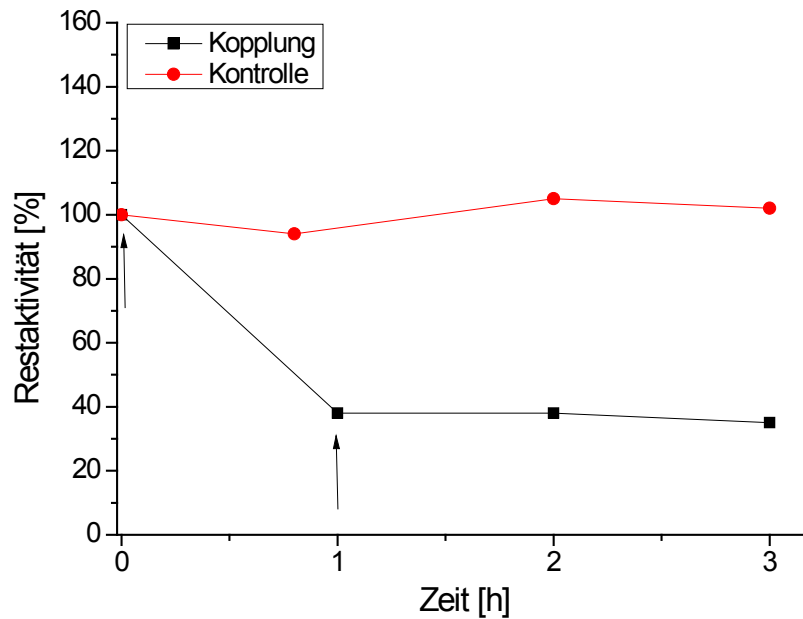


Abbildung 3-12: Verlauf der LipT1-CQ-Aktivität im Überstand bei der Immobilisierung mittels MTG. Es wurden 100 mg des Trägers EAH-Sepharose mit 1,5 U_C der Lipase LipT1-CQ in Puffer MWP (50 mM Tris/HCl pH 8 mit 500 mM NaCl und 0,5 % (w/v) Triton X-100) in Anwesenheit („Kopplung“) von MTG bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Zugabe von jeweils 0,5 U MTG. Als Stabilitätskontrolle wurde LipT1-CQ ohne MTG und Träger unter identischen Bedingungen mitgeführt. Die Lipase-Aktivität wurde colorimetrisch mit Hilfe des Substrates pNPP bestimmt. Die relative Aktivität beschreibt die während der Inkubation im Überstand messbare Lipase-Aktivität bezogen auf die zu Beginn eingesetzte Aktivität.

3.2.1.10 Untersuchung der Desaminierung des Q-Tags

Die Ergebnisse aus den Abschnitten 3.2.1.8 und 3.2.1.9 haben gezeigt, dass die nicht vollständig ablaufende Kopplung weder auf eine Trägerüberladung noch auf eine MTG-Inaktivierung zurückgeführt werden kann. Daher wurde nun als dritter Reaktionspartner die Lipase, speziell der nicht koppelbare Anteil, näher betrachtet und dessen „Restreaktivität“ bei der MTG-vermittelten Immobilisierung untersucht.

In verschiedenen Untersuchungen zur Substratspezifität von Transglutaminasen wurde festgestellt, dass diese Enzymgruppe neben der Übertragung von Lysinresten auf proteingebundene Glutaminreste verschiedene primäre Amine nutzen kann (Abschnitt 1.2.3). In Abwesenheit einer Aminkomponente kann auch Wasser als Acyl-Akzeptor fungieren, wobei das proteinogene Glutamin in Glutamat umgewandelt wird [Ohtsuka *et al.*, 2000a; Kamiya *et al.*, 2003a; Hong und Xiong, 2012]. Im Fall der MTG-basierten Lipase-Immobilisierung würde dies eine irreversible Modifikation des Q-Tags der Lipase bedeuten und folglich eine Enzymkopplung an das Trägermaterial verhindern.

In diesem Zusammenhang wurde, in Analogie zu den Experimenten aus Abschnitt 3.2.1.3, zunächst versucht den Q-Tag der nicht gekoppelten Lipase nachzuweisen. Dazu wurde die Immobilisierung wie zuvor erläutert durchgeführt (Abschnitt 3.2.1.6) und die nach der Kopplung im Überstand verbliebene Lipase mit MDC versetzt. Nach Analyse mittels SDS-PAGE und UV-Licht konnten, im Gegensatz zur Positivkontrolle mit unbehandelter Lipase, im Kopplungsüberstand keine fluoreszierenden Banden festgestellt werden (Daten nicht

gezeigt). Offensichtlich fand keine kovalente Verknüpfung zwischen Lipase und MDC statt, was ein Indiz für eine MTG-katalysierte Desaminierung des Q-Tags während der Kopplung darstellte. Zur Bestätigung dieses Befunds sollte im nächsten Schritt die Modifikation des Glutaminrestes im *tag* mittels Trypsin-Verdau und Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Die Kopplungsbedingungen aus Abschnitt 2.9.12 wurden entsprechend angepasst: Es wurde eine hohe Lipase-Startkonzentration von 3,22 U_C/mL eingesetzt, um die Detektion der entsprechenden Peptide zu verbessern. Ebenso wurden Träger- und MTG-Menge erhöht, um die gleichen Verhältnisse zu erreichen (15 U_C/g und 0,33 U_{MTG}/ U_C). Die Kopplung erfolgte in Puffer MKP, da sich die Komponente Triton X-100 des Puffers MWP störend auf die MS-Analyse ausgewirkt hätte. Nach Ablauf der Kopplungsreaktion bei 37 °C für 60 min wurde der Überstand bei 16.100 x g abgetrennt, zu gleichen Volumina aufgeteilt und entweder für 10 min bei 99 °C inkubiert und dann auf 4 °C abgekühlt (Probe R1-99°C) oder durchgängig bei 4 °C inkubiert (Probe R1-4°C). Ziel der Inkubation bei hoher Temperatur war die Inaktivierung der MTG, wodurch ungewünschte Quervernetzungsreaktionen in den nachfolgenden Schritten vermieden werden sollten. Um Adsorptions- und Grenzflächeneffekte auszuschließen, wurde als Vergleichsprobe ein Reaktionsansatz mit MTG und Lipase, aber ohne Trägermaterial mitgeführt (Proben R2-99°C und R2-4°C). Als Kontrollen dienten Proben mit unbehandelter Lipase LipT1-CQ, d.h. ohne Zusatz von MTG und EAH-Sepharose, die entweder ebenfalls bei 99 °C für 10 min inkubiert (Probe K1-99°C) oder durchgängig bei 4 °C gelagert wurden (Probe K2-4°C). Die Details zur Probenvorbereitung und Durchführung der MS-Analytik sind in Abschnitt 2.9.13 beschrieben. Nach Durchführung des Trypsin-Verdau konnten mittels ESI-MS die Massen der entstandenen Peptide bestimmt werden. Im MS/MS Modus konnten diese Peptide weiter fragmentiert werden, so dass eine Sequenzbestimmung der einzelnen Peptide möglich war. Die identifizierten Peptide der Kopplungsprobe R1-99°C nach Trypsin-Verdau sind in Abbildung 3-13 dargestellt. Tabelle 3-7 zeigt die in den verschiedenen Proben identifizierten Varianten des Zielpeptides (= Q-*tag*-beinhaltendes Peptid). Bis auf Reaktionsansatz R1-4°C wurde das Zielpeptid in allen Proben gefunden werden. Im Reaktionsansatz R2 konnte, unabhängig von der Temperatur während der Probenvorbereitung, eindeutig das modifizierte Zielpeptid mit Glutamat nachgewiesen werden. Das Ausgangspeptid mit Glutamin wurde nicht identifiziert. In Probe R1-99°C traten beide Varianten des Zielpeptides auf. Eine Quantifizierung des Anteils an unmodifiziertem Zielpeptid war nicht möglich. Die Daten lassen vermuten, dass durch die Anwesenheit des Trägermaterials die Modifikation nicht vollständig ablief. In Kontrolle K2-4°C wurde nur das Ausgangspeptid ohne Modifikation gefunden, wohingegen Kontrolle K1-99°C zusätzlich eine semi-tryptische Variante des Peptids mit Glutamat aufwies. In diesem Zusammenhang kann somit nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die Hitzeeinwirkung bei der Probenvorbereitung die Hydrolyse von Glutamin beeinflusste.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die nicht stattfindende MDC-Markierung der Lipase aus dem Kopplungsüberstand einen Hinweis auf den Ablauf einer Modifikation darstellte. Diese Modifikation konnte mittels massenspektrometrischer Analysen bestätigt werden. In den Reaktionsansätzen, die LipT1-CQ und MTG enthielten, konnte das modifizierte Zielpeptid eindeutig nachgewiesen werden. Demzufolge kann die unvollständige Immobilisierung der Lipase auf eine MTG-katalysierte Desaminierungsreaktion zurückgeführt werden.

1 MASLRANDAPIVLLHGFTGWGREEMFGFKYWGGVRGDIE
 40 QWLNDNGYRTFTLAVGPLSSNWDRACEAYAQLVGGTVDYG
 80 AAHAAKHGHARFGRTYPGLLELKRGGRIHIIAHSQGGQT
 120 ARMLVSLLENGSQEEREYAKAHNVSLSPLEGGHHFVLSV
 160 TTIATPHDGTTLVNMVDFTDRFFDLQKAVLEAAVASNP
 200 YTSQVYDFKLDQWGLRRQPGESFDHYFERLKRSPVWTSTD
 240 TARYDLSVSGAEKLNQWVQASPNTYYLSFSTERTYRGALT
 280 GNHYPELGMNAFSAVVCAPFLGSYRNPTLGIDDRWLENDG
 320 IVNTVSMNGPKRGSSDRIVPYDGTLLKKGVWNDMGTYNVDH
 360 LEIIGVDPNPSFDIRAFYLR LAEQLASLQPGGGSMLEYQ(E)RS
 400 LEHHHHHH

Abbildung 3-13: Sequenzabdeckung der Lipase LipT1-CQ entsprechend der ESI-MS-Analyse nach Inkubation mit MTG und EAH-Sepharose (Probe R1-99°C). Identifizierte Peptide sind gelb unterlegt; das Zielpeptid ist fett dargestellt; die Modifikationsposition im Immobilisierungs-tag ist rot unterlegt.

Tabelle 3-7: Nach Trypsin-Verdau und ESI-MS identifizierte Varianten des Zielpeptides. In der Reaktion wurden 3,22 U_C/mL der Lipase LipT1-CQ in Puffer MKP eingesetzt. Den Reaktionsproben („R1“ und „R2“) wurde MTG (Zielkonzentration 1 U_{MTG}/mL) zugesetzt, wobei die Reaktion in An- („R1“) bzw. Abwesenheit („R2“) von 215 mg EAH-Sepharose stattfand. Die Kontrollen („K1“ und „K2“) enthielten weder MTG noch EAH-Sepharose. Die Inkubation erfolgte über 60 min bei 37 °C. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Proben entweder für 10 min bei 99 °C inkubiert (Inaktivierung MTG) oder durchgängig bei 4 °C gelagert. Die Probenvorbereitung und Durchführung der MS-Analytik sind in Abschnitt 2.9.13 beschrieben. Der Q- bzw. E-Rest im Zielpeptid ist rot hervorgehoben.

Probe	Zusatz MTG	Zusatz EAH-Sepharose	Identifizierte Varianten des Zielpeptids	Sequenzabdeckung
R1-99°C	+	+	-LAEQLASLQPGGGSMLEYER- sowie -LAEQLASLQPGGGSMLEYQ-	48 %
R1-4°C	+	+	-	16 %
R2-99°C	+	-	-LAEQLASLQPGGGSMLEYER-	21 %
R2-4°C	+	-	-LAEQLASLQPGGGSMLEYER-	29 %
K1-99°C	-	-	-LAEQLASLQPGGGSMLEYQR- sowie -SLQPGGGSMLEYER- (semi-tryptisch)	32 %
K2-4°C	-	-	-LAEQLASLQPGGGSMLEYQR-	26 %

3.2.1.11 Wiederverwendbarkeit der immobilisierten Lipase LipT1-CQ

Unabhängig von der zuvor beobachteten unvollständig ablaufenden Kopplung sollte im nächsten Schritt die Stabilität der an EAH-Sepharose immobilisierten Lipase LipT1-CQ untersucht werden. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die kovalente Kopplung der Lipase an das Trägermaterial einen wiederholten Einsatz ermöglicht. Die Immobilisierung der Lipase LipT1-CQ erfolgte wie in Abschnitt 2.9.12 beschrieben mit Puffer MWP (50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 0,5 % (w/v) Triton X-100).

In Vorversuchen zum wiederholten Einsatz des Immobilisats wurde festgestellt, dass trotz mehrfacher Waschschrte im Anschluss an die Kopplung keine vollständige Entfernung der adsorptiv gebundenen Lipase realisierbar war. Aus diesem Grund wurde die Vorgehensweise angepasst. Das Immobilisat wurde zunächst mit Puffer MWP II (50 mM Tris pH 8, 1 M NaCl, 1 % (w/v) Triton X-100) und anschließend mit Assay-Puffer gewaschen. Die Details der Durchführung sind in Abschnitt 2.9.14 aufgeführt.

Das Ergebnis zur wiederholten Verwendung des Immobilisats ist in Abbildung 3-14 dargestellt. Während der ersten sechs Reaktionszyklen verringerte sich die Lipase-Restaktivität auf dem Träger auf 72 %. Ein weiterer Aktivitätsverlust konnte in den darauffolgenden Zyklen nicht beobachtet werden. Die Restaktivität der Durchgänge 6 -12 schwankte um einen Wert von 76 % (entspricht 1,72 U_C/g). Demnach scheint die immobilisierte Lipase unter den gewählten Bedingungen stabil zu sein.

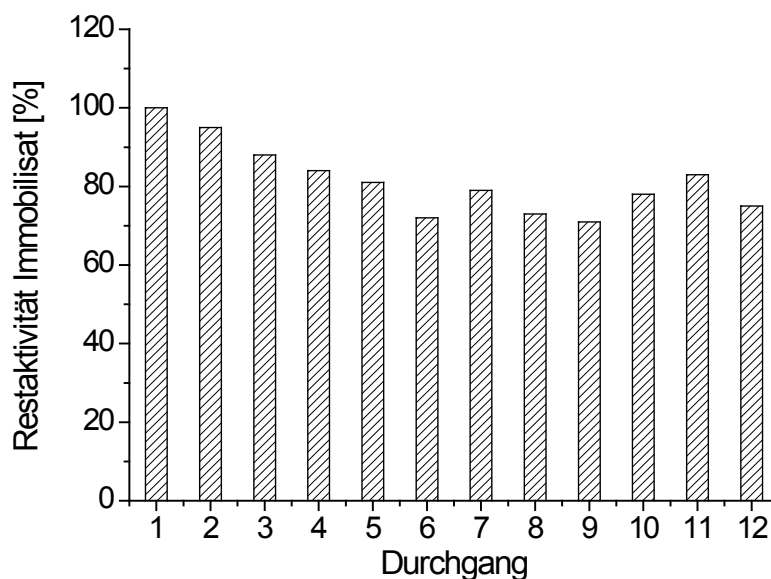


Abbildung 3-14: Stabilitätsuntersuchung der auf EAH-Sepharose immobilisierten Lipase LipT1-CQ bei wiederholtem Einsatz zur Hydrolyse von pNPP. 100 mg des Trägers EAH-Sepharose wurden mit 1,5 U_C der Lipase LipT1-CQ in Puffer MWP in Anwesenheit von 0,5 U_{MTG} bei 37 °C und 800 rpm für 60 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Immobilisats mit jeweils 1,5 mL Puffer MWP II und Assay-Puffer wurde das Immobilisat zur Hydrolyse des Substrates pNPP eingesetzt. Das Waschen des Trägers zwischen den Zyklen erfolgte mit 50 mL Puffer MWP ohne Triton X-100 sowie 1 mL MWP. Die Restaktivität beschreibt die im jeweiligen Durchgang gemessene Aktivität bezogen auf die Ausgangsaktivität des Immobilisats (Restaktivität von 100 % entspricht 2,3 U_C/g).

Zusammenfassend konnte aus den Ergebnissen (Abschnitt 3.2.1.2 - 3.2.1.11) geschlossen werden, dass durch Fusion von *Q-tag* und LipT1 eine zielgerichtete Immobilisierung mit Hilfe von MTG realisiert werden kann. Die Kopplung konnte sehr spezifisch und unter milden Bedingungen durchgeführt werden. Weiterhin war der mehrmalige Einsatz der immobilisierten Lipase in einer Modellreaktion möglich.

Allerdings wurden bei den Untersuchungen auch Nachteile der Methode festgestellt. Zum einen war keine vollständige Kopplung der eingesetzten Lipase möglich. In einer unerwünschten Nebenreaktion wurde der reaktive Glutamin-Rest im *Q-tag* desaminiert, wodurch die Kopplungsausbeute von rund 66 % nicht gesteigert werden konnte. Zum anderen konnten im Durchschnitt lediglich 25 % der theoretisch gekoppelten Aktivität auf dem Träger wiedergefunden werden. Aufgrund der Porosität des Trägermaterials kann eine Diffusionslimitierung des Substrates nicht ausgeschlossen werden. In Abschnitt 4.3.1 werden die Einflüsse der Porengröße sowie der Abmessungen von Substrat und Enzym auf die Aktivitätsbestimmung diskutiert.

Die erzielten Erkenntnisse motivierten dazu, in anschließenden Experimenten alternative Strategien zur zielgerichteten Immobilisierung zu verfolgen.

3.2.2 Lipase-Immobilisierung über Thiolgruppen

Als eine Alternative zur MTG-basierten Kopplung wurde die Lipase-Immobilisierung über Thiolgruppen untersucht. Thiolgruppen treten als funktionelle Seitengruppen von Cysteinresten in Proteinstrukturen vergleichsweise selten auf. Diese geringe Abundanz erleichtert es, die Orientierung des Enzyms bei der Trägerkopplung zu kontrollieren. Im Zuge dessen wurden mehrere Varianten der Lipase LipT1 entwickelt, die an verschiedenen Positionen gezielt mit Cys-Resten modifiziert wurden. Um Nebenreaktionen bzw. unerwünschte Orientierungen auf dem Träger zu vermeiden, war zudem ein Ersetzen der zwei nativen Cys-Reste der Lipase (C64 und C295) notwendig. Grundsätzlich wurde ein konservativer Aminosäureaustausch angestrebt. Es wurde darauf geachtet, dass die Aminosäuren eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen und die Nettoladung des Proteins nicht verändert wird. In diesem Zusammenhang bieten sich Cys↔Ser - Austausche besonders an. Die zu verändernden Positionen wurden auf Grundlage der Tertiärstruktur der T1 Lipase (PDB-Eintrag 2DSN, [Matsumura *et al.*, 2008]) festgelegt. Besonderer Wert wurde darauf gelegt, dass diese Positionen nicht innerhalb von Sekundärstrukturelementen liegen, um die native Proteinfaltung nicht zu beeinflussen. Zusätzlich sollten die Mutationen auf der dem aktiven Zentrum abgewandten Seite der Proteinoberfläche liegen, damit nach der Trägerfixierung das aktive Zentrum exponiert vorliegt. Weiterhin sollten die Positionen auf der Proteinoberfläche eine definierte Ebene bilden, um bei Einfügen von mehr als einer Mutation die Möglichkeit einer Mehrpunktfixierung des Enzyms zu schaffen.

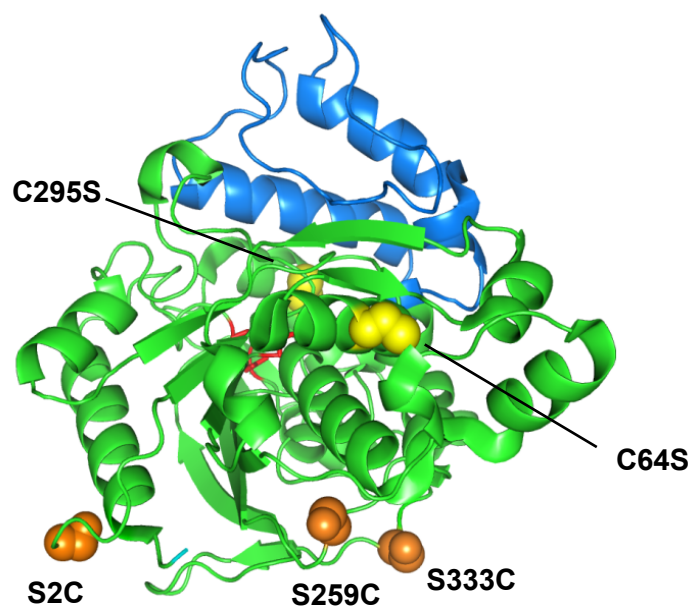


Abbildung 3-15: Positionen der Aminosäureaustausche innerhalb der Lipase-Variante LipT1-SXC. Ser→Cys-Substitutionen (S2C, S259C, S333C) in orange (*spheres*); Cys→Ser-Substitutionen (C64S, C295S) in gelb (*spheres*); Aminosäuren des aktiven Zentrums (S113, D317, H358) in rot (*sticks*); Deckelregion (L170 – A240) in blau. *Ribbon*-Darstellung erstellt mit *pymol* basierend auf PDB-Eintrag 2DSN [Matsumura *et al.*, 2008].

Ausgehend von diesen Kriterien wurden anhand der vorhandenen Strukturdaten der Lipase die Positionen S2, S259 sowie S333 zur Substitution durch Cys-Reste ausgewählt. Es wurden insgesamt drei Mutanten der Lipase LipT1 erstellt, die jeweils einen Ser→Cys Austausch enthielten sowie eine Variante mit der Kombination der drei Mutationspositionen (Abschnitt 2.5). In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, inwiefern eine Mehrpunktfixierung des Enzyms möglich ist und ob dadurch die Stabilität auf dem Träger erhöht werden kann. Die verschiedenen Mutationspositionen innerhalb der Lipase-Struktur sind in Abbildung 3-15 schematisch dargestellt.

3.2.2.1 Untersuchung der Multimerisierung der LipT1-Cys-Varianten

Vor Durchführung der Untersuchungen zur Immobilisierung der Cys-Varianten sollte zunächst überprüft werden, ob durch die zusätzlichen, auf der Proteinoberfläche exponierten Cys-Reste die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken hervorgerufen wird. Die Bildung disulfidverbrückter Lipase-Multimere würde eine zielgerichtete Kopplung an ein entsprechendes Trägermaterial negativ beeinflussen und unter Umständen vollständig verhindern.

Die Produktion und Reinigung der verschiedenen Cys-Varianten erfolgte analog zur LipT1-WT (Abschnitte 2.9.3 und 2.9.7.2). Die Aktivität der Mutanten gegenüber *p*NPP wird in Abschnitt 3.2.2.2 behandelt.

Zur Untersuchung der potentiellen Multimerisierung wurden die Lipase-Varianten mittels SDS-PAGE analysiert. Der standardmäßig zur Probenvorbereitung genutzte Probenpuffer enthielt das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol (β -ME), um vorhandene Disulfidbrücken zu freien Thiolen zu reduzieren. Durch die Inkubation der Lipasen in An- bzw. Abwesenheit von β -ME vor Durchführung der SDS-PAGE sollte das mögliche Auftreten von Lipase-Multimeren nachgewiesen werden. In Vorbereitung auf die SDS-PAGE-Analyse wurden die gereinigten Lipase-Varianten jeweils auf eine Proteinkonzentration von 0,04 mg/mL verdünnt und für 5 min bei 99 °C inkubiert. Zur Verdünnung der Proben wurde jeweils Probenpuffer mit bzw. ohne 1 % (v/v) β -ME verwendet. Zur Auswertung des SDS-PAGE-Gels wurden die Molekulargewichte der Proteinbanden mittels Geldokumentation (GeneGenius, GeneTools; Syngene) bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte über den aufgetragenen Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM0431).

Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abbildung 3-16 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass sowohl in An- als auch in Abwesenheit von β -ME der größte Teil der Cys-Varianten in monomerer Form vorliegt. Für die Varianten S2C (Bahn 3) und S333C (Bahn 7) konnten ohne eine Vorbehandlung der Proben mit β -ME im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle deutliche Banden bei ca. 86 kDa festgestellt werden. Bei einem theoretischen Molekulargewicht von 44 kDa deutet dies auf die Ausbildung von disulfidverbrückten Lipase-Dimeren hin. Im Fall der Variante SXC, die drei Cys-Reste auf der Oberfläche trägt, waren ohne β -ME-Behandlung (Bahn 9) zahlreiche weitere Banden unter anderem bei 82 und 116 kDa sowie verschiedene höhermolekulare Banden außerhalb des Kalibrierbereiches erkennbar. Das beobachtete Bandenmuster spricht für eine Multimerisierung der Mutante SXC über die Bildung von Disulfidbrücken. Da jedoch die Molekulargewichte der Banden nur in Einzelfällen dem Vielfachen eines Lipase-Monomers entsprachen, konnten auch Wechselwirkungen zwischen Lipase-Molekülen und noch enthaltenen *E. coli*-

Wirtszellproteinen nicht ausgeschlossen werden. Für Mutante S259C konnte der Effekt der Multimerisierung, speziell der Dimerisierung, nicht eindeutig festgestellt werden (Bahn 4 und 5). Beide Proben zeigten in An- und Abwesenheit von β -ME ein nahezu identisches Bandenmuster. Ebenso wies die Lipase LipT1-WT (Bahn 11) keine zusätzlichen Banden in Abwesenheit von β -ME. In nativer Konformation sind die beiden Cys-Reste C64 und C295 nicht auf der Oberfläche exponiert, so dass die Entstehung von intermolekularen Disulfidbrücken unwahrscheinlich ist. Die Veränderungen des Bandenmusters im Vergleich zu Bahn 10 sind somit auf die Wechselwirkungen verschiedener Hintergrundproteine untereinander zurückzuführen.

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass sowohl die Mutationsposition als auch die Anzahl der Cys-Mutationen das Multimerisierungsverhalten der Lipasen beeinflussen. Das fehlende Auftreten von Dimeren bei Variante S259C könnte für eine schlechtere Zugänglichkeit der Thiolgruppe auf der Proteinoberfläche sprechen.

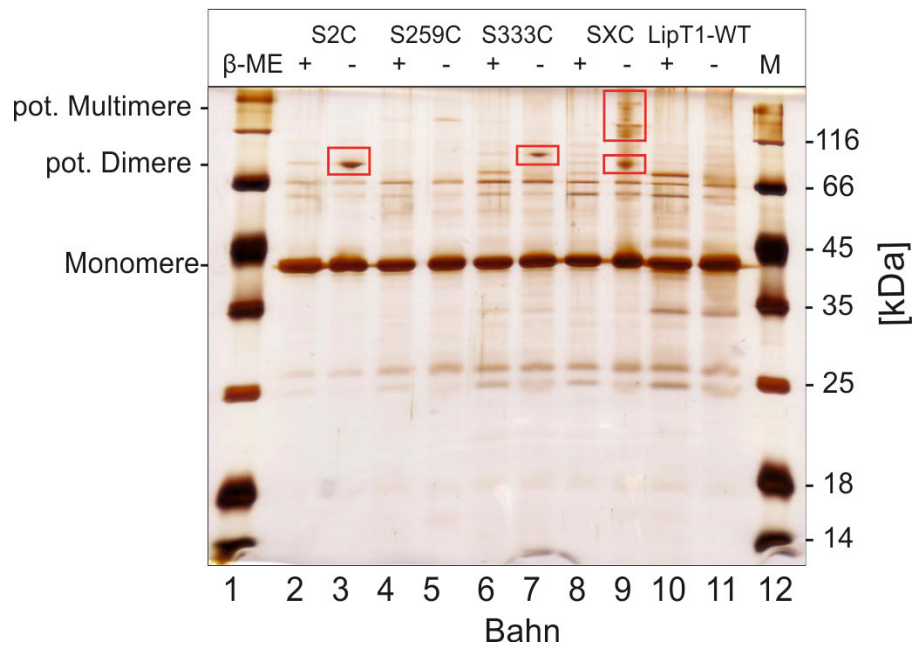


Abbildung 3-16: SDS-PAGE zur Analyse der Multimerisierung verschiedener Cys-Varianten der Lipase LipT1 in An- und Abwesenheit von β -Mercaptoethanol. Die gereinigten Lipase-Proben wurden mit SDS-PAGE-Probenpuffer (mit bzw. ohne 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol) auf 0,04 mg/mL verdünnt, 5 min bei 99 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Silberfärbung. Theo. MW LipT1-WT: 44 kDa.

3.2.2.2 Einfluss des Reduktionsmittels DTT auf die Lipase-Aktivität

Durch die zuvor beobachtete Multimerisierung der Cys-Varianten in Abwesenheit eines Reduktionsmittels konnte ein negativer Einfluss auf die geplante zielgerichtete Kopplung der Lipasen nicht ausgeschlossen werden. Zur Vermeidung dessen war eine Behandlung der gereinigten Lipase-Präparate mit einem Reduktionsmittel vor der eigentlichen Kopplung notwendig. Da Dithiothreitol (DTT) im Vergleich zu β -ME verschiedene Vorteile u.a. hinsichtlich Reduktionspotential, Stabilität und Geruchsbildung besitzt [Cleland, 1964], wurde DTT als Reduktionsmittel für die weiteren Untersuchungen gewählt.

In einem Vorversuch konnte mittels SDS-PAGE gezeigt werden, dass DTT unter den gewählten Bedingungen die gleiche Wirkung zum Auflösen disulfidverbrückter Lipase-Multimere wie β -ME besitzt (Abbildung 8-12; Anhang). Nun sollte der Einfluss der DTT-Behandlung auf die Aktivität der Lipase-Varianten untersucht werden. Die Durchführung erfolgte gemäß Literatur [Godoy *et al.*, 2011b]. Nach der Verdünnung der Enzymlösung mit 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 mit und ohne Zusatz von 25 mM DTT auf eine Konzentration von 0,01 mg/mL wurden die Ansätze für 1 h bei 37 °C inkubiert [Backer *et al.*, 2006]. Anschließend wurde die Aktivität gegenüber pNPP bestimmt (Abschnitt 2.8.2.2).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-17 dargestellt. Es ist auffällig, dass alle Cys-Mutanten eine geringere spezifische Aktivität als LipT1-WT zeigen. Ohne Zusatz von DTT erreichen die Mutanten zwischen 63 und 76 % der Ausgangsaktivität der Wildtyp-Variante. Da die Einzelmutanten C64S und C295S sowie die cysteinfreie Variante C64S/C295S nicht zur Verfügung standen, ist unklar ob sich diese Austausch negativ auf die spezifische Aktivität auswirkten.

Der Zusatz von DTT hatte die spezifische Aktivität der untersuchten Lipasen unterschiedlich beeinflusst. Die Mutanten S259C und S333C zeigten eine Aktivitätssteigerung zwischen 9 und 10 %. Für die Varianten S2C und LipT1-WT konnte keine eindeutige Veränderung der spezifischen Aktivität festgestellt werden. Im Fall von Lipase SXC wurde mit 15 % die höchste Steigerung der Aktivität erhalten. Dieser Zusammenhang steht in Übereinstimmung mit der zuvor beobachteten, vergleichsweise starken Tendenz dieser Mutante zur Multimerisierung (Abschnitt 3.2.2.1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Behandlung der Cys-Varianten mit Reduktionsmitteln wie β -ME oder DTT eine Di- bzw. Multimerisierung reversibel gestaltet werden kann. Gleichzeitig konnte, je nach Mutante, ein Teil der durch Multimerisierung verloren gegangenen Aktivität wiederhergestellt werden.

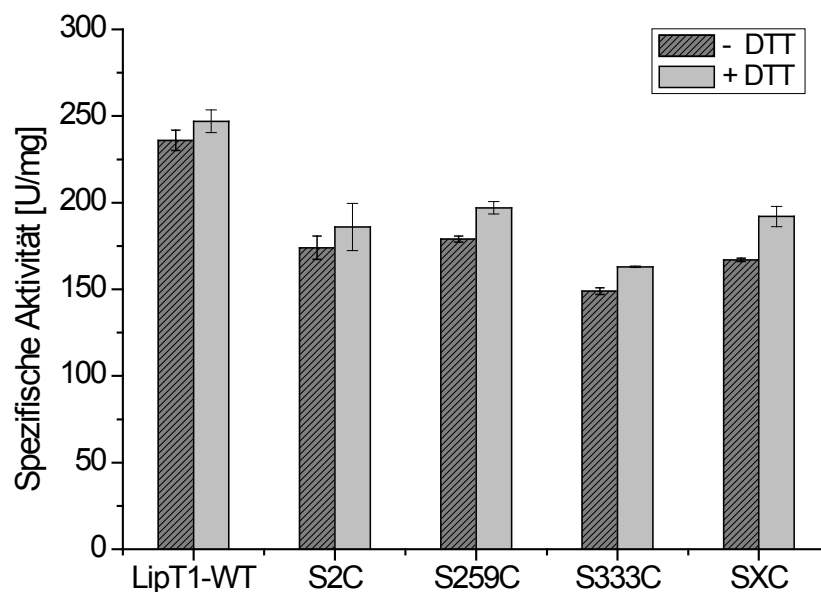


Abbildung 3-17: Einfluss von DTT auf die spezifische Aktivität verschiedener Cys-Mutanten der Lipase LipT1. Die gereinigten Lipase-Varianten (0,01 mg/ml) wurden in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 in An- und Abwesenheit von 25 mM DTT für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität gegenüber pNPP bestimmt (n = 3).

3.2.2.3 Untersuchung der Lipase-Kopplung auf funktionalisierte Glasobjektträger

Nachdem eine Möglichkeit zur Vermeidung einer unerwünschten Multimerisierung der Cys-Mutanten gefunden wurde, sollte im nächsten Schritt die Immobilisierung der Varianten untersucht werden. Zur Kopplung von Proteinen über deren Cys-Reste können prinzipiell verschiedene Methoden herangezogen werden (Abschnitt 1.2.2). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Immobilisierung die Reaktion zwischen Thiolgruppe und dem Reagenz Maleinimid (MAL) gewählt. Diese Reaktion zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus, läuft unter milden Bedingungen ab und liefert eine stabile Bindung zwischen Träger und Protein [Wong, 1993].

Da im Kapitel 3.2.1 unter Verwendung eines porösen Trägermaterials (Partikel aus quervernetzter Agarose) die Aktivitätswiederfindung auf dem Träger bei nur 25 % lag, wurde zur Untersuchung der zielgerichteten Kopplung der Cys-Varianten ein alternativer Ansatz verfolgt. Es wurde nach einer Möglichkeit gesucht, den Diffusionseinfluss während der Reaktion zu verringern und somit eine Substratlimitierung zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde hinsichtlich des Trägermaterials auf eine Modelloberfläche in Form von PEG/MAL-funktionalisierten Glasobjektträgern der Firma μ Surfaces, Inc. zurückgegriffen. Die Nutzung dieser Modelloberfläche sollte einen direkten Kontakt zwischen immobilisiertem Enzym und dem Substrat der umgebenden Lösung ermöglichen, ohne dass wie z.B. bei Agarose-Partikeln eine vorherige Diffusion des Substrates durch die Poren des Trägers notwendig ist. Neben der Funktionalisierung mit MAL-Gruppen zur Kopplung Cys-tragender Proteine wiesen diese Glasobjektträger eine Polyethylenglykol (PEG)-Schicht zur Verringerung unspezifischer Proteinadsorption auf (Abbildung 3-18). Die Modelloberfläche sollte als Testsystem zur Untersuchung der Immobilisierung der verschiedenen Cys-Varianten dienen. So sollte geklärt werden, ob zum einen eine spezifische Kopplung der Mutanten möglich ist und zum anderen, inwiefern Anzahl und Position der Mutationen die Kopplung und Aktivität auf dem Träger beeinflussen.

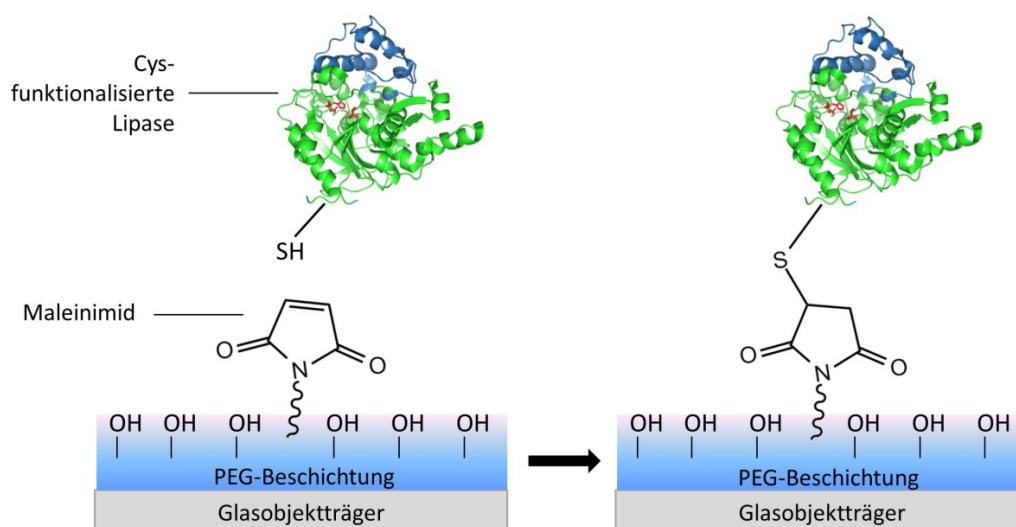


Abbildung 3-18: Schematische Darstellung der Kopplung Cys-tragender Proteine auf PEG/MAL-funktionalisierte Glasoberflächen mod. nach [Micro-Surfaces, 2013]. Strukturdarstellung (*ribbon*) erstellt mit *pymol* basierend auf PDB-Eintrag 2DSN [Matsumura *et al.*, 2008].

Die Durchführung des Versuchs ist in Abschnitt 2.9.15 beschrieben. Im Vorfeld der Untersuchungen wurden zunächst die angefertigten PVC-Inkubationskammern für Objektträger hinsichtlich ihres Adsorptionsverhaltens gegenüber Lipasen überprüft. Dabei konnte unter den gewählten Pufferbedingungen keine messbare Lipase-Adsorption festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Somit hatte das Kammermaterial keinen Einfluss auf die Kopplungsversuche. Weiterhin wurden analog dazu auch unbehandelte Glasobjektträger ohne PEG- und MAL-Modifizierung untersucht, da die kommerziellen PEG/MAL-Objektträger nur einseitig auf einer Fläche von 1 x 3 Zoll beschichtet sind. Bei der Inkubation mit Lipase-Lösung innerhalb der Kammern konnte somit eine Benetzung auf der unbeschichteten Seite nicht ausgeschlossen werden. Für die unmodifizierte Glasoberfläche konnte ebenfalls keine Lipase-Adsorption beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchungen zur Kopplung der verschiedenen Lipase-Varianten an die MAL-Glasoberflächen erfolgten in einer Dreifachbestimmung. Um Aussagen über das reine Adsorptionsverhalten der Lipasen an die funktionalisierte Oberfläche treffen zu können, wurde als Kontrolle jeweils ein Objektträger zuvor mit β -ME-haltigen Puffer inkubiert, um die reaktiven MAL-Reste zu blocken. Sowohl die reaktiven als auch die geblockten Objektträger zeigten ohne Enzymzugabe keine Aktivität im pNPP-Test.

Der Vergleich der gekoppelten Aktivitäten der verschiedenen Lipase-Varianten ist in Abbildung 3-19 dargestellt. Die Abbildung zeigt zudem die durch Adsorption an die geblockten Objektträger erhaltene Aktivität der jeweiligen Lipase. Hinsichtlich der gekoppelten Aktivität war ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Cys-Mutanten erkennbar. Während mit 4 und 10 mU_C für die Varianten S259C bzw. S2C die messbare Aktivität relativ gering war, konnten für die Mutante S333C mit 31 mU_C deutlich höhere Aktivitäten erzielt werden. Die eingesetzte Dreifach-Mutante SXC erreichte unter den gewählten Bedingungen mit 53 mU_C die höchste Aktivität. Bezogen auf reaktive Oberfläche ergab sich für SXC ein Wert von 2,7 mU_C/cm^2 . Bezüglich der mit β -ME geblockten Objektträger zeigten nur die Varianten S333C und SXC eine messbare Aktivität. Der Anteil der Adsorption im Vergleich zum jeweiligen Kopplungsversuch betrug 2 bzw. 8 %. Scheinbar wurde durch die PEG-Beschichtung die unspezifische Adsorption der Proteine weitestgehend unterbunden. Der Vergleich der Aktivitätswerte von LipT1-WT (0,7 mU_C) und den Cys-Varianten (4 bis 53 mU_C) zeigt deutlich, dass die gerichtete Immobilisierung erfolgreich war.

Eine Bilanzierung der Kopplungsversuche über die Aktivität war nur für die Variante SXC möglich. Die Restaktivität im Überstand bezogen auf die initial eingesetzten 0,3 U_C betrug nach 2 h Kopplungsdauer 72 %. Dementsprechend lag die Kopplungsausbeute bei 28 %. Von dieser theoretisch gekoppelten Aktivität konnten mit 53 mU_C entsprechend 63 % auf dem Träger wiedergefunden werden. Im Fall der anderen Lipase-Varianten war die Bilanzierung über die Aktivität aufgrund der erhaltenen Messdaten nicht sinnvoll. Am Ende der Kopplung betrug die Aktivitätsabnahme im Überstand zwischen 1 - 4 %. Da jedoch die Messwertschwankungen der Aktivitätsmessung im Bereich 2 - 4 % lagen, war diesbezüglich keine verlässliche Ergebnisanalyse möglich.

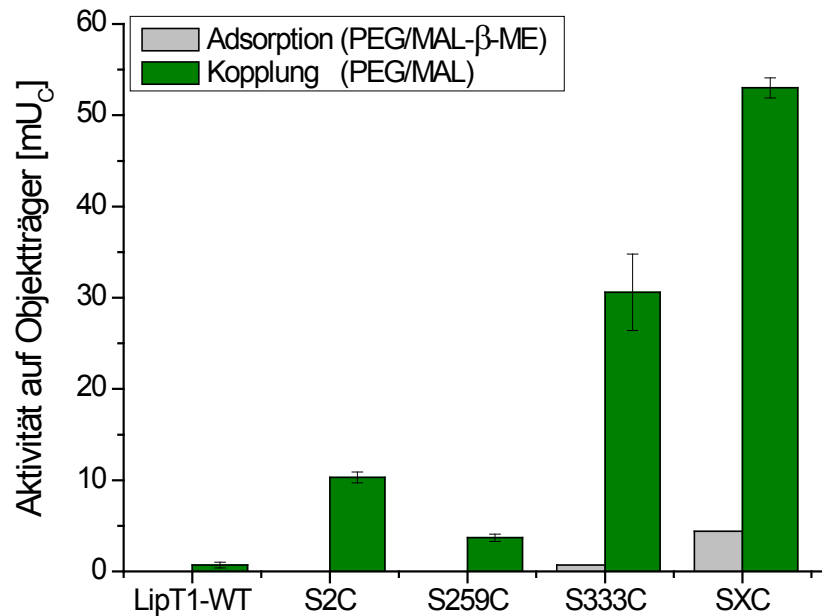


Abbildung 3-19: Aktivitäten der Lipase-Varianten nach Kopplung auf PEG/MAL-funktionalisierte Glasobjektträger. Es wurden jeweils 0,3 U_c (3 mL) der gereinigten Lipase-Variante in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 mit 0,5 % (w/v) Triton X-100 und 300 mM NaCl eingesetzt. Die Inkubation mit reaktiven (Kopplung) bzw. geblockten (Adsorption) PEG/MAL-Objektträgern erfolgte bei 25 °C für 2 h. Nach dreimaligem Waschen der Objektträger mit je 5 mL Puffer CWP wurde die Aktivität auf dem Träger gegenüber pNPP bestimmt (Kopplung: n = 3; Adsorption: n = 1).

Die verwendeten PEG/MAL-funktionalisierten Glasobjektträger sollten als Testsystem zur Untersuchung des Einfluss der Mutationsposition auf die Kopplung der verschiedenen Lipase-Varianten dienen. Trotz der beschriebenen Limitationen bei der Bilanzierung konnten eindeutige Unterschiede zwischen den Mutanten hinsichtlich der Aktivität auf dem Träger festgestellt werden. Die Variante mit dem Austausch S333C zeigte unter den Einzelmutanten die höchste Aktivität auf dem Träger. Daraus konnte geschlossen werden, dass der Cys-Rest an dieser Position auf der Proteinoberfläche besonders gut zugänglich und zur Reaktion mit MAL geeignet ist. Die Kombination der drei Austauschpositionen S2C, S259C und S333C wirkte sich zusätzlich positiv auf die Kopplung aus.

3.2.2.4 Untersuchung der Stabilität der immobilisierten Cys-Varianten bei Wiederverwendung

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass eine zielgerichtete Immobilisierung der Cys-Varianten der Lipase LipT1 auf MAL-funktionalisierte Glasobjektträger möglich ist. Die Position der zusätzlich eingefügten Cys-Reste hatte dabei entscheidenden Einfluss auf die koppelbare Aktivität. Die besten Ergebnisse wurden in diesem Zusammenhang für die Dreifach-Cys-Mutante SXC erhalten. Möglicherweise fand eine Mehrfachkopplung über verschiedene Cys-Reste statt. Durch eine Fixierung der Proteinstruktur über mehrere Punkte auf der Oberfläche ist eine Erhöhung der Stabilität des Proteins denkbar. Aus diesem Grund wurde nachfolgend die Wiederverwendung der immobilisierten Lipasen untersucht, um zu

überprüfen, inwiefern die Stabilität durch die Position und Anzahl der zusätzlichen Cys-Reste beeinflusst wird.

Die Untersuchungen wurden direkt im Anschluss an die in Abschnitt 3.2.2.3 beschriebene Lipase-Kopplung durchgeführt. Vor jedem Einsatz der immobilisierten Lipase zur Hydrolyse von *p*NPP wurde der Objektträger jeweils mit dreimal 5 mL Puffer CWP für je 5 min bei 350 rpm gewaschen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-20 dargestellt. Unter den immobilisierten Lipase-Varianten zeigte Mutante S2C die stärkste Aktivitätsabnahme. Nach sechs Durchgängen betrug die Restaktivität 70 %. Für Variante S259C wurde mit 73 % ein ähnlicher Wert erhalten. Die Stabilität der Lipase S333C war verglichen mit den anderen Einzelmutanten unter den gewählten Bedingungen am höchsten. Die Restaktivität lag nach dem sechsten Recyclingschritt bei 85 %. Im Fall der Variante SXC wurde über die ersten fünf Zyklen nur ein geringer Aktivitätsverlust von 5 % nachgewiesen. Anschließend war ein stärkerer Abfall zu verzeichnen, wobei sich die Restaktivität mit 87 % dem Wert der Mutante S333C annäherte.

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass alle immobilisierten Cys-Varianten mehrfach zur Hydrolyse des Substrates *p*NPP eingesetzt werden können. Zwar war nach jedem Zyklus bei der Mehrzahl der Mutanten ein Aktivitätsverlust zu verzeichnen, jedoch lag die Restaktivität nach sechs Zyklen jeweils deutlich über 70 %. Hervorzuheben ist, dass die Dreifachmutante SXC bei den Untersuchungen zum Recycling die höchste Stabilität zeigte.

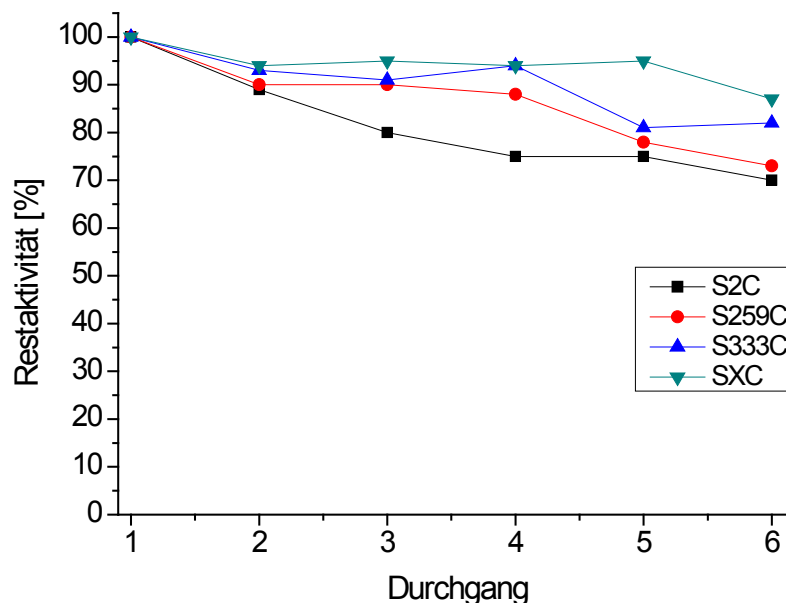


Abbildung 3-20: Restaktivitäten der auf PEG/MAL-Glasobjektträgern immobilisierten Lipase-Varianten bei wiederholtem Einsatz zur Hydrolyse von *p*NPP. Zur Kopplung wurden jeweils 0,3 U_C (3 mL) der gereinigten Lipase-Variante in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 mit 0,5 % (w/v) Triton X-100 und 300 mM NaCl eingesetzt. Die Inkubation mit reaktiven MAL-Objektträgern erfolgte bei 25 °C für 2 h. Vor jedem Einsatz der immobilisierten Lipase zur Hydrolyse von *p*NPP wurde der Objektträger jeweils dreimal mit 5 mL Puffer CWP für je 5 min bei 350 rpm gewaschen. Die Restaktivität beschreibt die im jeweiligen Durchgang gemessene Aktivität bezogen auf die Ausgangsaktivität des Immobilisats.

3.2.2.5 Untersuchung der Thermostabilität der immobilisierten Cys-Varianten

In den Versuchen zum mehrmaligen Einsatz bei der Hydrolyse von *p*NPP wiesen die Einzelmutante S333C und die Dreifachmutante SXC nur geringe Unterschiede hinsichtlich ihrer Restaktivität auf (Abschnitt 3.2.2.4). Um die Stabilisierung durch eine mögliche Mehrpunktfixierung genauer zu beleuchten, wurde zusätzlich die Thermostabilität der immobilisierten Lipasen untersucht. Die Durchführung der Inkubation bei 60 °C erfolgte in Anlehnung an Godoy *et al.* und ist in Abschnitt 2.9.16 beschrieben [Godoy *et al.*, 2011b].

Abbildung 3-21 zeigt die ermittelte Restaktivität der immobilisierten Lipase-Varianten S333C und SXC sowie der beiden Enzyme in löslicher Form. Es ist ersichtlich, dass im Fall der immobilisierten Lipasen nach 30 min ein deutlicher Aktivitätsverlust eintrat. Die Restaktivitäten für S333C und SXC lagen bei 33 bzw. 19 %. Die Einzelmutante S333C zeigte eine höhere Stabilität nach Inkubation bei 60 °C als die Dreifachmutante SXC. Zur Überprüfung des Sachverhalts wurde analog dazu die Thermostabilität der löslichen Lipase-Varianten untersucht. Für S333C wurde eine Restaktivität von 89 % erhalten. Im Fall der Variante SXC lag dieser Wert mit 33 % deutlich niedriger. Im Vergleich dazu konnte für die Lipase LipT1-WT ohne Cys-Austausche unter identischen Bedingungen eine Restaktivität von 91 % ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Demzufolge scheint sich im Fall von SXC die Kombination der drei Mutationspositionen negativ auf die Thermostabilität der Lipase auszuwirken. Die Kopplung an PEG/MAL-Objekträger führte wiederum nicht zu einer Stabilisierung der jeweiligen Enzymstruktur sondern bewirkte eine Verringerung der Restaktivität.

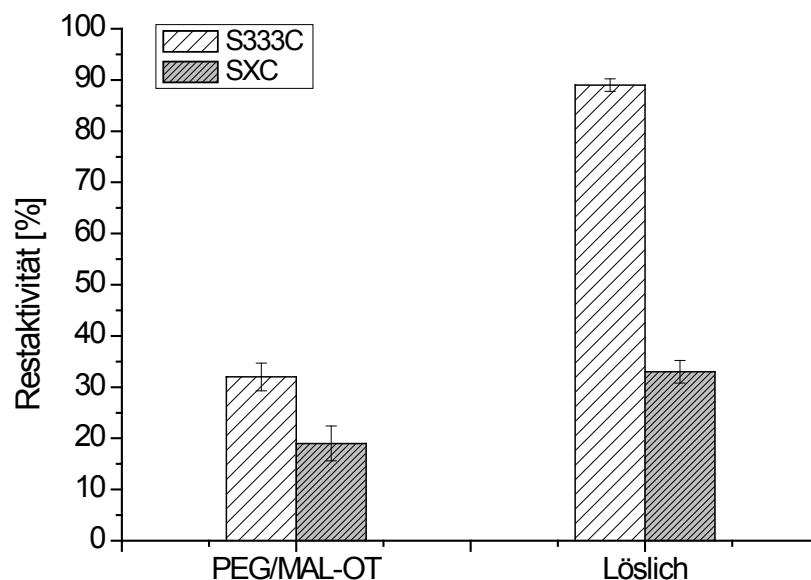


Abbildung 3-21: Restaktivität der Lipase-Varianten S333C bzw. SXC in immobilisierter und löslicher Form nach Inkubation bei 60 °C. Die auf PEG/MAL-Objekträger immobilisierten Lipase-Varianten wurden zusammen mit den löslichen Enzympräparaten als Kontrolle (1,4 U_C/mL) in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 für 30 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Es wurde jeweils vor und nach der Temperaturbehandlung die Aktivität gegenüber *p*NPP bestimmt (n=3). Die Restaktivität beschreibt die nach Inkubation erhaltene Aktivität bezogen auf die Ausgangsaktivität des Enzyms / Immobilisats.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter Verwendung der beschriebenen PEG/MAL-Objektträger eine zielgerichtete Immobilisierung der designten Cys-Varianten der Lipase LipT1 realisiert werden konnte. Das verwendete System konnte erfolgreich zur Untersuchung und Selektion geeigneter Mutationspositionen genutzt werden. Weiterhin wurde eine stabile Kopplung zwischen Enzym und Träger erhalten, so dass eine mehrfache Verwendung der immobilisierten Enzyme in der Hydrolysereaktion möglich war. Hinsichtlich der Thermostabilität der Lipasen konnte mit dem verwendeten Trägersystem kein positiver Effekt erzielt werden.

3.2.3 Lipase-Immobilisierung über Aminogruppen

In einem weiteren Ansatz zur zielgerichteten Immobilisierung wurde die Kopplung der Lipasen über Aminogruppen untersucht. Reaktive Aminogruppen treten innerhalb der Proteinstruktur vor allem in Seitenketten von Lysinresten sowie in Form des N-Terminus auf. Lysinreste kommen im Vergleich zu anderen reaktiven Aminosäuren, wie zum Beispiel Cystein, relativ häufig in Proteinen vor und sind zumeist auf der Proteinoberfläche verteilt. Bei einer Immobilisierung des nativen Proteins über Aminogruppen wären somit zahlreiche verschiedene Orientierungen auf dem Träger denkbar. Im Hinblick auf eine zielgerichtete Immobilisierung ist es entscheidend, dass besonders reaktive Bereiche auf der Proteinoberfläche vorliegen, damit die Ausrichtung des Proteins auf dem Träger beeinflusst werden kann.

Zu diesem Zweck wurde anhand der Strukturdaten der Lipase LipT1 eine Immobilisierungsebene definiert, die, wie bereits beschrieben, auf der gegenüberliegenden Seite des aktiven Zentrums liegt und zusätzlich besonders reich an Lysinresten ist (Abbildung 3-22). In dieser Ebene befinden sich neben dem N-Terminus vier der elf nativen Lysinreste von LipT1. Zusätzlich wurde der Ansatz verfolgt, die restlichen Lysinreste außerhalb dieser Ebene durch weniger reaktive Seitenketten zu ersetzen, damit diese eine gerichtete Kopplung nicht beeinflussen. Insbesondere könnten sich die Reste K185, K207 und K228, die innerhalb der flexiblen Deckelregion der Lipase lokalisiert sind, bei der Kopplung negativ auf die beabsichtigte Orientierung auswirken.

Die Substitution der Lysine sollte mit der chemisch verwandten Aminosäure Arginin als konservativer Austausch erfolgen, um einen Einfluss auf die Proteinnettoladung sowie sterische Veränderungen zu vermeiden. Diese Variante der Lipase LipT1, mit 7 Lys→Arg-Substitutionen, wird im Folgenden als Lipase LipT1-KXR bezeichnet. Die Details zum DNA-Konstrukt der Variante können Abschnitt 2.5 entnommen werden. Die Produktion und Reinigung erfolgte analog zu LipT1-WT (Abschnitte 2.9.3, 2.9.7.2 und Tabelle 3-3).

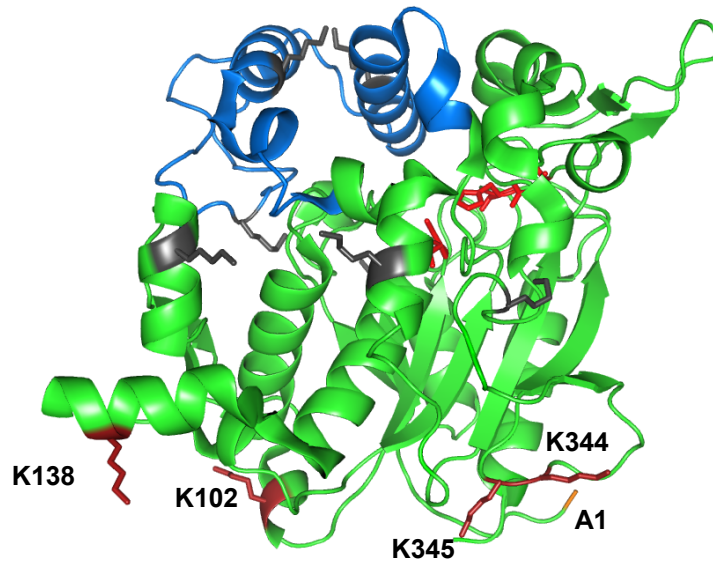


Abbildung 3-22: Schematische Darstellung der Lipase-Variante LipT1-KXR. Lysinreste in Immobilisierungsebene (K102, K138, K344, K345) in braun (*sticks*); Lys→Arg -Austauschpositionen (K28R K84R K185R K207R K229R K251R K329R) in grau (*sticks*); N-Terminus (A1) in orange; Aminosäuren des aktiven Zentrums (S113, D317, H358) in rot (*sticks*); Deckelregion (L170 – A240) in blau. *Ribbon*-Darstellung erstellt mit *pymol* basierend auf PDB-Eintrag 2DSN [Matsumura *et al.*, 2008].

Grundsätzlich können zur Kopplung von Proteinen über Aminogruppen verschiedene Methoden eingesetzt werden (Abschnitt 1.2.1). Ein häufig genutzter Ansatz zur Immobilisierung ist die Verwendung des Reagenz Glutaraldehyd [Betancor *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2012]. Im Folgenden werden die experimentellen Ergebnisse zur Immobilisierung der Lipasen LipT1-WT und Mutante KXR unter Verwendung glutaraldehydaktivierter Trägermaterialien dargestellt.

3.2.3.1 Einfluss von Glutaraldehyd auf die Lipase-Aktivität in Lösung

Vor der Immobilisierung der Lipasen LipT1-WT und KXR mittels Glutaraldehyd (GA) sollte zunächst untersucht werden, inwiefern sich eine Reaktion zwischen Lipase und GA auf die Aktivität der löslichen Enzyme auswirkt. Es sollte insbesondere überprüft werden, ob die Modifikation der Aminogruppen durch GA zu einer Inaktivierung der Lipasen führt.

Zu diesem Zweck wurde zunächst Lipase LipT1-WT mit verschiedenen GA-Konzentrationen inkubiert. Ausgehend von den 12 vorhandenen reaktiven Aminogruppen auf der Proteinoberfläche (N-Terminus und 11 Lysinreste) wurde das molare Verhältnis von verfügbaren NH_2 -Gruppen zu GA variiert.

Die Inkubation erfolgte in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 mit 1 % (v/v) Triton X-100 und 500 mM NaCl. Durch die Zusätze Triton X-100 und NaCl sollten bei der späteren Immobilisierung hydrophobe und ionische Wechselwirkungen zwischen Enzym und Träger verringert werden, um eine unspezifische Adsorption zu vermeiden [Rodrigues *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2012]. Zusätzlich wurde die Inkubation bei pH 10 unter Verwendung eines

50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffers mit den o.g. Zusätzen durchgeführt. Durch Annäherung des pH-Wertes an den pK_a -Wert der ϵ -Aminogruppen im Lysinrest (freies Lysin: $pK_a = 10,8$; Lysin in Modellproteinen: $pK_a = 10 - 10,2$) kann aufgrund des höheren Dissoziationsgrades der Aminogruppe deren Reaktivität erhöht werden [Wong, 1993]. Die detaillierten Bedingungen zur Durchführung können Abschnitt 2.9.17 entnommen werden.

In Abbildung 3-23 ist zu sehen, dass bei pH 8 die GA-Konzentration im Ansatz keinen nennenswerten Einfluss auf die Aktivität der Lipase besitzt. Die relative Aktivität war nach einstündiger Inkubation in allen Ansätzen vergleichbar mit der Kontrollprobe ohne GA.

Bei pH 10 wurde im Gegensatz dazu für das molare Verhältnis NH_2 -Gruppen : GA von 1 : 100, was einer GA-Konzentration von 270 μM GA entspricht, ein deutlicher Anstieg der relativen Aktivität beobachtet. Im Vergleich zur Kontrolle ohne GA betrug die Aktivität nach Inkubation 458 %. Um auszuschließen, dass die GA-Konzentration im Reaktionsansatz den Aktivitätstest beeinflusst wurde der Assay ebenfalls unter Zugabe von GA, jedoch ohne Lipase-Zusatz, durchgeführt. In diesem Fall konnte kein Aktivitätssignal erhalten werden.

Eine Steigerung der Aktivität konnte nur für das molare Verhältnis 1 : 100 festgestellt werden. Die Verringerung der GA-Konzentration im Ansatz führte zu einem geringfügigen Rückgang der Aktivität auf 90 % (Verhältnis 100 : 1).

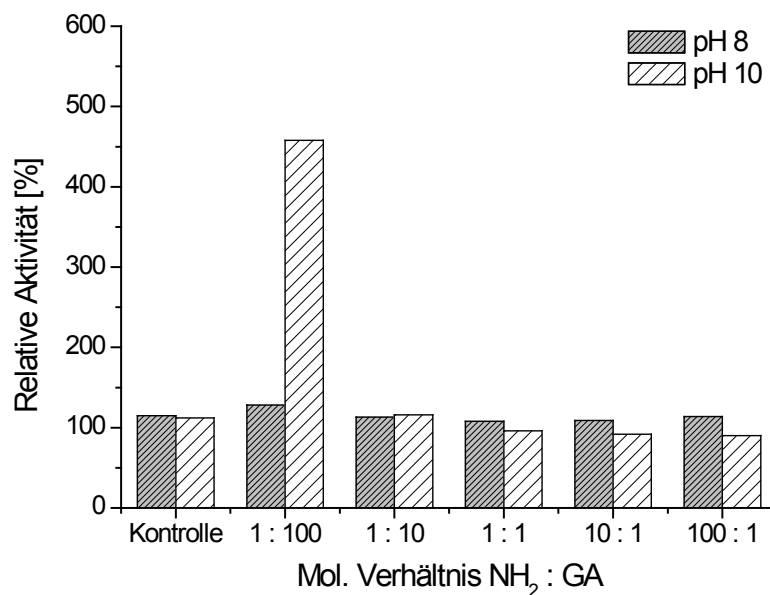


Abbildung 3-23: Einfluss der Glutaraldehyd-Konzentration auf die Aktivität der Lipase LipT1-WT bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Inkubation von 2 U_C /mL Lipase LipT1-WT mit GA (Gesamtvolumen 1 mL) erfolgte in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 bzw. 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10 mit jeweils 1 % (v/v) Triton X-100 sowie 500 mM NaCl bei 25 °C und 550 rpm (Thermomixer) für 1 h. Die angegebenen molaren Verhältnisse entsprechen folgenden GA-Konzentrationen im Ansatz (von links nach rechts): Kontrolle 0 μM ; 270 μM ; 27 μM ; 2,7 μM ; 0,27 μM und 0,03 μM . Die relative Aktivität entspricht der nach Inkubation erhaltenen Aktivität der jeweiligen Probe gegenüber dem Substrat pNPP bezogen auf die Startaktivität.

Um zu überprüfen, ob die für LipT1-WT beobachtete Aktivitätssteigerung ebenfalls bei der Variante KXR auftritt, wurde der Versuch mit Lipase KXR unter Verlängerung der Reaktionsdauer auf 2 h wiederholt. Die Durchführung erfolgte analog zu LipT1-WT (Abschnitt

2.9.17). Um die gleichen molaren Verhältnisse wie bei LipT1-WT einzustellen, musste aufgrund der veränderten Anzahl an Lysinresten in LipT1-KXR die GA-Konzentrationen im Ansatz angepasst werden. Für einen direkten Vergleich beider Lipasen unter identischer GA-Konzentration wurde die Inkubation ebenfalls unter Verwendung von 270 μM GA (s.o.) durchgeführt.

Abbildung 3-24 zeigt, dass bei der Inkubation von LipT1-WT mit GA (Verhältnis 1:100) eine Aktivitätssteigerung auftrat, die nach 2 h einen Wert von 542 % erreichte. Bei verringerter GA-Konzentration (Verhältnis 1:10) wurde mit 120 % eine deutlich geringere Zunahme über 2 h beobachtet. Bei noch niedrigeren GA-Konzentrationen blieb die Aktivität nahezu konstant. Im Fall von Lipase KXR wurde unter den untersuchten Bedingungen kein vergleichbarer Effekt erhalten. Die Aktivität nahm bei allen Ansätzen innerhalb von 2 h um 19 - 29 % ab. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei einer Konzentration von 270 μM GA, bei der für LipT1-WT die höchste Steigerung auftrat (Abbildung 8-10; Anhang).

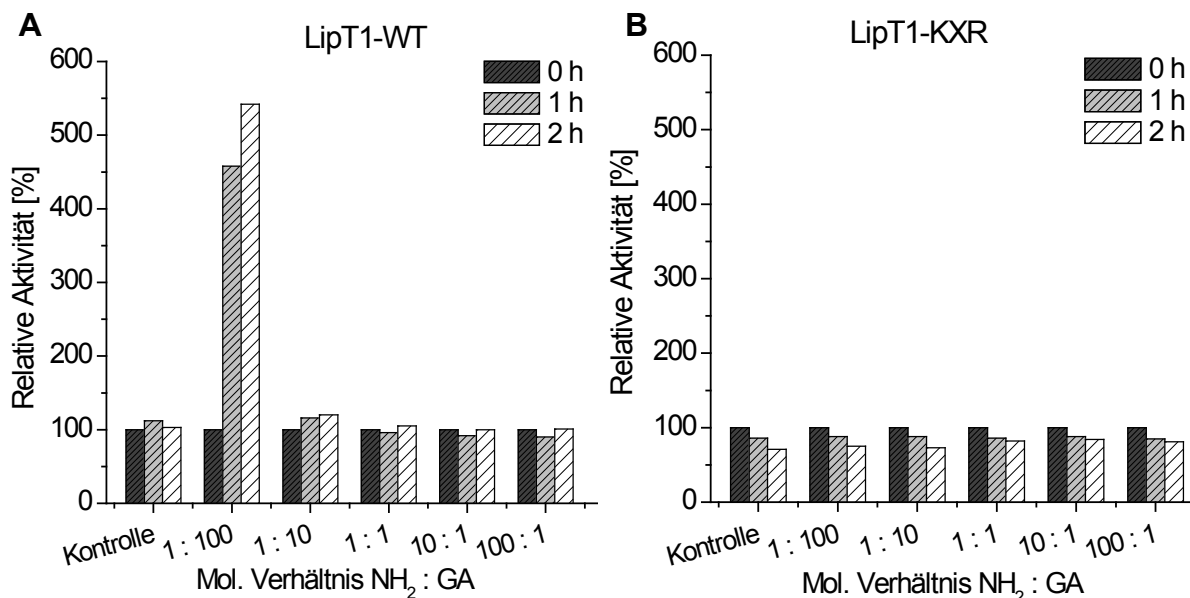


Abbildung 3-24: Einfluss der Glutaraldehyd-Konzentration auf die Aktivität der Lipasen LipT1-WT (A) und LipT1-KXR (B). Die Inkubation von 2 U_C/mL der jeweiligen Lipase mit GA erfolgte in 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10 mit jeweils 1 % (v/v) Triton X-100 sowie 500 mM NaCl bei 25 °C und 550 rpm (Thermomixer) für 2 h. Die angegebenen molaren Verhältnisse Aminogruppen zu GA entsprechen folgenden GA-Konzentrationen im Ansatz (von links nach rechts): LipT1-WT (A): 0 μM (Kontrolle); 270 μM ; 27 μM ; 2,7 μM ; 0,27 μM und 0,03 μM ; LipT1-KXR (B): 0 μM (Kontrolle); 112 μM ; 11 μM ; 1,1 μM ; 0,1 μM und 0,01 μM . Die relative Aktivität entspricht der nach Inkubation mit GA erhaltenen Aktivität der jeweiligen Probe gegenüber pNPP bezogen auf die Startaktivität.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für Lipase LipT1-WT nach Inkubation mit 270 μM GA bei pH 10 anstatt einer Inaktivierung eine Aktivitätssteigerung um das 5-fache ermittelt wurde. Scheinbar führte die Reaktion der Aminogruppen auf der Lipase-Oberfläche mit GA zu Konformationsänderungen, die sich positiv auf die Aktivität auswirkten. Da für Variante KXR dieser Effekt nicht beobachtet werden konnte, liegt der Schluss nahe, dass eine bzw. mehrere der an der Aktivierung beteiligten Lysinreste beim Design der Mutante ausgetauscht wurden. Weiterhin wurde anhand der Daten deutlich, dass die durchgeführten Mutationen die

Stabilität der Lipase beeinflussen. Bei allen Ansätzen zur Inkubation von KXR mit und ohne GA war im Gegensatz zu LipT1-WT ein Aktivitätsverlust von bis zu 30 % zu verzeichnen. Der Effekt der Aktivitätssteigerung der Lipase LipT1-WT durch GA wird in Abschnitt 3.2.4 näher behandelt.

3.2.3.2 Immobilisierung der Lipasen mittels Glutaraldehyd

Die im folgenden Abschnitt dargestellten Untersuchungen sollten dem Nachweis dienen, dass unter Verwendung GA-aktivierter Trägermaterialien eine zielgerichtete Kopplung der Lipase LipT1-KXR möglich ist. Wie in Tabelle 3-8 ersichtlich ist, war die spezifische Aktivität der Mutante gegenüber dem Substrat *p*NPP vergleichbar mit der des Wildtyp-Enzyms.

Tabelle 3-8: Spezifische Aktivität der Lipasen LipT1-WT und LipT1-KXR nach BA-Reinigung und Dialyse. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte colorimetrisch unter Einsatz von *p*NPP. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradfordtest bestimmt.

Substrat	Lip1-WT	LipT1-KXR
<i>p</i> NPP [U_C/mg]	266 ± 1	288 ± 10

Als Ausgangsträgermaterial für die Immobilisierung dienten poröse Glaspartikel (Controlled Pore Glass; CPG). CPG zeichnet sich durch definierte Porendurchmesser und enge Porenverteilungen aus. Das in dieser Arbeit verwendete Material „CPG-NH₂“, mit einem Porendurchmesser von 375 Å, wurde mit 3-Aminopropylsilan funktionalisiert und sollte als Modellsystem zur Kopplung der Lipasen dienen. Weitere Informationen zum Träger sind in Abschnitt 2.6 aufgeführt. Vor Durchführung der Lipase-Immobilisierung wurde das Trägermaterial, wie in der Literatur beschrieben, mit GA aktiviert (nachfolgend „CPG-GA“ abgekürzt) [López-Gallego *et al.*, 2005a; Betancor *et al.*, 2006]. Die Kopplung wurde zunächst bei pH 8 unter Verwendung des in Abschnitt 2.3 aufgeführten Puffers KP I durchgeführt. Durch die Zusätze von 500 mM NaCl und 1 % (v/v) Triton X-100 sollten ionische sowie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Träger und Zielprotein verringert und somit eine unspezifische Adsorption vermieden werden [Rodrigues *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2012]. Die zuvor beobachtete Lipase-Aktivierung durch Vorinkubation mit GA wurde für die Untersuchungen nicht einbezogen. Zum einen konnte nur für LipT1-WT, jedoch nicht für LipT1-KXR, eine Steigerung der Aktivität festgestellt werden. Zum anderen waren die Position(en) der Modifikation nicht bekannt, so dass durch die GA-Anlagerung am Enzym zusätzliche Einflüsse auf die Kopplung und somit auf die Orientierung der Lipasen nicht ausgeschlossen werden konnten. Die Trägeraktivierung sowie die Durchführung der Kopplung sind in Abschnitt 2.9.18 beschrieben. Sowohl das Ausgangsträgermaterial CPG-NH₂ als auch der aktivierte Träger CPG-GA zeigten ohne Lipase-Zusatz keine messbare Aktivität im *p*NPP-Test.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 3-9 sowie Abbildung 3-25 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass mit steigender Trägermenge die Kopplungsausbeute anstieg, da für die jeweils gleiche Ausgangsmenge an Enzym eine entsprechend größere aktivierte Oberfläche zur Verfügung stand. Für LipT1-WT lag die

Kopplungsausbeute in einem weiten Bereich zwischen 19 und 95 %. Dahingegen wurden auf dem Träger relativ ähnliche Aktivitäten gemessen (0,44 - 0,49 U_C/g). Dementsprechend ergab sich für die Ansätze mit LipT1-WT jeweils eine ähnliche Wiederfindung von 4 - 5 %. Im Vergleich dazu hat die Aktivität der Lipase LipT1-KXR im Überstand während der Kopplung, besonders bei einer geringen Trägermenge, stärker abgenommen. Scheinbar traten zwischen Träger und der Lipase-Mutante stärkere Wechselwirkungen auf, als es bei LipT1-WT der Fall war. Allerdings spiegeln sich die höheren Kopplungsausbeuten für KXR nicht in höheren Aktivitäten auf dem Träger wider. Die gemessenen trägergebundenen Aktivitäten lagen mit 0,29 - 0,4 U_C/g jeweils unter den Werten von LipT1-WT. Daher wurden auch für die Aktivitätswiederfindung niedrigere Werte erhalten.

Tabelle 3-9: Vergleich der Immobilisierungsparameter der Lipasen LipT1-WT und LipT1-KXR nach Kopplung an CPG-GA. Die Aktivität wurde mittels pNPP-Assay bestimmt (n=3).

Trägermenge	LipT1-WT			LipT1-KXR		
	0,5 g	1,5 g	2,5 g	0,5 g	1,5 g	2,5 g
Trägergebundene Aktivität [U _C /g]	0,49 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,40 ± 0,03	0,34 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Kopplungsausbeute [%]	19	75	95	83	98	99
Wiederfindung [%]	5	4	5	1	2	3

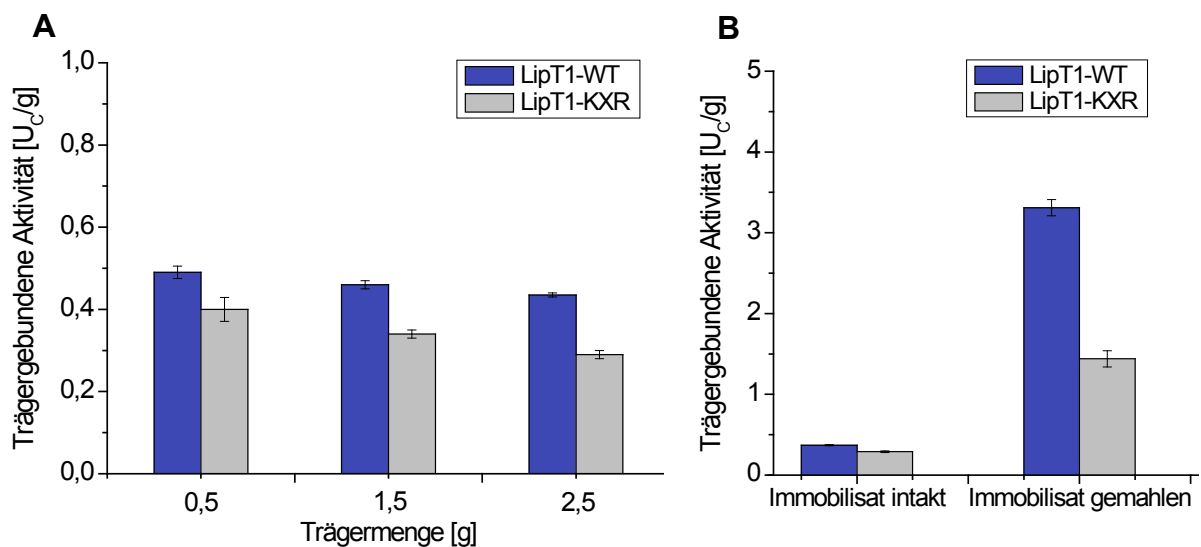


Abbildung 3-25: Immobilisierung der Lipasen LipT1-WT und LipT1-KXR auf Trägermaterial CPG-GA. (A) Einfluss der Trägermenge auf die gebundene Aktivität; (B) Vergleich der gebundenen Aktivität bei intakten sowie gemahlene Trägerpartikeln. Zur Immobilisierung der Lipasen wurden jeweils 25 U_C (in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8, 1 % (v/v) Triton X-100, 500 mM NaCl) mit der angegebenen Menge des GA-aktivierten Trägermaterials für 6 h bei 25 °C inkubiert. Nach jeweils dreimaligem Waschen mit Puffer (s.o.) und dH₂O wurde die Aktivität von je 50 mg des Immobilisats gegenüber pNPP bestimmt (n = 3). Die Proben unter Verwendung von 1,5 g Träger wurden für das Mahlexperiment herangezogen. Es wurden je 15 mg gemahlene Immobilisat im Aktivitätstest eingesetzt.

Für beide Lipase-Varianten war auffällig, dass trotz teilweise sehr hoher Kopplungsausbeuten nur ein vergleichsweise geringer Teil der Aktivität auf dem Träger nachweisbar war. Ein Grund für diese Beobachtung wurde in einer Beeinträchtigung der Zugänglichkeit des Substrats *p*NPP zum immobilisierten Enzym vermutet. Zur Überprüfung dieses Sachverhalts wurden die Trägerpartikel zermahlen [Buchholz *et al.*, 2005]. Durch Mahlen des Trägers sollte die Porenstruktur der Partikel aufgebrochen und somit die in tieferen Porenbereichen immobilisierten Lipase-Moleküle freigelegt werden. Für das Mahlexperiment wurden die Proben aus den Ansätzen mit 1,5 g Trägermaterial herangezogen. Das Mahlen erfolgte durch fünfmaliges Pressen eines zylindrischen Magnetührers (4,8 x 0,8 cm) gegen das in ein 2 mL-Reaktionsgefäß eingewogene Immobilisat. Anschließend wurde das Immobilisat im Reaktionsgefäß aufgelockert und der Vorgang zweimal wiederholt.

Wie in Abbildung 3-25 B erkennbar ist, war durch das Mahlen für beide Lipase-Varianten eine deutlich höhere Aktivität im Vergleich zum jeweiligen intakten Immobilisat messbar. Die Aktivität erhöhte sich für LipT1-KXR und LipT1-WT um das 5- bzw. 9-fache. Dementsprechend ergab sich eine Erhöhung der Wiederfindung auf 12 bzw. 20 %. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzliche Mahlschritte zu einer weiteren Steigerung der Aktivität führen würden.

Die Ergebnisse verdeutlichen letztendlich, dass die Aktivität der im Partikelinneren immobilisierten Lipase-Moleküle bei intaktem Träger nicht nachgewiesen werden konnte und somit hauptsächlich die oberflächennahen Lipase-Moleküle an der Reaktion beteiligt waren. Weiterhin zeigen die vorliegenden Daten, dass unter Verwendung der Mutante KXR keine Verbesserungen hinsichtlich der Aktivität auf dem Träger möglich waren. Schlussfolgerungen im Hinblick auf eine veränderte Orientierung des Enzyms durch die eingeführten Mutationen ließen sich daraus nicht ableiten.

Da unter den gewählten Bedingungen die zielgerichtete Immobilisierung der Variante KXR nicht nachgewiesen werden konnte, wurden weiterführende Untersuchungen mit Anpassungen zu Trägermaterial und pH-Wert durchgeführt. Ebenso wurden als Alternative zur GA-basierten Kopplung oxirangruppenhaltige Träger eingesetzt (Abschnitt 1.2.1). Details zu den entsprechenden Trägermaterialien und der Versuchsdurchführung sind in den Abschnitten 2.6, 2.9.18 sowie 2.9.19 angegeben.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-10 zusammengefasst. Bei allen durchgeführten Immobilisierungsansätzen zeigte Lipase LipT1-KXR verglichen mit LipT1-WT eine geringere Aktivität auf dem Träger. Weder die Verwendung eines hydrophoberen Trägermaterials auf Polystyrol-Basis (Lewatit VPOC 1065) noch die Erhöhung des pH-Wertes auf pH 10 zur Steigerung der Reaktivität der Aminogruppen [Wong, 1993] konnten in Kombination mit Glutaraldehyd das Immobilisierungsverhalten der Mutante KXR positiv beeinflussen.

Zusätzlich wurde als Alternative die Kopplung über Oxirangruppen untersucht. Hier konnte für LipT1-WT im Vergleich zur GA-Methode eine deutlich höhere Aktivität sowie Wiederfindung erhalten werden. Allerdings zeigten sich auch mit dieser Methode für Mutante KXR keine verbesserten Kopplungseigenschaften.

Tabelle 3-10: Übersicht zur Immobilisierung der Lipasen LipT1-WT und LipT1-KXR über Glutaraldehyd und Oxirangruppen.

Kopplungs- methode	Träger- material	Bedingungen	Lipase	Träger- gebundene Aktivität [U _c /g]	Wiederfindung Aktivität auf Träger [%]
Glutaraldehyd	CPG-GA	50 mM Na-Phosphat pH 8 500 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100	LipT1-WT	0,49	5
			LipT1-KXR	0,40	1
	Lewatit VP OC 1065	50 mM Na-Phosphat pH 8 500 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100	LipT1-WT	0,38	4
			LipT1-KXR	-	-
		50 mM Carbonat- Bicarbonat pH 10 500 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100	LipT1-WT	0,15	4
			LipT1-KXR	0,04	<1
Oxirangruppen	Sepabeads EC-EP/S	1 M Phosphat pH 7	LipT1-WT	1,21	22
			LipT1-KXR	0,04	< 1
	0,5 M Phosphat pH 7 1 % (v/v) Triton X-100	LipT1-WT	0,24	4	
		LipT1-KXR	0,07	1	

Bei allen Ansätzen zur Immobilisierung der Lipasen wurden entsprechende Kontrollen zur Stabilität der Enzyme mitgeführt, indem die Lipasen im jeweiligen Kopplungspuffer ohne Trägermaterial inkubiert wurden. In Abbildung 3-26 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Es ist auffällig, dass LipT1-WT unter nahezu allen getesteten Bedingungen stabil war, da keine bzw. nur eine geringfügige Aktivitätsabnahme zu beobachten war. Eine Ausnahme stellte der häufig zur Immobilisierung an Polymethacrylat-Träger verwendete Hochsalzpuffer mit 1 M Na-Phosphat dar, der im Vergleich zu den anderen Puffern kein Triton X-100 enthielt. Im Gegensatz dazu zeigte Lipase LipT1-KXR unter identischen Bedingungen stets einen stärkeren und teilweise sogar vollständigen Aktivitätsverlust. Somit legen die vorliegenden Ergebnisse den Schluss nahe, dass infolge der durchgeführten Mutationen die Stabilität des Enzyms negativ beeinflusst wurde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Variante KXR gegenüber LipT1-WT keine Vorteile bei der Immobilisierung auswies und daher in allen nachfolgenden Betrachtungen nur eine untergeordnete Rolle spielte.

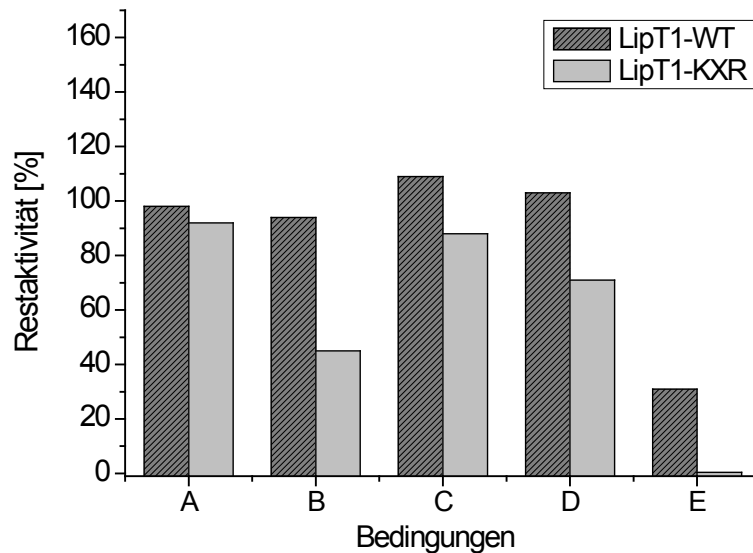


Abbildung 3-26: Vergleich der Stabilität der Lipasen LipT1-WT und LipT1-KXR unter verschiedenen Pufferbedingungen. Parallel zu den verschiedenen Immobilisierungsansätzen wurde die Stabilität der Lipasen im entsprechenden Puffer getestet. Hierzu wurden die Enzyme bei 25 °C ohne Trägermaterial unter folgenden Bedingungen inkubiert: A: 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 mit 1 % (v/v) Triton X-100 für 3 h; B: 500 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 mit 1 % (v/v) Triton X-100 für 24 h; C: 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 mit 500 mM NaCl und 1 % (v/v) Triton X-100 für 4 h; D: 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10 mit 500 mM NaCl und 1 % (v/v) Triton X-100 für 2 h; E: 1 M Na-Phosphatpuffer pH 7 für 24 h.

3.2.4 Untersuchung der Lipase-Aktivierung durch Glutaraldehyd

In den Versuchen zur Inkubation der Lipase LipT1-WT mit GA in Lösung wurde eine deutliche Aktivitätssteigerung festgestellt (Abbildung 3-24, Abschnitt 3.2.3.1). Im Hinblick auf eine mögliche Nutzung bei der Immobilisierung der Lipase wurde dieser Effekt im Folgenden näher untersucht.

3.2.4.1 Untersuchung der Aktivierung durch *n*-Valeraldehyd

Das in den bisherigen Untersuchungen eingesetzte Glutaraldehyd stellt ein homobifunktionelles Reagenz dar, das in Abhängigkeit des pH-Wertes verschiedene Reaktionen eingehen kann und unter bestimmten Bedingungen auch zur Polymerisation neigt (Abschnitt 1.2.1). Aus den bisher vorhandenen Beobachtungen zur Aktivitätssteigerung der Lipase LipT1-WT ließen sich keine Aussagen ableiten, welche Lysinreste durch GA modifiziert oder möglicherweise auch quervernetzt wurden. Daher sollte zunächst geklärt werden, ob ein ähnlicher Aktivierungseffekt auch mit einem monofunktionellem Aldehyd mit gleicher Kettenlänge (5 C-Atome) erzielt werden kann. Zu diesem Zweck wurde die Lipase, analog zu den Experimenten in Abschnitt 3.2.3.1, mit verschiedenen Konzentrationen des Reagenz *n*-Valeraldehyd (VA) inkubiert. Aufgrund der geringen Löslichkeit von VA in wässrigen Lösungen wurde zur Verdünnung der VA-Stammlösung Isopropanol verwendet. In Abbildung 3-27 ist zu erkennen, dass unter den gewählten Bedingungen keine Steigerung der Aktivität der Lipase LipT1-WT auftrat. Wie die Kontrollprobe zeigt, hatte das zum

Verdünnen von VA eingesetzte Isopropanol mit einer Konzentration im Ansatz von 3 % (v/v) keinen Einfluss auf die Lipase-Aktivität. Aus den Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass für den zuvor beobachteten Aktivierungseffekt die Bifunktionalität von GA entscheidend ist. Es konnte dabei nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Reaktion mit GA verschiedene Lysinreste mit einander verbrückt wurden und dadurch ausgelöste Konformationsänderungen die Lipase-Aktivität beeinflussten. Die Modifikation einzelner Lysinreste mit VA hatte in diesem Zusammenhang keine Wirkung auf die Aktivität.

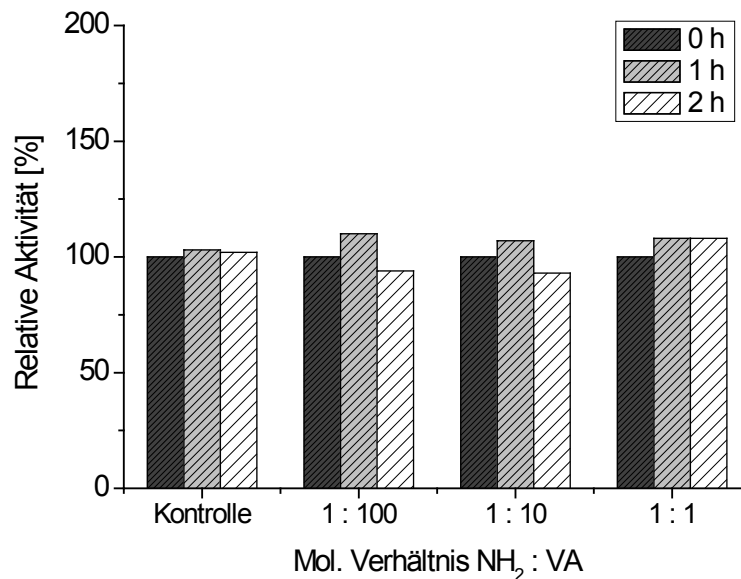


Abbildung 3-27: Einfluss der *n*-Valeraldehyd (VA) - Konzentration auf die Aktivität der Lipase LipT1-WT. Die Inkubation von 2 U_C/mL mit VA erfolgte in 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10 mit jeweils 1 % (v/v) Triton X-100 sowie 500 mM NaCl bei 25 °C und 550 rpm (Thermomixer) für 2 h. Die angegebenen molaren Verhältnisse Aminogruppen zu VA entsprechen folgenden VA-Konzentrationen im Ansatz (von links nach rechts): 0 μM (Kontrolle); 270 μM; 27 μM; 2,7 μM. Die relative Aktivität entspricht der nach Inkubation mit VA erhaltenen Aktivität der jeweiligen Probe gegenüber *p*NPP bezogen auf die Startaktivität.

3.2.4.2 Einfluss von Triton X-100 und NaCl auf die Lipase-Aktivierung

In den bisherigen Untersuchungen zur Aktivierung der Lipase LipT1-WT mit GA wurde ein 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10 mit 500 mM NaCl und 1 % (v/v) Triton X-100 eingesetzt. Da der Einfluss der beiden Pufferzusätze auf den Aktivierungseffekt nicht bekannt war, wurde die Inkubation mit GA jeweils in An- und Abwesenheit von NaCl und Triton X-100 wiederholt. Zur Vermeidung zusätzlicher Einflüsse wurde die Aktivität gegenüber *p*NPP ohne Zugabe Triton X-100 in der Substratlösung bestimmt.

In Tabelle 3-11 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst. Bei Verwendung des Puffers ohne die beiden Zusätze (Nr. 1 und 2) konnte auch nach Zugabe von GA keine Veränderung der Aktivität festgestellt werden. Unter Zusatz von NaCl wurde mit und ohne GA (Nr. 3 bzw. 4) nach 2 h jeweils eine geringfügige Abnahme der Aktivität beobachtet. Im Ansatz mit Triton X-100 blieb die Aktivität ohne GA-Zusatz (Nr. 5) im betrachteten Zeitraum nahezu konstant. Dahingegen wurde in Anwesenheit von GA (Nr. 6) eine deutliche

Aktivitätszunahme auf 378 % erhalten. Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass weder der Carbonat-Bicarbonatpuffer noch der Zusatz von NaCl für die Aktivierung durch GA verantwortlich ist, sondern der Effekt auf die Wirkung von Triton X-100 zurückzuführen ist. Triton X-100 gehört zur Klasse der grenzflächenaktiven Substanzen, dessen kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) im Bereich von 0,013 – 0,015 % liegt (entspricht 0,22 – 0,24 mM) [Sigma-Aldrich, 1999]. Somit konnte unter den gewählten Bedingungen von einer Ausbildung von Mizellen im Ansatz ausgegangen werden. Es wurde vermutet, dass die Grenzflächen der Triton X-100-Mizellen im Reaktionspuffer mit der Lipase interagierten, eine Adsorption der Lipase bewirkten und so zu einer Öffnung des Deckels oberhalb des aktiven Zentrums führten. Diese aktive Konformation könnte durch Reaktion der Lysinreste mit GA stabilisiert bzw. fixiert worden sein infolge dessen die Aktivitätssteigerung auftrat.

Tabelle 3-11: Einfluss der Pufferzusätze auf die Aktivierung der Lipase LipT1-WT. Die einzelnen Spalten geben die jeweiligen Zusätze des verwendeten Reaktionspuffers (50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10) an. Die Inkubation der Lipase (2 U_C/mL) erfolgte über 2 h bei 25 °C. Die relative Aktivität entspricht der nach Inkubation erhaltenen Aktivität der jeweiligen Probe gegenüber pNPP bezogen auf die Startaktivität.

Zusatz	1	2	3	4	5	6	7 Abschnitt 3.2.3.1
500 mM NaCl	-	-	+	+	-	-	+
1 % (v/v) Triton X-100	-	-	-	-	+	+	+
270 µM GA	-	+	-	+	-	+	+
Relative Aktivität [%]	99	101	87	90	105	378	542

3.2.4.3 Untersuchung des Aktivierungsverhaltens von LipA

Im vorherigen Kapitel wurde festgestellt, dass die Aktivitätssteigerung von LipT1-WT durch GA in Zusammenhang mit der Anwesenheit von grenzflächenaktiven Substanzen steht. Die Kombination aus Dialdehyd und Detergenz im Ansatz beeinflusste vermutlich die Konformation der Deckelregion der Lipase. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde untersucht, ob eine Übertragung des Aktivierungseffekts auch auf andere Lipasen möglich ist. Zu diesem Zweck wurde Lipase A aus *Bacillus subtilis* 168 ausgewählt (Abschnitt 2.5), die aus 181 AS besteht und, wie LipT1-WT, ebenfalls 11 Lysinreste besitzt, jedoch nicht über die lipasetypische Deckelregion oberhalb des aktiven Zentrums verfügt [Pouderoyen *et al.*, 2001] und somit keine Grenzflächenaktivierung aufweist [Lesuisse *et al.*, 1993].

Die Produktion und Reinigung von LipA erfolgte analog zu LipT1-WT (Abschnitt 2.9.5 ff.). Die spezifischen Aktivitäten nach Reinigung sind in Tabelle 3-12 zusammengefasst. LipA zeigte gegenüber beiden eingesetzten Substraten jeweils eine deutlich geringere spezifische Aktivität als LipT1-WT. Die Ursache hierfür liegt an unterschiedlichen Spezifitäten der Lipasen gegenüber den eingesetzten Substraten (Hauptfettsäurereste C16 - C18). LipA bevorzugt vergleichsweise kurze Fettsäurereste (C8) [Lesuisse *et al.*, 1993] wohingegen LipT1-WT die höchste Aktivität gegenüber Fettsäureester \geq C12 erreicht [Leow *et al.*, 2007].

Tabelle 3-12: Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Lipasen LipA und LipT1-WT nach Reinigung für zwei verschiedene Substrate.

Substrat	Spezifische Aktivität LipA	Spezifische Aktivität LipT1-WT
Olivenöl	218 U _T /mg	2457 U _T /mg
pNPP	6 U _C /mg	266 U _C /mg

Die Behandlung der Lipase LipA mit GA wurde wie in Abschnitt 2.9.17 beschrieben durchgeführt. Aufgrund der geringeren spezifischen Aktivität wurde die Protein-Konzentration in den Ansätzen auf 63 µg/mL angepasst. Wie in Abbildung 3-28 dargestellt wurde das molare Verhältnis von NH₂-Gruppen zu GA variiert. Im Ansatz mit der höchsten GA-Konzentration (3,7 mM; 1:100) wurde nach 2 h eine leichte Aktivitätsabnahme um 16 % beobachtet. Für das NH₂ : GA - Verhältnis von 1 : 10 (367 µM GA) konnte eine Steigerung der Aktivität auf 120 % festgestellt werden. Bei niedrigeren GA-Konzentrationen sowie der Kontrolle ohne GA blieb die Aktivität im betrachteten Zeitraum nahezu konstant.

Die Ergebnisse zeigen, dass LipA ohne Deckelregion in Gegenwart von GA ein anderes Verhalten als LipT1-WT aufweist. Es trat zwar eine geringfügige Aktivitätssteigerung auf. Diese war allerdings nicht vergleichbar mit der Aktivierung von Lip1-WT. Diese Beobachtungen können als ein weiteres Indiz gewertet werden, dass die starke Aktivitätssteigerung von LipT1-WT durch GA-induzierte Konformationsänderungen der Deckelregion hervorgerufen wurde.

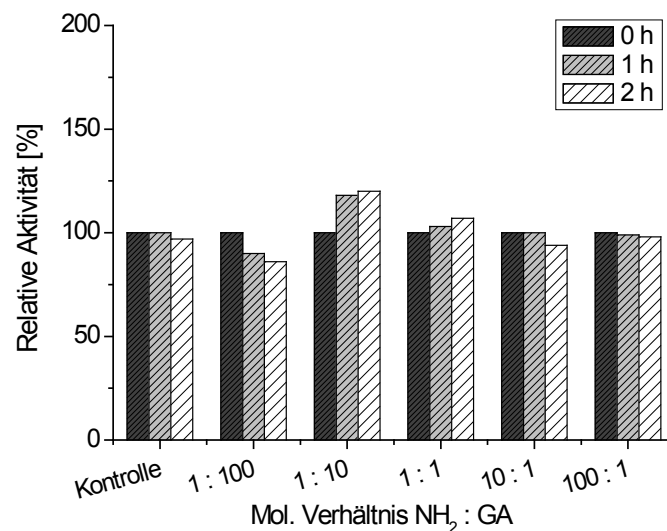


Abbildung 3-28: Einfluss der Glutaraldehyd (GA) - Konzentration auf die Aktivität der Lipase LipA. Die Inkubation von 0,3 U_C/mL mit GA (Gesamtvolumen 1 mL) erfolgte in 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10 mit jeweils 1 % (v/v) Triton X-100 sowie 500 mM NaCl bei 25 °C und 550 rpm (Thermomixer) für 2 h. Die angegebenen molaren Verhältnisse Aminogruppen zu GA entsprechen folgenden GA-Konzentrationen im Ansatz (von links nach rechts): 0 µM (Kontrolle); 3,7 mM; 0,37 mM; 37 µM; 3,7 µM und 0,37 µM. Die relative Aktivität entspricht der nach Inkubation mit GA erhaltenen Aktivität gegenüber pNPP bezogen auf die Startaktivität.

3.2.4.4 Einfluss der GA-Konzentration auf das Aktivierungsverhalten

Nachdem zuvor festgestellt wurde, dass zur Aktivierung der Lipase LipT1-WT ein bifunktionelles Aldehyd sowie die Anwesenheit von Triton X-100 notwendig waren, sollte nun die Abhängigkeit des Aktivierungsverhaltens von der GA-Konzentration untersucht werden. Insbesondere sollte überprüft werden, ob eine Erhöhung der GA-Konzentration zu einer weiteren Aktivitätssteigerung führt. Zu diesem Zweck wurde, in Anlehnung an Abschnitt 3.2.3.1, die Lipase LipT1-WT mit verschiedenen GA-Konzentrationen inkubiert.

Das Ergebnis ist in Abbildung 3-29 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei einer Erhöhung von GA im Ansatz, über die bisher verwendete Konzentration von 270 μM hinaus, die Aktivität der Lipase weiter anstieg. Bei 676 μM GA, was einem molaren Verhältnis NH_2 : GA von 1 : 250 entspricht, wurde eine relative Aktivität von rund 800 % erhalten. Eine weitere Erhöhung des GA-Anteils führte wiederum zu einem Rückgang der messbaren Aktivität. Vermutlich fand unter den untersuchten Bedingungen eine konzentrationsabhängige Polymerisationsreaktion von GA statt, deren Reaktionsprodukte scheinbar einen negativen Einfluss auf die Aktivierung der Lipase hatten. Ein Indiz für eine ablaufende Polymerisation war das Auftreten einer Trübung in verschiedenen Ansätzen. Sowohl in der GA-Verdünnungsreihe (ohne Enzym) als auch in den Reaktionsansätzen $\geq 676 \mu\text{M}$ GA konnte nach einer Standzeit von 4 h die Bildung von Präzipitaten beobachtet werden.

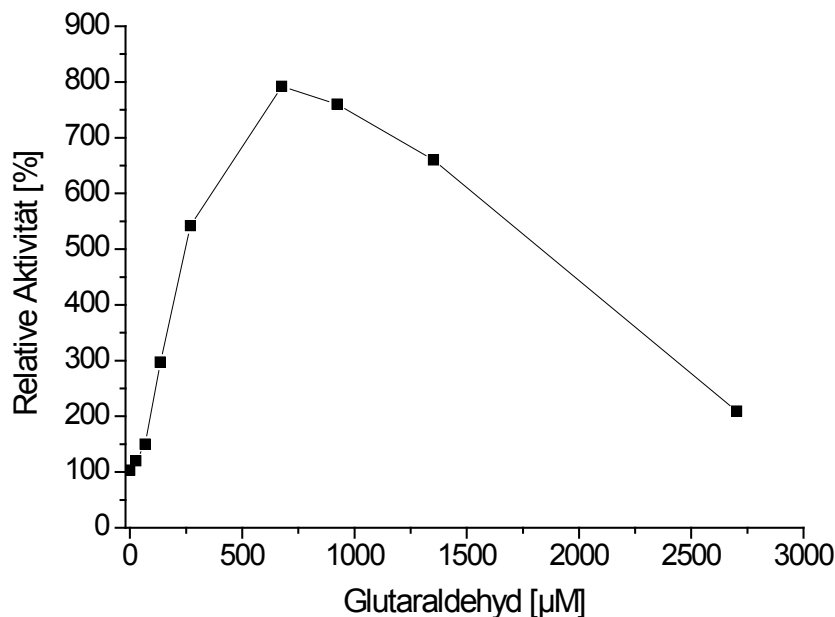


Abbildung 3-29: Einfluss der Glutaraldehyd - Konzentration auf die Aktivität der Lipase LipT1-WT. Die Inkubation von 2 U_c/mL mit GA erfolgte in 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10 mit jeweils 1 % (v/v) Triton X-100 sowie 500 mM NaCl bei 25 °C und 550 rpm (Thermomixer) für 2 h. Die relative Aktivität entspricht der nach Inkubation mit GA erhaltenen Aktivität der jeweiligen Probe gegenüber pNPP bezogen auf die Startaktivität.

Um zusätzliche Effekte durch Grenzflächen in Form von GA-Präzipitaten auszuschließen, wurde bei allen nachfolgenden Untersuchungen nicht die GA-Konzentration mit dem höchsten Aktivierungspotenzial, sondern die zuvor ermittelte „Standardkonzentration“ von 270 μM gewählt. In diesem Zusammenhang wurde zusätzlich untersucht, welchen Einfluss

eine Vorinkubation von GA im Reaktionspuffer auf die Lipase-Aktivierung besitzt. Hierfür wurde GA nach Verdünnung mit Reaktionspuffer für unterschiedliche Zeiten bei 25 °C inkubiert bevor es mit der Lipase-Lösung (Zielkonzentration 270 µM GA) gemischt wurde. Im untersuchten Zeitraum konnte dabei kein Einfluss auf die relative Aktivität festgestellt werden (Abbildung 8-11).

Die erhaltenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass aufgrund der Reaktivität von GA unter den gewählten Bedingungen die Bildung höhermolekularer Strukturen begünstigt wird. In einem Konzentrationsbereich von 27 – 676 µM war für die Lipase ein aktivierender Effekt feststellbar. Bei höheren Konzentrationen wurde dieser Effekt abgeschwächt. Dabei lassen die bisherigen Daten jedoch keine Rückschlüsse auf den tatsächlichen Polymerisationsgrad bzw. die exakte Modifikation der Lysinreste auf der Lipase-Oberfläche zu.

3.2.4.5 Einfluss der Reaktionsdauer und Reduktion mit NaBH₃CN auf die Aktivierung

In anschließenden Analysen wurde der Einfluss der Reaktionsdauer auf das Aktivierungsverhaltens der Lipase LipT1-WT durch GA überprüft. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich ein Reduktionsschritt im Anschluss an die GA-Behandlung auf die Aktivität der Lipase auswirkt. Eine Reduktion wurde in Betracht gezogen, da bei der Reaktion von GA mit Aminogruppen verschiedene Reaktionsmechanismen möglich sind [Migneault *et al.*, 2004; El-Thaher *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2014]. Unter anderem kann auch die Bildung von Schiff'schen Basen nicht ausgeschlossen werden, wobei die gebildeten Iminogruppen aufgrund der Reversibilität der Reaktion nur bedingt stabil sind. Durch Zusatz des Reduktionsmittels NaBH₃CN können Imine in sekundäre Amine überführt werden [Migneault *et al.*, 2004].

Die Durchführung des Versuchs ist in Abschnitt 2.9.17 beschrieben. Wie in Abbildung 3-30 A zu erkennen ist, wurde die höchste Lipase-Aktivität (~ 600 %) nach 3 h erhalten. Eine weitere Verlängerung der Reaktionszeit auf 5 h führte zu keiner zusätzlichen Steigerung. Nach 19 h fiel die relative Aktivität wiederum auf ~ 300 % ab. Aus diesem Grund wurde für alle nachfolgenden Versuche eine Reaktionszeit von 3 h gewählt.

Hinsichtlich der durchgeführten Reduktion konnte festgestellt werden, dass der Zusatz von NaBH₃CN weder die Aktivität der Kontrolle noch die des GA-Reaktionsansatzes wesentlich beeinflusste (Abbildung 3-30 B).

Zusätzlich zur Aktivität wurde das Migrationsverhalten der Lipase nach GA-Behandlung mittels SDS-PAGE untersucht. In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, inwiefern der Zusatz von GA eine Proteinquervernetzung bewirkt und wie sich eine anschließende Reduktion auswirkt. Bahn 2 in Abbildung 3-30 C zeigt Lipase LipT1-WT vor Zugabe von GA. Es sind die Hauptbande der Lipase bei 42 kDa sowie geringfügig proteinogene Verunreinigungen zu erkennen. Nach 2-stündiger Inkubation mit GA (Bahn 3) traten hochmolekulare Produkte auf, die in der Geltasche bzw. an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel zurückgehalten wurden. Statt definierter Banden der proteinogenen Verunreinigungen war ein eher diffuser Hintergrund erkennbar. Die Bande der Lipase LipT1-WT erschien intensiver gefärbt, aber weniger scharf. Diese Beobachtung konnte zum einen darauf zurückgeführt werden, dass durch die Reaktion mit GA-Monomeren bzw. GA-Oligomeren verschieden modifizierte Lipase-Spezies im Ansatz enthalten waren und so eine breitere Molekulargewichtsverteilung auftrat. Zum anderen konnte die intensivere Färbung

der Proteinbande dadurch erklärt werden, dass die zusätzlichen Aldehydgruppen auf der Proteinoberfläche zur Reduktion der Silberionen beitragen und somit das Anfärbeverhalten des Proteins verbesserten [Rabilloud, 1990]. Hinsichtlich der durchgeführten Reduktion mit NaBH_3CN (Bahn 4) wurden kaum Unterschiede zur vorherigen Probe erhalten. Die Lipase-Bande trat geringfügig schärfer auf und war leicht zu einem höheren Molekulargewicht verschoben. Scheinbar bewirkte die längere Inkubationszeit eine zusätzliche Anlagerung von GA-Molekülen an den GA-Lipase-Komplex, was eine Erhöhung des Molekulargewichtes zur Folge hatte.

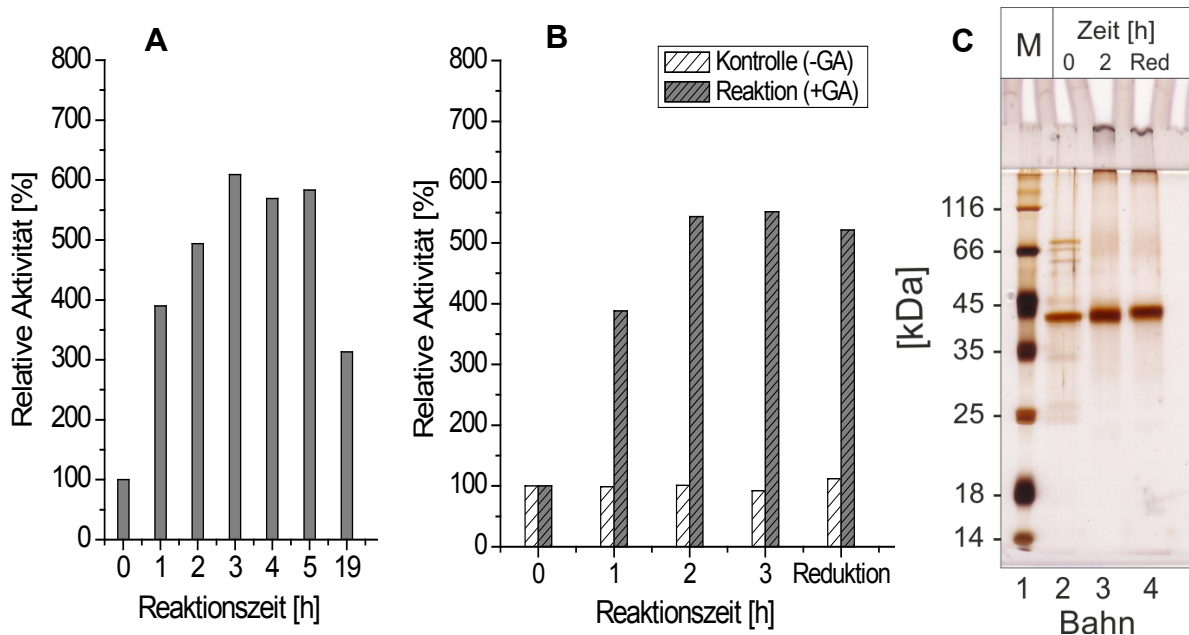


Abbildung 3-30: Einfluss der Reaktionsdauer (A) sowie der Reduktion mit NaBH_3CN (B) auf die Aktivität und das Bandenmuster (C) der Lipase LipT1-WT. Die Inkubation von 2 $\text{U}_\text{C}/\text{mL}$ mit 270 μM GA erfolgte in 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10 mit 1 % (v/v) Triton X-100 sowie 500 mM NaCl bei 25 °C und 550 rpm (Thermomixer). Die Reduktion im Anschluss an die GA-Behandlung wurde mit 0,1 M NaBH_3CN für 1 h durchgeführt. Die relative Aktivität entspricht der nach Inkubation erhaltenen Aktivität gegenüber pNPP bezogen auf die Startaktivität. Zur Analyse mittels SDS-PAGE wurden jeweils 0,26 μg Protein aufgetragen: Bahn 1: Marker; Bahn 2 u. 3: GA-Inkubation über 0 u. 2 h; Bahn 4: Reduktion mit NaBH_3CN . Der Nachweis der Proteinbanden erfolgte mittels Silberfärbung.

Aus den Untersuchungen konnte geschlossen werden, dass die GA-Behandlung der Lipase-Probe zu Proteinquervernetzungen führt. Dies betrifft im Wesentlichen die enthaltenen proteinogenen Verunreinigungen. Eine Quervernetzungsreaktion zwischen Lipase-Molekülen bzw. Lipase- und Wirtszellproteinen konnte jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings zeigen die Ergebnisse, dass überwiegende Teil des Zielproteins auch nach der GA-Behandlung als Monomer vorlag.

3.2.4.6 Untersuchung der GA-Lipase-Aktivierung gegenüber Triacylglyceriden

In den zuvor durchgeführten Untersuchungen konnte unter bestimmten Bedingungen nach GA-Behandlung eine Aktivitätssteigerung der Lipase LipT1-WT gegenüber dem Substrat *p*NPP nachgewiesen werden. Nun sollte überprüft werden, ob der Aktivierungseffekt auch auf die Hydrolyse anderer Substrate übertragen werden kann. Als Modellsubstrate wurden verschiedene Triacylglyceride (TAG) ausgewählt. Dabei kamen Olivenöl, als Gemisch verschiedener TAG (u.a. C16:0; C18:1; C18:2), sowie Tributyrin mit einer definierten Fettsäurezusammensetzung (C4:0) zum Einsatz. Die Durchführung der Modifikation der Lipase LipT1-WT mit 270 μ M GA erfolgte analog zu den Versuchen in Abschnitt 3.2.3.1. Zur Aktivitätsbestimmung wurde die titrimetrische Methode unter Verwendung der o.g. Substrate mit einer Konzentration von jeweils 5 % (v/v) genutzt.

In Abbildung 3-31 ist zu erkennen, dass bei Einsatz von Olivenöl als Substrat die Aktivität sowohl in der Kontrollprobe als auch im Reaktionsansatz mit GA nahezu konstant blieb. Offensichtlich bewirkte die Behandlung mit GA keine Aktivitätssteigerung zur Hydrolyse des Öls. In einer parallelen Messung zur Hydrolyse von *p*NPP konnte jedoch mit den gleichen Proben die zuvor beobachtete Erhöhung der Aktivität durch GA (Faktor 5) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

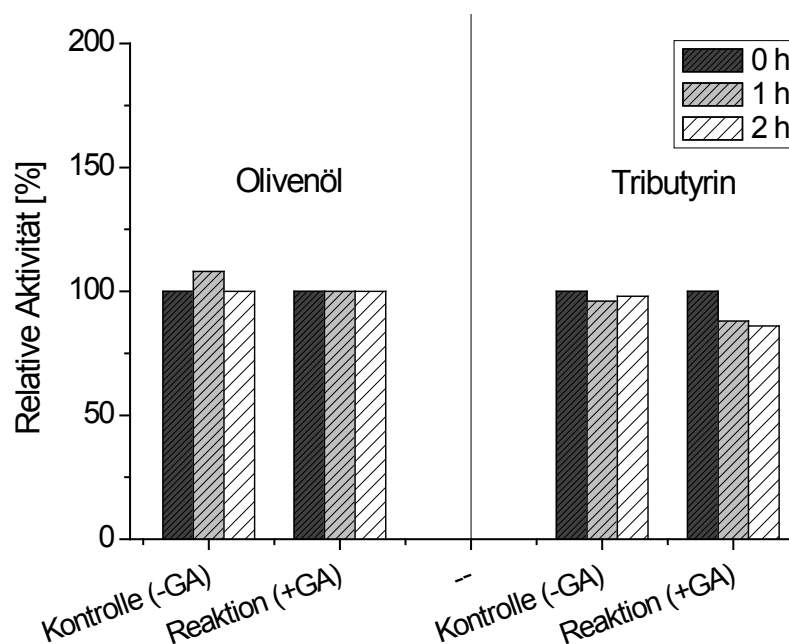


Abbildung 3-31: Einfluss der Glutaraldehyd - Behandlung auf die Aktivität der Lipase LipT1-WT gegenüber Triacylglyceriden. Die Inkubation von 30 U_T /mL (entspricht 2 U_C /mL) mit 270 μ M GA (Gesamtvolumen 1 mL) erfolgte in 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10 mit jeweils 1 % (v/v) Triton X-100 sowie 500 mM NaCl bei 25 °C und 550 rpm (Thermomixer) für 2 h. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Aktivität titrimetrisch gegenüber den Substraten Olivenöl bzw. Tributyrin (jeweils 5 % (v/v)) vermessen. Die relative Aktivität entspricht der nach Inkubation mit GA erhaltenen Aktivität der jeweiligen Probe bezogen auf die Startaktivität.

Da die GA-Modifikation der Lipase keinen Effekt bei der Spaltung von TAGs aus Olivenöl zeigte, wurde vermutet, dass die Größe des Substrates einen Einfluss auf die Aktivierung besitzt. Die Glyceride in Olivenöl bestehen zum überwiegenden Teil aus langkettigen Fettsäuren (8 – 20 % C16:0; 55 – 83 % C18:1; 4 – 21 % C18:2) [DGF, 2011].

Aus diesem Grund wurde zusätzlich Tributyrin, das mit Butylestergruppen (C4) deutlich kürzere Fettsäurereste ausweist, für die Untersuchungen eingesetzt. Allerdings ließ auch, wie in Abbildung 3-31 ersichtlich, die Verwendung von Tributyrin keine Rückschlüsse auf eine Aktivierung der Lipase durch GA zu. Demnach scheint der GA-Aktivierungseffekt für TAG-Substrate nicht aufzutreten.

3.2.5 Lipase-Immobilisierung über Histidin

Bereits bei der Aufarbeitung der Lipase-Varianten diente der His₆-tag zur Affinitätsreinigung. Als weitere Strategie zur zielgerichteten Kopplung wurde deshalb der Ansatz verfolgt die Enzyme über diesen His₆-tag zu immobilisieren. Neben der zahlreichen Vorteile des tags hinsichtlich Größe und Bindungseigenschaften (Abschnitt 1.2.3) kann im Zusammenhang mit der Enzymimmobilisierung die Reversibilität der Bindung als weiterer positiver Aspekt angesehen werden. Im Fall der Enzyminaktivierung nach Einsatz des Immobilisats besteht die Möglichkeit das inaktive Protein vom Träger zu eluieren und diesen durch Neubeladung mit Enzym zu regenerieren. Im Folgenden wurde zunächst die Kopplung der Lipase LipT1-WT über den vorhandenen, C-terminalen His₆-tag untersucht. Darauf aufbauend wurde versucht die Ergebnisse auf eine GA-modifizierte Lipase zu übertragen.

3.2.5.1 Kopplung der unmodifizierten Lipase LipT1-WT

Zur Immobilisierung der Lipase LipT1-WT über den C-terminalen His₆-Tag wurde das Trägermaterial *Streamline chelating* (Abschnitt 2.6) verwendet, das mit Ni²⁺-Ionen beladen wurde („Ni²⁺-SC“). In Abschnitt 3.1.3 (Lipase-Reinigung) konnte bereits gezeigt werden, dass grundsätzlich die Bindung des Zielproteins an den Träger möglich ist und eine Elution der Lipase erfolgreich durchgeführt werden kann. Mithilfe der Modellreaktion zur Hydrolyse von pNPP sollten diese Erkenntnisse nun für die Bilanzierung der Immobilisierung von LipT1-WT genutzt werden.

Die Durchführung ist in Abschnitt 2.9.20 beschrieben. Folgende Anpassungen wurden vorgenommen: Zur Kopplung wurden 21,6 U_C der Lipase LipT1-WT und 2,5 g Ni²⁺-SC eingesetzt (Startaktivität / Trägermenge = 8,6 U_C/g). Nach den angegebenen Waschschrritten wurden 2 g zur Untersuchung des Elutionsverhaltens genutzt. Die verbliebene Menge diente zur Aktivitätsbestimmung auf dem Träger.

Abbildung 3-32 zeigt die relativen und absoluten Aktivitäten der einzelnen Schritte der Immobilisierung. Nach einstündiger Inkubation von Enzym und Träger konnte im Kopplungsüberstand keine Lipase-Aktivität nachgewiesen werden. Demzufolge lag die Kopplungsausbeute bei 100 %. Das Immobilisat wurde anschließend mit verschiedenen Puffern gewaschen. Dennoch war in den einzelnen Waschfraktionen keine Aktivität messbar. Dies lässt darauf schließen, dass unter den getesteten Bedingungen die Bindung zwischen Enzym und Träger stabil ist und keine unspezifische Adsorption auftrat. Die messbare Aktivität auf dem Träger betrug 2 U_C/g. Dementsprechend konnten 23 % der initial eingesetzten Aktivität auf dem Träger wiedergefunden werden. Es wurde vermutet, dass ein deutlich höherer Anteil des Zielproteins auch nach der Kopplung aktiv blieb, jedoch aufgrund der Porosität des Trägermaterials nur bedingt mit dem Substrat pNPP in Kontakt kam. Aus diesem Grund wurde versucht, die Lipase durch Zusatz von Imidazol zu eluieren. Nach vier Elutionsschritten konnten 85 % der zu Beginn eingesetzten Aktivität detektiert werden. In Elutionsfraktion 5 war keine Aktivität nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Immobilisierung von LipT1 an Ni²⁺-SC möglich ist und die Kopplung spezifisch und schonend abläuft. Es konnte bestätigt werden, dass nach Bindung und Elution des Enzyms dessen Aktivität weitestgehend erhalten bleibt.

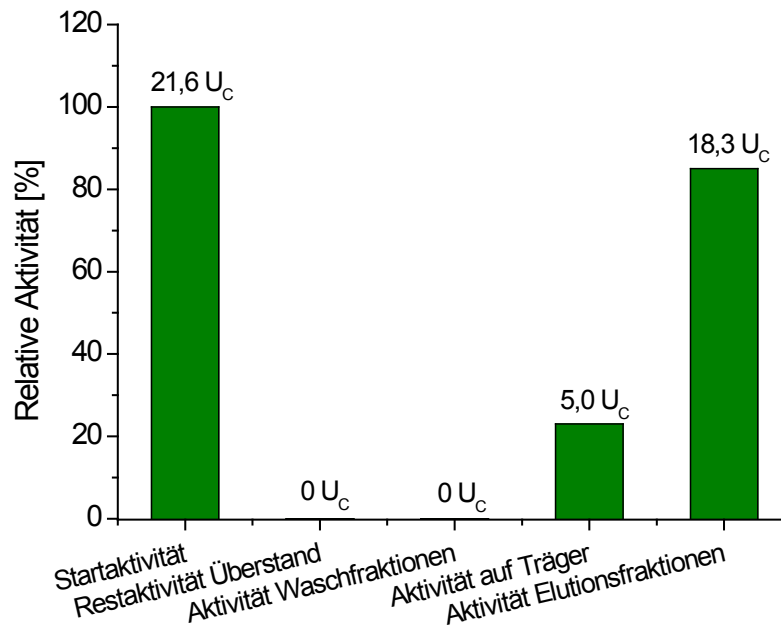


Abbildung 3-32: Bilanzierung der Lipase-Immobilisierung auf Ni²⁺-SC. Zur Kopplung wurden 21,6 U_C der Lipase LipT1-WT und 2,5 g Ni²⁺-SC eingesetzt (Trägerbeladung: 8,6 U_C/g). Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 25 °C. Nach Waschen des Trägers (dreimal 10 mL KP I; dreimal 10 mL KP I ohne Triton X-100) wurde das Immobilisat geteilt (2 g für Elution mit fünfmal 10 mL Elutionspuffer II; 0,5 g für Aktivitätsbestimmung auf Träger; messbare Aktivität: 2 U_C/g). Die oberhalb der Säulen angegebenen Werte entsprechen den in den einzelnen Schritten erhaltenen Aktivitäten gegenüber dem Substrat pNPP. Zur Bilanzierung wurde die eluierbare Aktivität aus 2 g Immobilisat auf den Gesamtansatz (2,5 g) hochgerechnet.

3.2.5.2 Einfluss der GA-Modifikation und Trägerbeladung auf die Lipase-Kopplung

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Lipase LipT1-WT nach Immobilisierung an Ni²⁺-SC aktiv bleibt. Nun sollte überprüft werden, ob eine Übertragung der Bedingungen auf die gegenüber pNPP deutlich aktivere, GA-modifizierte Lipase „GA-LipT1-WT“ möglich ist. Da zuvor außerdem beobachtet wurde, dass die Aktivitätswiederfindung von der tatsächlich gekoppelten Enzymmenge abweicht, wurde zusätzlich der Einfluss der Trägerbeladung auf die Wiederfindung untersucht. Zu diesem Zweck wurde entsprechend die Startaktivität für GA-behandelte und unmodifizierte Lipase LipT1-WT variiert. Die Durchführung erfolgte wie in Abschnitt 2.9.20 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-33 sowie Tabelle 3-13 zusammengefasst.

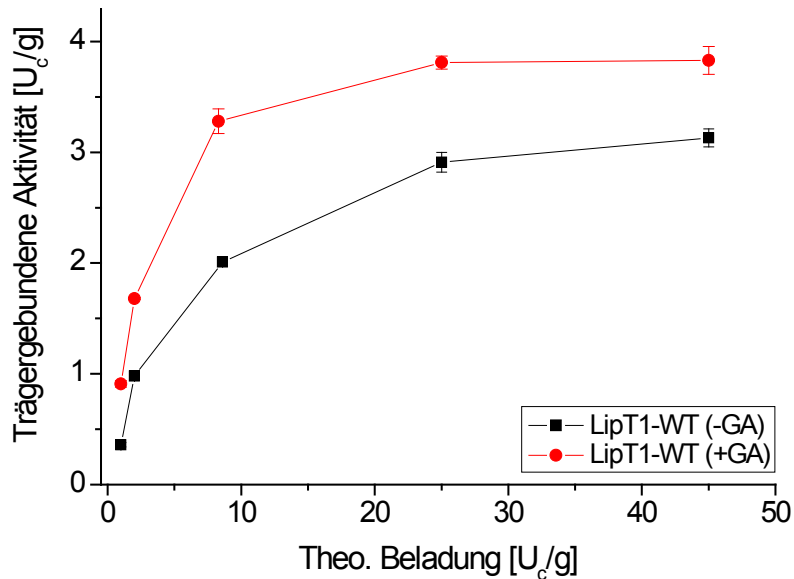


Abbildung 3-33: Einfluss der Beladung auf die trägergebundene Aktivität der Lipasen LipT1-WT und GA-LipT1-WT nach Immobilisierung auf Ni²⁺-SC. Zur Variation der Beladung wurden 0,5 g Ni²⁺-SC mit der entsprechenden Menge Lipase in 10 mL KP I für 60 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde das Immobilisat gewaschen (dreimal 10 mL KP I; dreimal 10 mL KP I ohne Triton X-100) und die Aktivität gegenüber pNPP bestimmt (n=3). Die theo. Beladung bezieht sich auf die Startaktivität vor Durchführung der GA-Behandlung.

In Abbildung 3-33 ist zu erkennen, dass für beide Lipase-Varianten mit Erhöhung der Beladung die messbare Aktivität auf dem Träger anstieg. Beide Lipasen zeigten nach zunächst starkem Anstieg der Aktivität ein Sättigungsverhalten. Ab ca. 25 U_c/g hatte eine zunehmende Beladung keinen nennenswerten Einfluss auf die trägergebundene Aktivität. Die höchsten Werte lagen für LipT1-WT und GA-LipT1-WT bei 3,1 bzw. 3,8 U_c/g. Da die Restaktivität im Kopplungsüberstand nach 1 h bei allen Ansätzen < 1 % betrug, konnten aus dem beobachteten Sättigungsverlauf keine Rückschlüsse auf ein Erreichen der Kapazitätsgrenze des Trägermaterials gezogen werden.

Grundsätzlich konnte aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass eine Kopplung an Ni²⁺-SC auch für die GA-modifizierte Lipase LipT1-WT möglich ist. Dabei konnten im Vergleich zur unbehandelten Lipase 1,2 - 2,5-fach höhere Aktivitäten auf dem Träger nachgewiesen werden. In einem Nebenversuch wurde zusätzlich festgestellt, dass die Kopplung auch ohne Pufferwechsel auf KP I erfolgreich durchgeführt werden kann. Die Anwesenheit von GA und NaBH₃CN sowie ein pH-Wert von 10 im Kopplungsansatz scheinen die Bindung des Zielproteins nicht zu beeinflussen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3-13: Einfluss der Beladung auf die Aktivität und Wiederfindung der Lipasen LipT1-WT und GA-LipT1-WT nach Kopplung auf Ni²⁺-SC. Die Aktivität auf dem Träger wurde gegenüber pNPP bestimmt (n=3). Die Wiederfindung bezieht sich auf die Startaktivität vor GA-Behandlung.

Theoretische Beladung [U _c /g]	LipT1-WT		GA-LipT1-WT	
	Trägergebundene Aktivität [U _c /g]	Wiederfindung [%]	Trägergebundene Aktivität [U _c /g]	Wiederfindung [%]
1	0,36 ± 0,02	36	0,91 ± 0,03	91
2	0,98 ± 0,03	49	1,68 ± 0,01	84
8,6	2,01 ± 0,03	23	3,28 ± 0,11	40
25	2,91 ± 0,09	12	3,81 ± 0,06	16
45	3,13 ± 0,08	7	3,83 ± 0,16	9

Die Aktivitätswiederfindung auf dem Träger (Tabelle 3-13) war für beide Lipase-Varianten abhängig von der eingesetzten Beladung. Bei Verringerung der Beladung konnte der Anteil der nachweisbaren Aktivität deutlich gesteigert werden. Für LipT1-WT erreichte dieser Wert bei 2 U_c/g rund 49 %. Die wiederum verringerte Wiederfindung von 36 % bei 1 U_c/g könnte aufgrund der geringen Enzymmenge und einer nicht-idealen Durchmischung bei Enzymzugabe auf eine ungleichmäßige Beladung des Trägers zurückgeführt werden. Im Fall von GA-LipT1-WT wirkten sich eine niedrige Beladung und der Aktivierungseffekt durch GA besonders positiv auf die Wiederfindung aus, so dass bis zu 91 % der eingesetzten Aktivität auf dem Träger nachweisbar waren.

3.2.5.3 Untersuchung der Wiederverwendbarkeit der mittels His₆-tag immobilisierten Lipase GA-LipT1-WT

Nachdem festgestellt wurde, dass eine Kopplung der Lipase LipT1-WT nach GA-Modifikation über den His₆-tag möglich ist und die Aktivität nach Immobilisierung erhalten bleibt, sollte die Stabilität des Immobilisats untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde GA-LipT1-WT auf Ni²⁺-SC wiederholt zur Hydrolyse von pNPP eingesetzt. Die Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 2.9.21 beschrieben. Abbildung 3-34 zeigt, dass bei Wiederverwendung des Immobilisats nahezu kein Aktivitätslust auftrat. Nach zehn Durchgängen lag die Restaktivität bei 96 %.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die Kombination aus GA-Behandlung und His₆-tag-vermittelter Kopplung der Lipase LipT1-WT möglich ist. Das resultierende Immobilisat konnte im Hinblick auf die Wiederverwendbarkeit unter den verwendeten Bedingungen als ausreichend stabil eingeschätzt werden.

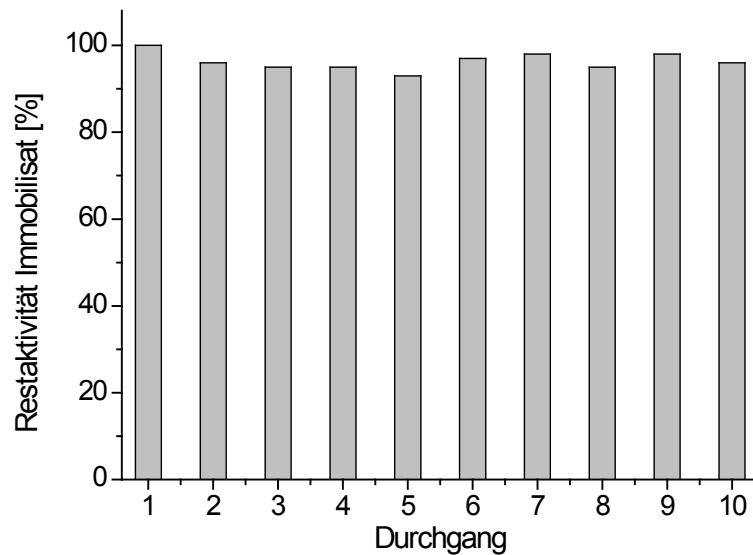


Abbildung 3-34: Restaktivität der auf Ni²⁺-SC immobilisierten, GA-behandelten Lipase LipT1-WT bei wiederholtem Einsatz zur Hydrolyse von pNPP. Die Kopplung der GA-modifizierten Lipase erfolgte nach Abschnitt 2.9.20. Die theoretische Beladung, bezogen auf Lipase-Aktivität vor GA-Behandlung, betrug 45 U₀/g. Nach dreimaligem Waschen des Immobilisats (mit jeweils 1,5 mL Puffer KP I sowie Assay-Puffer) wurde das Immobilisat (25 mg) zur Hydrolyse des Substrates pNPP eingesetzt. Das Waschen des Trägers zwischen den Zyklen erfolgte mit 50 mL Puffer KP I ohne Triton X-100 sowie 1 mL KP I. Die Restaktivität beschreibt die im jeweiligen Durchgang gemessene Aktivität bezogen auf die Ausgangsaktivität des Immobilisats (3,4 U₀/g).

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Produktion und Immobilisierung von Lipasen. Lipasen bilden eine Gruppe vielseitig einsetzbarer Enzyme, die für zahlreiche, wirtschaftlich interessante Stoffumsetzungen, wie z.B. die Hydrolyse, Umesterung oder Epoxidierung von Lipiden relevant sind [Hasan *et al.*, 2006; Rajendran *et al.*, 2009; Aouf *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015]. Eine Grundvoraussetzung für entsprechende biokatalytische Reaktionen ist die Bereitstellung von stabilen Enzympräparaten, die aus ökonomischen Gründen wiederholt im Prozess eingesetzt werden sollten.

4.1 Produktion der Lipasen

Ein Ziel der Arbeit war zunächst die Etablierung eines Verfahrens zur Produktion der Lipasen LipT1-WT, LipA und LipL1. Dieses Verfahren sollte nachfolgend auf verschiedene Varianten von LipT1-WT übertragen werden, um Untersuchungen zur zielgerichteten Immobilisierung durchführen zu können.

Als Produktionsorganismus wurde *E. coli* ausgewählt. Dieser Organismus bietet aufgrund der einfachen genetischen Zugänglichkeit, eines schnellen Wachstums und meist hohen Ausbeuten an heterologem Protein zahlreiche Vorteile für die Produktion von *Bacillus*-Lipasen [Guncheva und Zhiryakova, 2011]. Zur Herstellung der Lipasen wurde in Rahmen der vorliegenden Arbeit ein hefeextraktbasiertes Komplex-Medium (PM-Medium) mit Glycerin als zusätzliche Kohlenstoffquelle gewählt. Dieses Medium wurde zuvor erfolgreich für die Produktion von Proteinen aus der Gruppe der transformierenden Wachstumsfaktoren (*bone morphogenetic proteins* BMP-2) [Hillger *et al.*, 2005], für humane Rezeptoren (Parathormonrezeptor PTH1R) [Oschmann, 2008] und für Designer-Proteine mit künstlicher Aminosäuresequenz eingesetzt [Gerber *et al.*, 2008]. Durch die Verwendung von PM-Medium sollte im Hinblick auf eine Vergrößerung des Produktionsmaßstabs eine einfache Übertragbarkeit vom Schüttelkolben- auf den Bioreaktormaßstab realisiert werden. Der Einsatz von Glycerin als Kohlenstoffquelle bietet im Vergleich zur häufig verwendeten Glucose verschiedene Vorteile. Zum einen kann dadurch die Bildung von *overflow-metaboliten*, wie z.B. Acetat, verringert werden [Losen *et al.*, 2004]. Zum anderen kann aus Sicht der Prozessintegration eine Verwendung von Glycerin vorteilhaft sein. Lipasen katalysieren, neben zahlreichen weiteren Reaktionen, die Hydrolyse von Triacylglyceriden [Ribeiro *et al.*, 2011]. Die dabei freigesetzten Fettsäuren können enzymatisch z.B. durch Epoxidierung oder Veresterung in wirtschaftlich interessante Produkte überführt werden [Stergiou *et al.*, 2013; Aouf *et al.*, 2014]. Das bei der Hydrolyse entstehende Glycerin könnte wiederum nach entsprechender Aufbereitung als Koppelprodukt in die Produktion des Biokatalysators zurückgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die jeweils produzierte Aktivität der untersuchten Lipasen titrimetrisch unter Verwendung von Olivenöl als Substrat bestimmt und in Units U_T angegeben (Abschnitt 2.8.2.1). Da in den literaturbeschriebenen Lipase-Aktivitätstests eine hohe Diversität hinsichtlich angewendeter Messprinzipien, Substrate und Testbedingungen vorherrscht [Lesuisse *et al.*, 1993; Rua *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 2003; Quyen *et al.*, 2003; Leow *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2010], war ein direkter Literaturvergleich der produzierten Aktivität (in U) nur bedingt möglich. Aus diesem Grund

wurde als Vergleichsparameter die produzierte Zielproteinmenge herangezogen. Die Bestimmung erfolgte über die verfügbaren Angaben zur spezifischen Aktivität des jeweils gereinigten Proteins.

Zunächst wurde die Produktion der Lipase LipT1-WT im Schüttelkolbenmaßstab (500 mL) untersucht (Abschnitt 3.1.1). Dabei konnten $6,8 \cdot 10^4 \text{ U}_T/\text{L}_{\text{Medium}}$ (entspricht $1,1 \cdot 10^4 \text{ U}_T/\text{g}_{\text{BFM}}$) produziert werden. Ausgehend von einer spezifischen Aktivität der Lipase LipT1-WT von $2,8 \cdot 10^3 \text{ U}_T/\text{mg}_{\text{Protein}}$ entspricht dies $24 \text{ mg}/\text{L}_{\text{Medium}}$ ($4 \text{ mg}/\text{g}_{\text{BFM}}$). In Tabelle 4-1 sind verschiedene, literaturbeschriebene Lipase-Ausbeuten nach homologer sowie heterologer Produktion vergleichend dargestellt. Leow *et al.* nutzten *E. coli* BL21(DE3)pLysS zur Expression der Lipase mit nativer Signalsequenz und als Fusionsprotein mit GST-tag. Es wurden $11,5 \text{ mg}/\text{L}_{\text{Medium}}$ erhalten [Leow *et al.*, 2004]. Nach Entfernung der nativen Signalsequenz sowie Optimierung von Induktorkonzentration, Induktionszeitpunkt und -dauer lag die Zielproteinkonzentration bei $43,7 \text{ mg}/\text{L}_{\text{Medium}}$ [Leow *et al.*, 2007]. Im Vergleich dazu wurde bei der Produktion der nativen Lipase im Ursprungsorganismus *Geobacillus zalihae* eine Konzentration von $0,16 \text{ mg}/\text{L}_{\text{Medium}}$ erreicht [Rahman *et al.*, 2007]. In diesem Zusammenhang zeigt sich, dass die rekombinante Herstellung der Lipase LipT1-WT in *E. coli* deutliche Vorteile gegenüber der Produktion im Ursprungsorganismus bietet. Unter den gewählten Bedingungen konnte das Zielenzym im Schüttelkolbenmaßstab in aktiver Form hergestellt werden, so dass nachfolgend zur Erhöhung der Produktausbeute die Übertragung auf den Bioreaktor erfolgen konnte.

Tabelle 4-1: Vergleich der produzierten Mengen verschiedener (Geo)Bacillus-Lipasen. Die Berechnung der Produktkonzentration in $[\text{mg}/\text{mL}_{\text{Medium}}]$ erfolgte über die verfügbaren Angaben zur spezifischen Aktivität der jeweiligen Lipase: a) 958 U/mg; b) 54.887 U/mg; c) 23.000 U/mg; d) 1.963 U/mg; e) 2.880 U/mg; f) 218 U/mg; g) 1.411 U/mg. Unterschiede der Konstrukte: 1) homologe Produktion; 2) mit nativer Signalsequenz und GST-tag; 3) mit GST-tag; 4) mit C-terminalem His₆-tag.

Lipase	Ursprungsorganismus	Produktionsorganismus	Maßstab [L]	Produkt-Konzentration $[\text{mg}/\text{L}_{\text{Medium}}]$	Referenz
LipT1 ¹⁾	<i>G. zalihae</i>	<i>G. zalihae</i>	0,1	0,16 ^{a)}	[Rahman <i>et al.</i> , 2007]
LipT1 ²⁾	<i>G. zalihae</i>	<i>E. coli</i>	0,2	11,5 ^{a)}	[Leow <i>et al.</i> , 2007]
LipT1 ³⁾	<i>G. zalihae</i>	<i>E. coli</i>	0,2	43,7 ^{a)}	[Leow <i>et al.</i> , 2007]
BTL2	<i>B. thermocatenuatus</i>	<i>E. coli</i>	80	10,8 ^{b)}	[Rua <i>et al.</i> , 1997]
BTL2	<i>B. thermocatenuatus</i>	<i>P. pastoris</i>	5	13,4 ^{c)}	[Quyen <i>et al.</i> , 2003]
LipL1	<i>B. stearrowthermophilus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	5	640 ^{d)}	[Ahn <i>et al.</i> , 2003]
LipT1 ⁴⁾	<i>G. zalihae</i>	<i>E. coli</i>	0,5	24 ^{e)}	vorliegende Arbeit
LipT1 ⁴⁾	<i>G. zalihae</i>	<i>E. coli</i>	36	450 ^{e)}	vorliegende Arbeit
LipA ⁴⁾	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	36	339 ^{f)}	vorliegende Arbeit
LipL1 ⁴⁾	<i>B. stearrowthermophilus</i>	<i>E. coli</i>	36	368 ^{g)}	vorliegende Arbeit

Ein grundlegender Vorteil der Kultivierung im Bioreaktor besteht darin, dass im Vergleich zum Schüttelkolben eine bessere Kontrolle der Wachstumsbedingungen des Produktionsorganismus möglich ist. Durch geeignete Zufütterungsstrategien lassen sich die Biomassekonzentration und in der Regel die Zielproteinkonzentration deutlich steigern [Yee und Blanch, 1992; Gnoth *et al.*, 2007]. Über die Zufütterungsrate kann die Wachstumsrate der Zellen geregelt werden und die Bildung von wachstumshemmenden Nebenprodukten, wie z.B. Acetat, verringert werden [Eiteman und Altman, 2006; Jenzsch *et al.*, 2006].

Zur Übertragung der Ergebnisse aus dem Labormaßstab in den Produktionsmaßstab müssen Prozessparameter wie Rührergeschwindigkeit und Begasung entsprechend angepasst werden. In Abhängigkeit der Anforderungen an den jeweiligen Prozess werden in der Literatur verschiedene Vorgehensweisen vorgeschlagen. Häufig genutzte Scale-Up-Kriterien sind in diesem Zusammenhang ein konstanter spezifischer Leistungseintrag, ein konstanter volumenbezogener Sauerstoffübergangskoeffizient ($k_{L,a}$), eine konstante Umfangsgeschwindigkeit des Rührers oder eine konstante Gelöstsauerstoffkonzentration [Junker, 2004; Garcia-Ochoa und Gomez, 2009]. Da in der Regel bei der aeroben Kultivierung von *E. coli* die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff den wichtigsten Faktor darstellt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) als Kriterium herangezogen. Clark-Elektroden zur Messung des pO_2 -Wertes in der Fermentationsbrühe gehören zur Standardausstattung eines Bioreaktors. Über Regler können Rührergeschwindigkeit und Begasungsrate angepasst werden, so dass ein Konstanthalten des pO_2 möglich ist. Dies stellt eine einfache und robuste Methode zur Realisierung der Sauerstoffversorgung von Mikroorganismen in verschiedenen Maßstäben dar [Schmidt, 2005]. Alle Fermentationsprozesse in der vorliegenden Arbeit zur Produktion der Lipasen wurden mit einem konstantem pO_2 von 25 % durchgeführt.

Hinsichtlich Maßstabsvergrößerung des Produktionsprozesses erfolgte nach der Kultivierung im Schüttelkolben zunächst ein *fed-batch*-Prozess im 12 L-Maßstab, der anschließend auf ein Volumen von 36 L skaliert wurde. Im Fall der Lipase LipT1-WT fand außerhalb der vorliegenden Arbeit ein weiteres Scale-Up auf 200 L statt.

In Abschnitt 3.1.2 sind exemplarisch die Ergebnisse der Fermentation im 36 L-Maßstab dargestellt. Im Prozess wurde nach 12 h eine BTM-Konzentration von 20 g/L erreicht. Aus dem Kurvenverlauf in Abbildung 3-2 kann geschlossen werden, dass eine Prozessverlängerung zu einer weiteren Steigerung der BTM-Konzentration führen würde. Gleiches würde vermutlich auch für die volumetrische Lipase-Aktivität gelten. Nach einer Induktionszeit von 6 h wurden $1,26 \cdot 10^6$ U_T/L_{Medium} erreicht. Dies entspricht einer Zielproteinkonzentration von 450 mg/L_{Medium} bzw. einer BFM-spezifischen Aktivität von 4,3 mg/g_{BFM} (22 mg/g_{BTM}) und stellt im Vergleich zur Schüttelkolbenkultivierung eine Steigerung um das 19-fache dar. Eine vergleichbare Produktkonzentration wurde für LipT1-WT bisher nicht beschrieben.

Durch Optimierung verschiedener Parameter wie Medienzusammensetzung, Zufütterungsstrategie und Induktorkonzentration ist eine Erhöhung der produzierten Lipase-Menge vorstellbar. Weitere Steigerungen könnten vermutlich ebenso durch eine Anreicherung der Zuluft mit Sauerstoff, Verwendung spezieller Dialysereaktoren und genetischer Modifikationen zur Reduzierung der Acetatbildung erzielt werden [Lee, 1996; Shiloach und Fass, 2005].

Im Fall anderer *Bacillus* – Lipasen wurden bei der rekombinanten Produktion im Bioreaktor, je nach Lipase und Produktionsorganismus, unterschiedliche Ergebnisse erhalten (Tabelle 4-1). Für Lipase 2 aus *Bacillus thermocatenulatus* (BTL2) wurden bei der Kultivierung von

E. coli BL321 im 80 L – Maßstab 10,8 mg/L_{Medium} erreicht [Rua *et al.*, 1997]. Quyen *et al.* nutzten *Pichia pastoris* zur Produktion von BTL2. Die Produktkonzentration lag nach 120 h bei 13,4 mg/L_{Medium} [Quyen *et al.*, 2003]. Zur rekombinanten Herstellung der Lipase LipL1 aus *Bacillus stearothermophilus* wurde von Ahn *et al.* die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendet [Ahn *et al.*, 2003]. Im 5 L-Maßstab wurden nach 73 h ca. 640 mg/L_{Medium} erhalten. In Abbildung 3-3 (Abschnitt 3.1.2) sind die erhaltenen biomassespezifischen Aktivitäten der verschiedenen Maßstäbe zur Produktion von LipT1-WT verglichen. Die durchschnittliche Aktivität lag bei $1,1 \cdot 10^4$ U_T/g_{BFM}, was 4 mg/g_{BFM} entspricht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Produktionsstufen festgestellt werden. Zusätzlich war außerhalb der vorliegenden Arbeit ein weiteres Scale-Up auf 200 L möglich, ohne dass eine Verringerung der biomassespezifischen Aktivität eintrat. Aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse in den verschiedenen Produktionsstufen kann die Maßstabsübertragung als erfolgreich angesehen werden.

Das zur Herstellung von LipT1-WT etablierte Verfahren wurde ebenfalls zur Produktion der Lipasen LipA und LipL1 genutzt. In den entsprechenden Fermentationsverfahren im 36 L – Maßstab wurden für LipA $7,4 \cdot 10^4$ U_T/L_{Medium} und für LipL1 $5,2 \cdot 10^5$ U_T/L_{Medium} erhalten. Die Zielproteinkonzentrationen betragen 340 mg/L_{Medium} bzw. 370 mg/L_{Medium} und lagen im Bereich literaturbeschriebener Verfahren (Tabelle 4-1).

Die Unterschiede in den produzierten volumetrischen Aktivitäten der drei Lipasen LipT1, LipA und LipL1 (vgl. Tabelle 3-1) lassen sich auf verschiedene Ursachen zurückführen. Zum einen korreliert die geringere Aktivität, die für LipA und LipL1 bestimmt wurde, mit der jeweiligen Substratspezifität. Als Substrat wurde Olivenöl eingesetzt, das bei der Aktivitätsbestimmung je nach Lipase unterschiedlich gut umgesetzt werden konnte (vgl. Tabelle 8-2 im Anhang). Olivenöl besteht zum überwiegenden Teil aus veresterten, langkettigen Fettsäureresten (C16 - C18) [DGF, 2011]. Es ist bekannt, dass LipA die höchste Aktivität gegenüber C8-Fettsäureresten zeigt [Lesuisse *et al.*, 1993]. LipT1-WT und LipL1 akzeptieren dagegen auch länger-kettige Fettsäuren mit ≥ 12 C-Atomen [Kim *et al.*, 2000; Leow *et al.*, 2007]. Zum anderen traten Schwankungen in Startbiomassekonzentration der einzelnen Produktionsstämme im Bereich von 0,15 g/L bis 0,26 g/L auf. Diese Schwankungen zu Prozessbeginn werden durch den in der *batch*-Phase vorliegenden Substratüberschuss und das damit einhergehende „unlimitierte“ Wachstum zusätzlich verstärkt [Jenzsch *et al.*, 2006]. Die daraus resultierenden Unterschiede der Biomassekonzentration in der Induktionsphase wirken sich auf die produzierte Zielproteinmenge aus. Des Weiteren lag die segregative Plasmidstabilität in den Prozessen für LipA und LipL1 mit 87 % bzw. 83 % niedriger als bei LipT1-WT (99 %). Plasmidfreie Zellen haben durch den Plasmidverlust aufgrund der geringeren metabolischen Belastung einen Wachstumsvorteil gegenüber plasmidtragenden Zellen, tragen jedoch nicht zur Produktion des Zielproteins bei [Hellmuth *et al.*, 1994; Friehs, 2004].

Zusammenfassend zeigen die diskutierten Resultate, dass auf Basis des Hefeextrakt-Glycerin-Mediums ein vergleichsweise einfaches Verfahren zur Gewinnung der Lipase LipT1-WT etabliert werden konnte. Die Produktion konnte ohne vorherige Medienadaption auf den Bioreaktor übertragen werden. Weiterhin war das Verfahren ohne Verringerung der BFM-Aktivität auf 200 L skalierbar. Im Vergleich zur Literatur konnte die bisher größte volumetrische Ausbeute an Zielprotein erreicht werden. Zusätzlich war eine Übertragung der Prozessbedingungen auf die Produktion der Lipasen LipA und LipL1 im Bioreaktor (36 L) sowie von sieben LipT1-Mutanten im Schüttelkolbenmaßstab möglich.

4.2 Reinigung der Lipasen

Zur Aufarbeitung der verschiedenen Lipasen mittels Affinitätschromatographie wurde jeweils ein C-terminaler Polyhistidin-*tag* (His₆) genutzt. Beim Versuch die Zielproteine über Chromatographiesäulen zu reinigen traten infolge von irreversibler Aggregation hohe Aktivitätsverluste von bis zu 96 % auf. Es wurde vermutet, dass sich bei der Bindung der Lipase an das Chromatographiematerial lokal hohe Proteinkonzentrationen einstellten. Durch die Elution kam es zur lokalen Übersättigung und infolge dessen zur Präzipitation des Zielproteins. Allgemein zeigen Lipasen aufgrund ihrer hydrophoben Proteinoberfläche eine vergleichsweise starke Tendenz bereits bei geringen Konzentrationen Aggregate zu bilden [Lesuisse *et al.*, 1993; Liou *et al.*, 1998; Palomo *et al.*, 2003a; Salameh und Wiegel, 2010]. Zur Verringerung der Aggregation bei der Lipase-Reinigung sind u.a. Strategien beschrieben, in denen durch sehr flache Elutionsgradienten (bis zu 10 CV) eine hohe Verdünnung erzielt wurde [Shariff *et al.*, 2011], in denen den Reinigungspuffern Detergenzien bzw. organische Lösungsmittel zugesetzt wurden [Schlieben *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2006] oder in denen durch „*in vitro* Evolution“ die Konstruktion spezieller Lipase-Mutanten mit geringer Aggregationsneigung erfolgte [Kamal *et al.*, 2011].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein alternativer Ansatz gewählt, in dem die Affinitätsreinigung mittels Batch-Adsorption und -Elution durchgeführt wurde. Damit sollte eine gleichmäßigere Verteilung des Zielproteins auf dem Chromatographiematerial erreicht und somit eine lokale Übersättigung bei der Elution vermieden werden. Diese Vorgehensweise ist besonders für Affinitätsreinigungen geeignet, wenn eine spezifische Bindung zwischen Zielprotein und Material möglich ist [Scopes, 1994]. Dies ist bei der Interaktion zwischen His₆-*tag* und der funktionellen Gruppe des Trägers (Ni²⁺-IDA) der Fall. Weiterhin bietet diese Reinigungsstrategie den Vorteil, dass eine einfache Skalierbarkeit gegeben ist. So können große Mengen auch nichtfiltrierter Rohextrakte aufgearbeitet werden, ohne dass es, wie im Fall der chromatographischen Reinigung, zu einem Blockieren des Säulenkopfes kommen würde [Scopes, 1994; Janson, 2012].

Durch Anwendung der Batch-Adsorption / -Elution konnte die Lipase LipT1-WT erfolgreich gereinigt werden (Abschnitt 3.1.3). Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE zeigte eine intensive Proteinbande bei ca. 43 kDa (theo. Molekulargewicht LipT1-WT: 44,2 kDa) und nahezu keine zusätzlichen proteinogenen Verunreinigungen. Im Vergleich zur chromatographischen Reinigung konnte mittels Batch-Adsorption / -Elution, bei gleichem Verhältnis von eingesetzter BFM / Trägermaterial ($\sim 1 \text{ g}_{\text{BFM}}/\text{mL}_{\text{Träger}}$), nach drei Elutionsschritten eine Ausbeute von 59 % erreicht werden ($R_f = 15$). Aufgrund der Bildung von Präzipitaten während der Dialyse verringerte sich die Ausbeute für LipT1-WT auf 25 %. Bei der Reinigung der LipT1-Mutanten lagen die Elutionsausbeuten zwischen 50 und 72 % (Tabelle 8-1). Nach Dialyse und Abtrennung der Präzipitate konnten, je nach Mutante, 10 - 51 % der initial zur Reinigung eingesetzten Aktivität in Lösung nachgewiesen werden. Die Proteinkonzentration betrug durchschnittlich 0,3 mg/mL. In diesem Zusammenhang konnte eine deutliche Abhängigkeit der Ausbeute nach Dialyse von der Startproteinkonzentration vor Dialyse festgestellt werden. Je höher die Proteinkonzentration nach Elution, desto mehr Aktivität ging infolge der Aggregation während der Dialyse verloren. Durch eine geeignete Verdünnung der Lipase-Lösung vor Dialyse kann vermutlich konzentrationsabhängigen Aggregationseffekten entgegengewirkt werden, wodurch entsprechende Aktivitätsverluste verringert würden. Die nach der Dialyse in 50 % (v/v) Glycerin, bei -20 °C gelagerten

Enzymlösungen wiesen eine hohe Stabilität auf. Für LipT1-WT waren nach 250 d noch 80 % der Ausgangsaktivität vorhanden.

Eine Reinigung von LipT1-WT mittels His₆-tag ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Stattdessen wurden Konstrukte mit Cellulose-Bindedomäne (CBD) oder Glutathion-S-Transferase-tag (GST) verwendet. Xu *et al.* fusionierten die CBD (20 kDa) aus *Clostridium thermocellum* mit LipT1, adsorbierten das Fusionsprotein an Cellulose und spalteten anschließend den tag mittels 3C-Protease ab [Xu *et al.*, 2013]. Eine Reinigungsausbeute wurde nicht angegeben. Die Reinigung über GST-tag (26 kDa) wurde bisher häufig angewendet [Leow *et al.*, 2007; Cheong *et al.*, 2011; Ruslan *et al.*, 2012; Aris *et al.*, 2014; Wahab *et al.*, 2015]. Das Verfahren umfasst einen Chromatographieschritt über *Glutathione Sepharose* HP, die Abspaltung des tags mit Thrombin, eine Gelfiltration über *Sephadex G-25* und zur Abtrennung von Thrombin und GST-tag eine Dialyse mit nachfolgender Chromatographie über *Glutathione Sepharose* HP, *HiTrap Glutathione Sepharose* 4FF sowie *HiTrap* Benzamidine. Die Reinigungsausbeute lag zwischen 47 und 52 % [Leow *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2012]. Im Vergleich dazu erwies sich die Reinigung über den His₆-tag als vorteilhaft, da mit deutlich weniger Schritten ähnliche Ausbeuten erreicht werden konnten. Zusätzlich konnte durch die Fusion von Lipase und His₆-tag ein Verfahren zur zielgerichteten Immobilisierung realisiert werden (Abschnitt 3.2.5).

Für andere (*Geo*)*Bacillus* - Lipasen ist bereits eine Affinitätsreinigung mittels His-tag beschrieben. Die erhaltenen Ausbeuten überspannen dabei einen weiten Bereich. Soliman *et al.* reinigten eine Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* YN mittels IMAC und Gelfiltration und erhielten eine Ausbeute von 2,1 % [Soliman *et al.*, 2007]. Kaur *et al.* nutzten Ni²⁺-NTA-Chromatographiematerial zur Reinigung einer Lipase aus *Bacillus licheniformis* und erreichten eine Ausbeute von 8,5 % [Kaur *et al.*, 2016]. Lipase JC aus *Geobacillus stearothermophilus* konnte mit einem R_f von 2,5 und einer Ausbeute von 41 % gereinigt werden [Jiang *et al.*, 2010]. Schlieben *et al.* konnten durch Zusatz von Isopropanol und dem Detergenz Lauryldimethylamin-*N*-oxid (LDAO) das Aggregationsverhalten beeinflussen und eine Ausbeute von 60 % erzielen [Schlieben *et al.*, 2004]. Für Lipase ARM aus *Geobacillus* sp. ARM wurde ein R_f von 14,6 und eine Reinigungsausbeute von 63 % erhalten [Ebrahimpour *et al.*, 2011]. Eine vergleichsweise hohe Ausbeute von 76 % konnte für eine Lipase aus *Bacillus* sp. L2 erreicht werden, indem die Elution des Zielproteins über einen sehr flachen Gradienten von 10 CV durchgeführt wurde [Shariff *et al.*, 2011].

Letztendlich konnte Lipase LipT1-WT durch Anwendung der His₆-tag-Affinitätsreinigung in Kombination mit der Batch-Adsorption /-Elution zur Homogenität gereinigt werden. Die entwickelte Reinigungsstrategie konnte zudem auf die Lipasen LipA und LipL1 sowie auf die sieben Mutanten von LipT1-WT übertragen werden. Hinsichtlich spezifischer Aktivität und Ausbeute wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten, so dass die Enzympräparate für die Untersuchungen zur Immobilisierung eingesetzt werden konnten.

4.3 Immobilisierung von Lipasen

4.3.1 Einflussfaktoren auf die Immobilisierung

Das Prinzip der (kovalenten) Immobilisierung beruht auf der Interaktion eines zu koppelnden Enzyms mit einem entsprechenden Trägermaterial. Das Ergebnis dieser Immobilisierung wird dabei grundsätzlich von zahlreichen Faktoren beeinflusst [Cao, 2006; Hanefeld *et al.*, 2009; Sheldon und Pelt, 2013]. Neben den biochemischen Eigenschaften des Enzyms und der stattfindenden Kopplungsreaktion haben besonders die Trägereigenschaften, wie z.B. die Partikelgröße, Porengröße, Hydrophobizität der Oberfläche, Dichte der funktionellen Gruppen und vorhandene *spacer*, einen Einfluss auf die messbare Aktivität auf dem Träger. Des Weiteren spielt die Beladung der Trägeroberfläche mit Enzym eine wichtige Rolle. Insgesamt definiert die Kombination der physikochemischen Eigenschaften von Träger, Enzym und Substratlösung die Mikroumgebung des gebundenen Enzyms, die sich entscheidend auf die katalysierte Reaktion auswirken kann. Dadurch werden die nachweisbare Aktivität auf dem Träger und somit auch die Wiederfindung beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurden je nach Kopplungsmethode und Trägermaterial 2 – 91 % der theoretisch gekoppelten Aktivität auf dem Träger wiedergefunden. Für den nicht nachweisbaren Anteil können grundsätzlich verschiedene Ursachen in Frage kommen, die im Folgenden diskutiert werden.

Zum einen kann das Enzym durch die Immobilisierung inaktiviert werden, wenn z. B. die Kopplungsbedingungen zur Enzymdenaturierung führen oder, wenn für die Aktivität des Enzyms essentielle Gruppen an der Kopplungsreaktion beteiligt sind. Zum anderen können durch die Interaktion mit Trägermaterial während der Adsorption bzw. Kopplung Veränderungen der Proteinkonformation ausgelöst werden, die zu einem Aktivitätsverlust führen [Cao, 2006; Iyer und Ananthanarayan, 2008; Garcia-Galan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016]. Des Weiteren kann durch die Fixierung eine möglicherweise für die Aktivität notwendige Flexibilität der Proteinstruktur eingeschränkt sein. Außerdem könnte durch eine ungünstige Orientierung das aktive Zentrum durch die Trägeroberfläche abgeschirmt werden, so dass die Substratzugänglichkeit erschwert oder vollständig verhindert wird [Chaplin und Bucke, 1990]. In Zusammenhang mit den genannten Effekten kann neben einer Inaktivierung infolge der Immobilisierung auch eine Veränderung der kinetischen Eigenschaften des Enzyms nicht ausgeschlossen werden [Hernandez und Fernandez-Lafuente, 2011]. Zusätzlich können sich bei hoher Beladung Proteinschichten auf dem Träger ausbilden, in denen tieferliegende Enzymmoleküle einer potentiellen Denaturierung ausgesetzt sind und nur bedingt mit Substrat in Kontakt kommen können [de Fuentes *et al.*, 2001]. Weiterhin würde im Fall einer reinen Adsorption des Zielproteins, ohne nachfolgende kovalente Kopplung, ein Auswaschen des Enzyms in nachfolgenden Prozessschritten erfolgen (*leaching*) und sich somit die Aktivität auf dem Träger verringern [Gopinath und Sugunan, 2004; Zhao *et al.*, 2006; Cantone *et al.*, 2013].

Neben den genannten, kopplungsbedingten Ursachen für eine geringe Wiederfindung wird die nachweisbare Aktivität auf dem Träger, besonders in porösen Systemen, durch Verteilungs- und Diffusionseffekte beeinflusst [Chaplin und Bucke, 1990; Hanefeld *et al.*, 2009]. Dabei können, in Abhängigkeit des eingesetzten Trägermaterials, für Reaktionsparameter wie dem pH-Wert, der Ionenstärke oder der Substratkonzentration deutliche Unterschiede in- und außerhalb der Poren des Trägers auftreten [Buchholz *et al.*,

2005; Cao, 2006; Boniello *et al.*, 2010; Sheldon und Pelt, 2013]. Von diesen Parametern nimmt die Substratkonzentration eine besondere Rolle ein. Die Substratverfügbarkeit innerhalb der Poren des Trägers wird zum einen von der Zugänglichkeit des Substrates in die Trägerporen und zum anderen durch Diffusionsvorgänge bestimmt. Die Substratzugänglichkeit ist dabei maßgeblich von der Größe des Substrates und den vorhandenen Porendurchmesser der Partikel abhängig. Hinsichtlich der Diffusion des Substrates kann zwischen einer äußeren Diffusion (durch die Grenzschicht um die Partikel) und einer inneren (Poren-) Diffusion unterschieden werden (Abbildung 4-1) [Chaplin und Bucke, 1990]. Bei der äußeren Diffusion wird das Substrat durch konvektive Strömung zur Grenzschicht des Trägerpartikels transportiert [Chmiel, 2006]. Aufgrund des Konzentrationsunterschieds zwischen der umgebenden Lösung und der Grenzschicht diffundiert das Substrat in Richtung Partikeloberfläche. Die Dicke der Grenzschicht kann durch Erhöhung der Konvektion verringert werden [Engasser und Horvath, 1973]. Der Stofftransport im Inneren des Partikels wird wiederum neben dem Konzentrationsgradienten durch Parameter wie Porengröße, Porengeometrie und Partikelgröße beeinflusst, die sich auf die Diffusionseigenschaften des Substrates auswirken. Wenn aufgrund der verschiedenen Diffusionswiderstände während der enzymatischen Reaktion nicht genügend Substrat in die Poren des Trägers transportiert wird, können Substratlimitierungen auftreten [Cantone *et al.*, 2013; Sheldon und Pelt, 2013]. Demzufolge würden Enzymmoleküle innerhalb der Porenstrukturen nicht gleichmäßig mit Substrat in Kontakt kommen, was sich schließlich auf die messbare Aktivität des Immobilisats auswirkt und zur Verringerung der Wiederfindung führt.

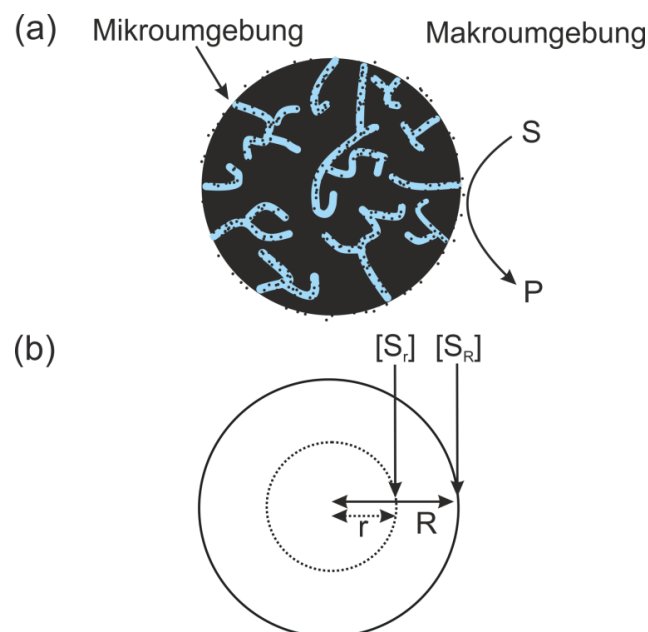


Abbildung 4-1: Schematischer Querschnitt durch einen porösen Trägerpartikel nach Enzymimmobilisierung aus [Chaplin und Bucke, 1990]. (a) Mikro- und Makroumgebung des Partikels. Schwarze Punkte stellen Enzymmoleküle dar. Das Substrat (S) muss durch die äußere Grenzschicht (äußerer Transport) und in die Poren (interner Transport) diffundieren, um vom Enzym in Produkt (P) umgewandelt zu werden. **(b)** Die Substratkonzentration $[S_r]$ auf der Partikeloberfläche (Radius R) verringert sich entlang des Partikelradius r aufgrund von Diffusions- und Verteilungseffekten zu $[S_i]$.

Zur Vermeidung von Aktivitätsverlusten bei der Lipase-Immobilisierung wurden in der vorliegenden Arbeit bei der Auswahl der Kopplungsreaktionen und -bedingungen die o.g. Aspekte berücksichtigt. Die ausgewählten Kopplungsreaktionen sollten unter milden Bedingungen stattfinden und bevorzugt Aminosäureseitenketten der Lipase involvieren, die nicht an der Substratbindung bzw. Katalyse beteiligt sind. Zusätzlich sollten die Kopplungspositionen einen ausreichenden Abstand zum aktiven Zentrum aufweisen, um eine freie Zugänglichkeit des Substrates zum aktiven Zentrum zu gewährleisten. Durch Kontrolle der Orientierung des Enzyms auf dem Träger sollte somit ein potentieller Aktivitätsverlust infolge der Kopplung verhindert werden.

Zur Realisierung dieser zielgerichteten Immobilisierung wurde anhand der Kristallstruktur der Lipase LipT1-WT eine Immobilisierungsebene auf der Proteinoberfläche definiert. Diese Ebene befindet sich in der Proteinstruktur zum einen auf der gegenüberliegenden Seite des aktiven Zentrums und zum anderen außerhalb der flexiblen Region, die für die lipasetypische Grenzflächenaktivierung verantwortlich ist (Abbildung 1-10) [Matsumura *et al.*, 2008; Carrasco-Lopez *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010]. Somit sollte eine Fixierung der Lipase auf dem Träger erfolgen ohne die notwendige Flexibilität für die Öffnung der Deckelstruktur über dem aktiven Zentrum zu beeinträchtigen. Zusätzlich wurde der Ansatz verfolgt, durch geeignete Kopplungsbedingungen eine unspezifische Adsorption des Proteins zu verringern, um mögliche Verluste durch Auswaschen des Enzyms zu vermeiden.

Hinsichtlich der Ausbildung der maximalen katalytischen Aktivität stellen Lipasen aufgrund der o.g. Grenzflächenaktivierung eine besondere Gruppe von Enzymen dar [Verger, 1997; Reis *et al.*, 2009]. Viele Lipasen, wie auch LipT1, weisen eine α -helicale Deckelstruktur auf, die in geschlossener Konformation das aktive Zentrum vom Reaktionsmedium abschirmt [Yang und Lowe, 2000; Secundo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010]. Um eine Öffnung der Deckelstruktur zu bewirken und somit einen ungehinderten Zugang zum aktiven Zentrum zu erreichen, ist die Anwesenheit einer „Substrat-Grenzfläche“ erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Modells substrat *p*NP-Palmitat verwendet, das in Kombination mit dem Detergenz Triton X-100 in wässrigen Systemen gemischte Mizellen ausbildet. Langkettige *p*NP-Ester werden sehr häufig als Lipase-Substrate eingesetzt, da die Hydrolysereaktion einfach spektrophotometrisch verfolgt werden kann und das Reaktionsprodukt *p*-Nitrophenolat aufgrund des hohen Extinktionskoeffizienten bei 405 nm sensitiv nachweisbar ist [Burdette und Quinn, 1986; Martin *et al.*, 1994; Redondo *et al.*, 1995]. Die im Vergleich zum titrimetrischen Assay höhere Sensitivität sollte die Wiederfindung der Lipase-Aktivität in den einzelnen Fraktionen der Kopplungs- und Waschschr itte erleichtern und somit eine genauere Bilanzierung der Aktivität ermöglichen. Der Einsatz von Triton X-100 erhöht die Stabilität der Mizellen und führt zu reproduzierbaren Oberflächen der Mizellen [Acharya und Rao, 2002]. Allerdings ist die Verwendung des o.g. Substrates in Verbindung mit porösen Trägermaterialien auch mit Nachteilen behaftet. Aufgrund der Größe der Substrat-Detergenz-Mizellen können Stofftransportlimitierungen im Inneren der Trägerpartikel nicht ausgeschlossen werden.

In Tabelle 4-2 sind die Durchmesser von Enzym, Trägerporen und Substrat-Detergenz-Mizellen aufgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Trägermaterialien besitzen mittlere Porendurchmesser zwischen 20 und 38 nm (Abschnitt 2.6). Ausgehend von der Kristallstruktur der Lipase LipT1 (PDB-Eintrag 2DSN) beträgt der Durchmesser des globulären Proteins zwischen 5 – 6,5 nm. Für einen uneingeschränkten Zugang eines Proteins in die Poren eines Partikels sollte der Porendurchmesser, in Abhängigkeit von Trägermaterial und Enzym, drei- bis zehnmal größer als der des Enzyms sein [Wang *et al.*,

1989; Cao, 2006]. Demzufolge kann bei den genutzten Trägersystemen davon ausgegangen werden, dass eine Immobilisierung sowohl auf der äußeren Oberfläche als auch im Inneren der Partikel ablief.

Die in der Hydrolyse von *p*NPP eingesetzte Triton X-100-Konzentration lag mit 8 mM oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von ~ 0,24 mM [Sigma-Aldrich, 1999], so dass in Kombination mit *p*NPP (0,5 mM) die Bildung von gemischten Mizellen zu erwarten war. Ein Einfluss auf die CMC von Triton X-100 durch den Einbau von *p*NP-Estern konnte bisher nicht beobachtet werden [Acharya und Rao, 2002]. Die Größe von Triton X-100-Mizellen ist dagegen u.a. von der Konzentration, Temperatur und Ionenstärke abhängig [Yedgar *et al.*, 1974; Paradies, 1980]. Paradies ermittelte im Konzentrationsbereich von 8 – 16 mM bei 20 °C bzw. 30 °C einen hydrodynamischen Radius der Mizellen von 42 bzw. 56 Å, was einem Durchmesser von 8,4 bzw. 11 nm entspricht [Paradies, 1980]. Acharya und Rao konnten bei 20 mM und 25 °C mit 8,5 nm einen vergleichbaren Wert erhalten [Acharya und Rao, 2002]. In Kombination mit *p*NP-Oleat vergrößerte sich der hydrodynamische Radius um 14 %. Die exakte Größe der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten *p*NPP-Triton X-100-Mizellen wurde zwar nicht bestimmt, allerdings können anhand der Literaturdaten folgende Schlüsse gezogen werden. Die Substratmizellen waren im Vergleich zur Lipase größer, sollten aber dennoch in den meisten Fällen in die Poren der Trägerpartikel diffundieren können. Jedoch ist es aufgrund der Größenverhältnisse wahrscheinlich, dass der Substratumsatz hauptsächlich auf der äußeren Oberfläche und in oberflächennahen Poren der Partikel stattfand und Lipase-Moleküle in tiefergelegenen Poren nur bedingt mit Substrat in Kontakt gekommen sind. Stofftransportlimitierungen in porösen Strukturen sind häufig auftretende Probleme bei der Anwendung immobilisierter Enzyme [Barros *et al.*, 1998; Adlercreutz, 2013]. Die apparenten Verluste bei der Aktivitätswiederfindung können in der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf eine potentielle Substratlimitierung zurückgeführt werden. In Kapitel 3.2.5.2 konnte dieser Zusammenhang durch Variation der Enzymbeladung auf dem Träger bestätigt werden. Bei den ermittelten trägerbezogenen Lipase-Aktivitäten handelt es aufgrund der Überlagerung durch Diffusions- und Verteilungseffekte demnach um apparente Aktivitäten. Bei Verwendung kürzerkettiger Substrate in Verbindung mit einer Reduktion der Mizellengröße ist grundsätzlich davon auszugehen, dass aufgrund der verbesserten Diffusionseigenschaften in und um die Trägerpartikel die Wiederfindung erhöht werden kann.

Tabelle 4-2: Vergleich der Durchmesser von Trägerporen, Lipase und Substrat-Mizellen.

Komponente	Durchmesser [nm]	Bemerkung / Referenz
Poren Trägerpartikel	20 – 38	Tabelle 2-9, Abschnitt 2.6
Lipase LipT1	5 – 6,5	Bestimmung über Kristallstruktur, PDB-Eintrag 2DSN [Matsumura <i>et al.</i> , 2008]
Triton X-100-Mizellen	8,4 – 11	zusätzl. Vergrößerung in Anwesenheit von <i>p</i> NP-Estern [Paradies, 1980; Acharya und Rao, 2002]

Die Realisierung der zielgerichteten Immobilisierung erfolgte mit unterschiedlichen Vorgehensweisen, in denen jeweils entsprechende Varianten der Lipase LipT1-WT erzeugt und deren Immobilisierungsverhalten untersucht wurde. Die Ergebnisse und die Anwendbarkeit werden in den folgenden Abschnitten unabhängig voneinander diskutiert.

4.4 Immobilisierung mittels MTG

Ein Ansatz zur zielgerichteten Immobilisierung beinhaltete die enzymatische Kopplung von Lipasen an einen festen Träger unter Einsatz einer mikrobiellen Transglutaminase. Im Vorfeld wurde überprüft, ob Lipase LipT1-WT ohne vorherige Modifikationen als Glutamin-Substrat dienen kann. Zu diesem Zweck wurde der Fluoreszenzfarbstoff MDC als Lysin-Analoga eingesetzt [Pasternack *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 2007; Rachel und Pelletier, 2013]. Obwohl innerhalb der Enzymstruktur 13 Q-Reste vorhanden sind, konnte kein MTG-reaktiver Q-Rest identifiziert werden (Abschnitt 3.2.1.1). Scheinbar befinden sich diese Q-Reste in Bereichen der Proteinstruktur, die für die MTG nicht zugänglich sind oder deren flankierende Aminosäuren haben eine negative Auswirkung auf die Reaktivität der MTG. Im Allgemeinen stehen nur vergleichsweise wenige der in globulären Proteinen vorkommenden Q- und auch K-Reste für eine Modifikation durch die MTG zur Verfügung [Kamiya *et al.*, 2003a; Spolaore *et al.*, 2012]. In der Regel werden für ein Angreifen der MTG besonders flexible Bereiche innerhalb der dreidimensionalen Struktur des Proteins benötigt [Fontana *et al.*, 2008]. Eine Erhöhung der MTG-Zugänglichkeit proteinogener Q-Reste kann beispielsweise durch eine Teilentfaltung des Proteins durch Temperaturerhöhung [Nieuwenhuizen *et al.*, 2003; Fontana *et al.*, 2008] oder durch Einsatz des Detergenz *N*-Lauroylsarcosin erreicht werden [Schmidt *et al.*, 2008]. Um eine mögliche Inaktivierung bei der Teilentfaltung zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit ein alternativer Ansatz verfolgt. Das Zielprotein wurde mit einem reaktiven Q-tag fusioniert, um anschließend eine zielgerichtete Kopplung mittels MTG durchführen zu können. Das tag-Design basierte auf vorhandenen Literaturangaben zur Substratspezifität der MTG. Als Kernsequenz innerhalb des Tags wurde das Tripeptid YQR gewählt. In einem Screening mit immobilisierten Tripeptiden konnte gezeigt werden, dass diese Kombination eine besonders hohe Reaktivität besitzt [Malešević *et al.*, 2015]. Dabei wurden an beiden flankierenden Positionen des Q-Restes Präferenzen für hydrophobe Aminosäuren (L, W, V, Y etc.) beobachtet. Diese Präferenzen können damit erklärt werden, dass diese Aminosäuren mit den hydrophoben Seitenketten im Bereich des aktiven Zentrums interagieren [Kashiwagi *et al.*, 2002]. Ein Grund für die positive Wirkung von Arginin in Position Q+1 könnte darin bestehen, dass dessen Seitenkette in einem weiten pH-Bereich positiv geladen ist und somit elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Aminosäuren der MTG (E249, D255, E300, D304) eingehen kann.

Im Hinblick auf die Immobilisierung wurden zwei Varianten der Lipase LipT1-WT erstellt, bei denen der Q-tag entsprechend N- bzw. C-terminal fusioniert wurde. Nach erfolgreicher Produktion der Q-tag-Varianten konnte die Reaktivität des neu eingefügten Q-Restes durch Modifikation mit MDC nachgewiesen werden (Abschnitt 3.2.1.3). Somit war eine Übertragung der Ergebnisse aus dem Tripeptid-Screening, auf in diesem Fall deutlich größere Proteinstrukturen, möglich.

Ebenso konnte mittels Fluoreszenzmarkierung gezeigt werden, dass die Aminogruppen des Trägermaterials EAH-Sepharose reaktive MTG-Substrate darstellen. Die *spacer*-Länge der Hexylamingruppen entsprach dabei der des natürlichen Substrats Lysin. Grundsätzlich können von der MTG eine Vielzahl natürlicher und nicht-natürlicher Acyl-Akzeptoren als Substrate umgesetzt werden [Gundersen *et al.*, 2013].

Da sowohl für Lipase-Varianten NQ-LipT1 und LipT1-CQ als auch für den Träger EAH-Sepharose der Einsatz als MTG-Substrat möglich war, folgten im nächsten Schritt die Untersuchungen zur Lipase-Kopplung. Dabei wurde zunächst festgestellt, dass sowohl die *Q-tag*-Varianten als auch LipT1-WT ohne Zusatz von MTG an das Trägermaterial adsorbieren. Offensichtlich waren die gewählten Pufferbedingungen nicht ausreichend, um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Enzym und Träger zu vermeiden. Unspezifische Proteinadsorption ohne Transglutaminase-Zugabe wurde ebenfalls für verschiedene andere Trägermaterialien wie z.B. mit Casein beschichtetes Polyacrylharz bzw. Polystyren [Tominaga *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2007], aminogruppenbeschichtete Glasoberflächen [Tanaka *et al.*, 2008; Moriyama *et al.*, 2011] oder octanaminaktivierte Sepharose beobachtet [Sugimura *et al.*, 2007].

Durch mehrfaches Waschen des Trägers mit 500 mM NaCl und 0,5 % (w/v) Triton X-100 konnte LipT1-WT auch in Anwesenheit von MTG wieder nahezu vollständig entfernt werden (Abschnitt 3.2.1.5). Im Gegensatz dazu blieb die Aktivität der *Q-tag*-Varianten nach dem Waschen auf dem Träger erhalten, was für eine zielgerichtete Kopplung durch die MTG spricht. Beide Mutanten zeigten eine ähnliche Kopplungsausbeute von ca. 80 %, allerdings wurde für NQ-LipT1 mit 0,9 U_o/g eine geringere trägergebundene Aktivität als für LipT1-CQ (1,6 U_o/g) erhalten. Da beide Varianten nach Reinigung kaum Unterschiede in der spezifischen Aktivität (154 bzw. 155 U_o/mg) aufwiesen, scheint die Position des *tags* einen Einfluss auf MTG-vermittelte Lipase-Kopplung zu haben. Grundsätzlich können verschiedene Einflüsse auf die Reaktion der MTG mit proteinogenen Substraten bestehen. Die Reaktivität kann nicht nur durch die Aminosäuresequenz sondern auch durch die Mikroumgebung beeinflusst werden [Kamiya *et al.*, 2003a]. Je nach Sequenz und umgebenden Proteinbereichen kann sich die lokale Flexibilität der Peptidkette verändern, was sich wiederum auf die Zugänglichkeit der MTG auswirkt [Mori *et al.*, 2011]. Vermutlich stellt in diesem Zusammenhang der *Q-tag* am N-Terminus der Lipase ein schlechteres Substrat im Vergleich zur C-terminalen Variante dar. Ebenso kann eine mögliche, ungünstige Orientierung nach der Kopplung die Aktivität von NQ-LipT1 negativ beeinflusst haben.

Zur Verringerung der unspezifischen Proteinadsorption wurden die Pufferbedingungen bei der Kopplung angepasst (Puffer MWP). Durch Erhöhung der Ionenstärke (500 mM NaCl) und Einsatz eines nicht-ionischen Detergenz (0,5 % (w/v) Triton X-100) konnte die Lipase-Adsorption in Abwesenheit von MTG nahezu vollständig vermieden werden. Durch diesen Schritt hat sich zwar die Kopplungsausbeute von 80 auf 67 % verringert, die trägergebundene Aktivität konnte jedoch von 1,6 auf 2,3 U_o/g gesteigert werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass unter den angepassten Pufferbedingungen die zielgerichtete Kopplung nicht von einer unspezifischen Adsorption überlagert wurde und sich demzufolge eine niedrigere Kopplungsausbeute einstellte. Durch Verringerung der unspezifischen Adsorption wurden weniger freie Bindestellen auf dem Träger von nicht kovalent gebundener Lipase-Moleküle belegt. Somit wurden infolge der Waschschriffe weniger Lipase-Moleküle ausgetragen, wodurch eine höhere Aktivität auf dem Träger erreicht werden konnte.

Über einen funktionellen Q-tag wurden bisher die Proteine alkalische Phosphatase (AP), *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) und Glutathion-S-Transferase (GST) immobilisiert (Tabelle 4-3). Kamiya *et al.* nutzen rekombinante AP aus *E. coli* mit einem N- bzw. C-terminalen Q-tag zur Kopplung an eine caseinbeschichtete Polystyrenoberfläche. Die Variante mit Immobilisierungstag am C-Terminus erreichte eine rund 1,4-fache höhere Aktivität [Kamiya *et al.*, 2007]. Diese AP-Variante wurde ebenfalls an magnetische Partikel mit Silica- / Aminogruppenbeschichtung gekoppelt [Moriyama *et al.*, 2011]. Tanaka *et al.* konnten über einen LLQG-Tag sowohl EGFP als auch GST immobilisieren. Als Trägermaterialien wurden caseinbeschichtetes Polystyren bzw. aminofunktionalisierte Glasoberflächen verwendet [Tanaka *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2008]. In den genannten Beispielen sind keine Angaben zur Kopplungsausbeute oder Wiederfindung veröffentlicht. Unter Verwendung einer humanen Transglutaminase (TGase 2) wurde bei der Immobilisierung von GST mit tag „T26“ (HQS YVDPWMLDH) an octanaminmodifizierte Sepharose eine Kopplungsausbeute von 62 % erhalten [Sugimura *et al.*, 2007]. Bei Einsatz einer AP, fusioniert mit einem C-terminalen K-tag (MKHKGS), in Kombination mit MTG betrug die Kopplungsausbeute an ein Casein-Polyacrylharz 80 % [Tominaga *et al.*, 2004]. Unter Verwendung von caseinbeschichteter Agarose wurden je nach tag-Position und linker-Sequenz Ausbeuten zwischen 12 und 71 % erreicht [Tominaga *et al.*, 2005]. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Kopplungsausbeuten von 67 – 80 % lagen im Bereich der beschriebenen Verfahren.

Tabelle 4-3: Zielgerichtete Immobilisierung von Proteinen mittels MTG bzw. humaner Transglutaminase (TGase2).

Zielprotein	tag-Sequenz	Trägermaterial	Kopplungsausbeute [%]	Referenz
AP	MLAQGS	Polystyrenoberfläche (caseinbeschichtet)	-	[Kamiya <i>et al.</i> , 2007]
AP	MLAQGS	Amino-PEG-modifizierte Glaspartikel	-	[Moriyama <i>et al.</i> , 2011]
GST	LLQG	Polystyrenoberfläche (caseinbeschichtet)	-	[Tanaka <i>et al.</i> , 2007]
EGFP	LLQG	aminomodifizierte Glasoberfläche	-	[Tanaka <i>et al.</i> , 2008]
AO	MKHKGS	Polyacrylharz (caseinbeschichtet)	80	[Tominaga <i>et al.</i> , 2004]
AP	MKHKGS	Agarose (caseinbeschichtet)	12 -71	[Tominaga <i>et al.</i> , 2005]
GST	HQS YVD-PWMLDH	octylaminmodifizierte Sepharose	80*	[Sugimura <i>et al.</i> , 2007]
LipT1	MLYQRS	hexylaminmodifizierte Sepharose	67-80	vorliegende Arbeit

* Enzymatische Kopplung unter Verwendung von TGase2

Eine transglutaminasevermittelte Immobilisierung mit vollständiger Kopplung des eingesetzten Enzyms ist bisher nicht bekannt. Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs

wurden in den Abschnitten 3.2.1.8 bis 3.2.1.10 verschiedene Aspekte der Kopplung näher beleuchtet. Dabei wurden eine mögliche Inaktivierung der MTG und auch ein Überschreiten der Trägerkapazität als Ursache für die unvollständige Kopplung ausgeschlossen. Ebenso konnte keine Quervernetzung des Zielproteins detektiert werden. In verschiedenen Arbeiten zur zielgerichteten Kopplung von Proteinen wurde eine Nebenreaktion der Transglutaminase vermutet, in der Wasser als Glutamin-Akzeptor-Substrat diente und so das reaktive Glutamin zu Glutamat umgewandelt wurde [Kamiya *et al.*, 2003a; Tanaka *et al.*, 2005; Sugimura *et al.*, 2007]. Dieser Effekt soll besonders dann auftreten, wenn die Aminkomponente im Unterschuss vorliegt. Zum Nachweis einer möglichen Desaminierungsreaktion bei der Lipase-Immobilisierung wurden verschiedene Kopplungsansätze mittels ESI-MS untersucht. Dabei konnten in den Reaktionsproben das Zielpeptid mit der Modifikation Q → E eindeutig identifiziert werden (Abschnitt 3.2.1.10). Eine Möglichkeit zur Verringerung der unerwünschten Nebenreaktion könnte die Verwendung eines Überschusses der Aminkomponente darstellen. Dies ist im Fall von löslichen Substraten relativ einfach realisierbar [Kamiya *et al.*, 2003a; Tanaka *et al.*, 2004; Tominaga *et al.*, 2007], stellt sich jedoch bei Verwendung von unlöslichen und porösen Trägermaterialien als problematisch dar, da Diffusions- und Verteilungseffekte die effektive Substratkonzentration beeinflussen können. Hinsichtlich der Verringerung der Nebenreaktion und Erhöhung der Kopplungsausbeute besteht demzufolge bei MTG-basierten Kopplungsverfahren noch Optimierungsbedarf.

Die Wiederfindung der theoretisch gekoppelten Aktivität auf dem Träger lag für LipT1-CQ je nach Kopplungspuffer und gewählter Trägerbeladung zwischen 14 und 28 %. Ein Verlust an Lipase-Aktivität aufgrund der Kopplungsbedingungen (Temperatur, Puffer, pH-Wert) konnte ausgeschlossen werden. Die durchgeführten Kontrollen in Anwesenheit von MTG ohne Einsatz von Trägermaterial zeigten, dass die genutzten Lipase-Varianten im betrachteten Zeitraum stabil waren (Abschnitt 3.2.1.5). Ebenso scheint ein Aktivitätsverlust infolge einer unspezifischen Adsorption unwahrscheinlich. In Abschnitt 3.2.1.6 konnte unter Verwendung von Puffer MWP nachgewiesen werden, dass mit den gewählten Pufferbedingungen nahezu keine Lipase-Adsorption an das Trägermaterial stattfand. Eine vollständige Vermeidung der Lipase-Adsorption ohne anschließende Kopplung war allerdings nicht möglich. Somit waren geringe Verluste in den durchgeführten Waschschritten nicht zu vermeiden, was sich zum Beispiel bei der Untersuchung der Wiederverwendbarkeit des Immobilisats in Abschnitt 3.2.1.11 zeigte. Eine direkte Quantifizierung der ausgewaschenen Lipase in den einzelnen Waschschritten war in der Regel nicht möglich, da die Lipase-Konzentration in den Waschlösungen für einen Nachweis zu gering war. Letztendlich stellen diese durch Auswaschen verursachten Aktivitätsverluste (max. 5 %) keine Erklärung für den hohen Anteil der nicht wiedergefundenen Aktivität dar. Als Hauptursache für die erhaltenen Wiederfindungswerte wurden Stofftransportlimitierungen innerhalb der Poren des Trägers während der Hydrolysereaktion angesehen (Abschnitt 4.3.1). Da der mittlere Porendurchmesser des Trägermaterials (Sepharose 4B) bei 30 nm liegt [Sigma-Aldrich, 2006], kann die Immobilisierung der Lipase-Varianten (\varnothing : 5 - 6,5 nm) sowohl auf der äußeren Trägeroberfläche als auch innerhalb der Poren stattfinden [Cao, 2006]]. Aufgrund der Größe der Substrat-Triton X-100-Mizellen ($\varnothing_{\min} \sim 8$ nm) können Diffusionslimitierungen innerhalb der Poren des Trägers nicht ausgeschlossen werden. Eine inhomogene Verteilung des Substrats in den Trägerpartikeln würde sich dementsprechend negativ auf die Wiederfindung auswirken.

Zur Untersuchung der Stabilität der immobilisierten Lipase LipT1-CQ wurde das Immobilisat wiederholt zur Hydrolyse des Substrates *p*NPP eingesetzt. Nach 12 Reaktionszyklen lag die Restaktivität bei 76 % (Abbildung 3-14). Anhand des Verlaufs der Restaktivität konnte geschlossen werden, dass der initiale Aktivitätsverlust vermutlich auf ein Auswaschen noch verbliebener, nicht kovalent gebundener Lipase-Moleküle zurückzuführen ist. Nach 5 - 6 Durchgängen blieb die Restaktivität nahezu konstant.

Bei der Immobilisierung von EGFP mittels MTG wurde nach fünf Waschzyklen eine Restfluoreszenzintensität von ca. 90 % erhalten [Tanaka *et al.*, 2007]. Moriyama *et al.* verwendeten zur Immobilisierung von *Q-tag*-AP magnetische Partikel, um das Immobilisat einfach von der Reaktionslösung abtrennen zu können. Nach zehn Durchgängen betrug die Restaktivität 93 %. Der Aktivitätsverlust wurde mit einer Desorption des Enzyms vom Träger erklärt [Moriyama *et al.*, 2011]. Tominaga *et al.* konnten eine *K-tag*-AP auf Casein-Polyacrylharz immobilisieren und stellten bei der Spaltung von *p*-Nitrophenolphosphat nach zehn Zyklen kaum Aktivitätsverlust fest [Tominaga *et al.*, 2004]. In einem Festbettreaktor konnte mit *K-tag*-AP auf caseinbeschichteter Agarose innerhalb eines Zeitraumes von 20 d ein stabiler Umsatz erreicht werden [Tominaga *et al.*, 2005]. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltene Restaktivität bei mehrmaligem Einsatz liegt zwar unter den literaturbeschriebenen Werten, könnte aber vermutlich durch Anpassung der Waschbedingungen gesteigert werden.

Grundsätzlich stellt der beschriebene Ansatz eine sehr spezifische Methode zur Immobilisierung von Enzymen dar. Durch die Fusion des *Q-tags* mit Lipase LipT1-WT konnte das Zielprotein in ein reaktives MTG-Substrat umgewandelt werden. Weiterhin konnten die erzeugten *Q-tag*-Lipasen unter Einsatz von MTG zielgerichtet an einen funktionalisierten Träger gekoppelt werden. Aufgrund der hohen Spezifität der Kopplungsreaktion war ebenfalls eine Immobilisierung direkt aus *E. coli*- Rohextrakt ohne vorherige Reinigung der Lipasen realisierbar. Durch die Kopplung von LipT1-CQ an EAH-Sepharose konnte ein stabiles Immobilisat erzeugt werden, dass eine einfache Abtrennung des Biokatalysators aus dem Reaktionsansatz und einen wiederholten Einsatz in der Reaktion ermöglicht.

4.5 Immobilisierung über Thiolgruppen

Eine weitere Methode zur gerichteten Immobilisierung der Lipase LipT1 bestand im gezielten Austausch von Aminosäuren zur Funktionalisierung der Proteinstruktur. Durch das Einbringen von Aminosäuren mit speziellen, reaktiven Seitenketten sollte die Interaktion des Proteins mit dem Trägermaterial beeinflusst und somit die Orientierung des Enzyms auf dem Träger gesteuert werden. Zu diesem Zweck wurden Ser→Cys-Substitutionen an verschiedenen Positionen innerhalb der Lipase-Sequenz vorgenommen. Zur Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen wurden die nativen Cysteine der Lipase (C64 und C295) durch Serinreste ersetzt. Bei den Untersuchungen kamen insgesamt drei Mutanten mit je einem Cysteinrest auf der Proteinoberfläche zum Einsatz (S2C; S259C; S333C). Damit sollte überprüft werden, inwiefern die Position des jeweiligen Cysteins das Kopplungsverhalten beeinflusst. Zusätzlich wurde eine Variante mit der Kombination der drei Positionen generiert (SXC), um den Einfluss einer möglichen Mehrfachkopplung auf die Stabilisierung des Enzyms zu untersuchen [Mansfeld *et al.*, 1999; Mateo *et al.*, 2007b; Cowan und Fernandez-Lafuente, 2011]. Entscheidend bei diesem Ansatz ist, dass über die Kopplung „labile“

Bereiche des Enzyms stabilisiert werden ohne die für die Katalyse notwendige Flexibilität einzuschränken.

Zur Untersuchung des Kopplungsverhaltens der Mutanten wurden als Modellträger MAL-aktivierte Glasobjektträger eingesetzt. Die im Vergleich zu Sepharose-Partikeln geringere Porosität sollte die Zugänglichkeit des Substrates zum immobilisierten Enzym verbessern und so eine Substratlimitierung während der Reaktion vermeiden.

Die Cys-Lipase-Varianten konnten analog zu LipT1-WT produziert und gereinigt werden. Je nach Anzahl und Position der eingefügten Cys-Reste zeigte sich eine unterschiedliche Tendenz zur Ausbildung von Multimeren. Bei der Dreifachmutante SXC konnten mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE erwartungsgemäß die stärkste Multimerbildung beobachtet werden. Die Entstehung von Multimeren aufgrund der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen oberflächennahen Cysteinresten ist bereits für verschiedene Proteine beschrieben [Jones und Thornton, 1995; Blank *et al.*, 2006; Trivedi *et al.*, 2009]. Da dieser Prozess reversibel ist, können entstandene Di- bzw. Multimere durch Zugabe eines Reduktionsmittels wieder aufgelöst werden [Epstein und Anfinsen, 1962; Ovsejevi *et al.*, 2013]. In der vorliegenden Arbeit konnte dies unter Verwendung der Reduktionsmittel β -ME bzw. DTT realisiert werden.

Bei Vergleich der spezifischen Aktivität gegenüber dem Substrat *p*NPP zeigten sich Unterschiede zwischen den Cys-Varianten und LipT1-WT (Abschnitt 3.2.2.2). Durch die eingebrachten Mutationen verringerte sich die spezifische Aktivität auf Werte zwischen 63 und 76 %. Diese Reduktion könnte sowohl durch die Ser \rightarrow Cys-Substitutionen als auch durch das Ersetzen der nativen Cysteine (Cys \rightarrow Ser) verursacht worden sein. Da die Einzelmutanten C64S und C295S sowie die cysteinfreie Lipase-Variante (C64S, C295S) nicht zur Verfügung standen, konnten der Einfluss der einzelnen Cys \rightarrow Ser-Austausche auf die Aktivität nicht untersucht werden. Eine Aktivitätsverringerng aufgrund dieser Substitutionen ist nicht auszuschließen. Bei der strukturell verwandten Lipase BTL2 aus *Bacillus thermocatenuatus* wurden nach Cys-Substitutionen an verschiedenen Positionen ebenfalls niedrigere spezifische Aktivitäten erhalten, die im Bereich zwischen 66 und 94 % lagen [Godoy *et al.*, 2011b].

Durch Inkubation der LipT1-Varianten mit DTT konnte je nach Mutationsposition eine Aktivitätssteigerung zwischen 9 und 15 % erreicht werden. Dies kann als ein Indiz dafür angesehen werden, dass intermolekulare Disulfidbrücken die Aktivität der Lipase negativ beeinflussen. Daher wurde im Vorfeld der Kopplung eine Behandlung der Lipasen mit DTT zur Reduktion der Thiolgruppen durchgeführt.

Neben der Kopplung an PEG/MAL-Objektträger wurde auch die Adsorption der Lipase-Varianten an das Trägermaterial untersucht. Zu diesem Zweck wurden die reaktiven MAL-Gruppen zuvor mit β -ME geblockt. Dabei zeigte sich, dass durch die PEG-Beschichtung, die nach Angaben des Herstellers eine Dicke von 2 - 3 nm aufweist [Micro-Surfaces, 2013], eine unspezifische Lipase-Adsorption nahezu vollständig unterbunden wird (Abschnitt 3.2.2.3). Eine nennenswerte, rein durch Adsorption verursachte Aktivität (ca. 4 mU_C) war lediglich für Variante SXC messbar. Die geringe Adsorptionsneigung von Proteinen an PEGylierte Oberflächen kann auf einen sterischen Abstoßungseffekt zurückgeführt werden, durch den Proteine daran hindert werden mit der eigentlichen Oberfläche in Kontakt zu treten [Jeon *et al.*, 1991; Harder *et al.*, 1998]. Dieser Effekt wurde bereits bei der spezifischen Kopplung verschiedener Proteine wie z.B. *green fluorescent protein* (GFP) und Phenolsulfotransferase genutzt [Cha *et al.*, 2004; Holtz *et al.*, 2007].

Eine Bestimmung der Kopplungsausbeute bei der Immobilisierung der LipT1-Varianten war nur im Fall von SXC (s.u.) möglich. Da auf dem Objektträger, im Vergleich zu porösen Materialien, nur eine relativ kleine Oberfläche ($19,4 \text{ cm}^2/\text{OT}$) zur Verfügung steht, ist die theoretisch koppelbare Aktivität entsprechend gering. So konnten selbst bei niedrigen Start-Lipase-Aktivitäten ($0,1 \text{ U}_C/\text{mL}$) während der Kopplung kaum Aktivitätsabnahmen im Überstand detektiert werden. Eine weitere Verringerung der Startaktivität im Ansatz war nicht möglich, da sonst die Messbereichsgrenze unterschritten worden wäre.

Anhand der auf dem Objektträger nachweisbaren Aktivität wurde deutlich, dass eine zielgerichtete Kopplung der Cys-Varianten stattfand. Für die Aktivitäten der Varianten konnten, verglichen mit LipT1-WT, 5- bis 75-fach höhere Werte erhalten werden. Im Vergleich der Einzelmutanten untereinander zeigte sich ein deutlicher Einfluss der jeweiligen Kopplungsposition. Grundsätzlich wird die Reaktivität einer Aminosäureseitenkette im Protein stark von der jeweiligen Mikroumgebung bestimmt [Wong, 1993]. So können Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte sowie hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Seitenkette beeinflussen. Zusätzlich können Nachbargruppen durch sterische Behinderungen die Zugänglichkeit und somit die Reaktivität beeinträchtigen. Im Fall von Variante S333C scheint die Mikroumgebung um den Cysteinrest die Kopplungsreaktion zu begünstigen, da hier die höchste Aktivität auf dem Träger gemessen werden konnte. Die Positionen S2C und S259C wiesen offensichtlich geringe Reaktivitäten auf, was zu niedrigeren Aktivitäten führte. Weiterhin kann eine Oxidation der Thiolgruppen z.B. zu Sulfen-, Sulfin- oder Sulfonsäure nicht vollständig ausgeschlossen werden, wodurch eine Kopplung verhindert würde [Reddie und Carroll, 2008; Spickett und Pitt, 2012].

Von allen eingesetzten Varianten zeigte die Dreifachmutante SXC das beste Kopplungsverhalten. Für diese Variante konnten 28 % der initial eingesetzten Aktivität aus dem Überstand an den Träger immobilisiert werden (84 mU_C). Von dieser gekoppelten Aktivität konnten 63 % (53 mU_C) auf dem Träger wiedergefunden werden. Davon wurden wiederum ca. 8 % (4 mU_C) durch rein adsorptive Vorgänge verursacht. Mögliche Ursachen für die scheinbaren Verluste (Bilanzlücke von 29 % bzw. 24 mU_C) wurden bereits in Abschnitt 4.3.1 diskutiert. Ein Aktivitätsverlust der Lipase durch die Inkubation mit Kopplungspuffer war dabei zu vernachlässigen. In einer Kontrolle ohne Träger wurde nach 2 h eine Restaktivität von 97 % erhalten. Wie bereits erwähnt, konnte trotz PEG-Beschichtung eine unspezifische Adsorption nicht vollständig verhindert werden. Ohne kovalente Kopplung zwischen Lipase und Träger ist in allen sich anschließenden Schritten ein Auswaschen des Proteins möglich. Diese potentiellen Verluste in den Waschfraktionen sind allerdings konzentrationsbedingt nicht nachweisbar und konnten für eine Bilanzierung nicht herangezogen werden. Aufgrund der geringeren Porosität der Oberfläche konnte, im Vergleich zu Sepharose-Partikeln, ein deutlich höherer Anteil der eingesetzten Aktivität auf dem Träger wiedergefunden werden. Trotzdem ist ein Einfluss durch Diffusionslimitierung (hier: äußere Diffusion) nicht vollständig auszuschließen. In diesem Fall würde eine Verbesserung der Durchmischung im Ansatz den Stofftransport durch die Grenzschicht zwischen Reaktionslösung und Trägerbeschichtung erhöhen und somit die Reaktionsgeschwindigkeit steigern.

Eine Immobilisierung der Lipase LipT1 oder anderer *Bacillus*-Lipasen auf maleinimidfunktionalisierten Objektträgern ist bisher nicht bekannt. Blank *et al.* untersuchten die Immobilisierung der Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) über native und artifiziell eingebrachte Cys-Reste [Blank *et al.*, 2006]. Zur zielgerichteten Kopplung wurden aminofunktionalisierte Objektträger eingesetzt, die mit einem *N*-Hydroxy-Succinimid-PEG-

MAL-Linker aktiviert wurden. Der Nachweis der Bindung erfolgte über einen anti-FLAG-Antikörper ohne Quantifizierung der Aktivität. Die Lipase-Kopplung über Cys-Reste ist für poröse Materialien mit verschiedenen Funktionalitäten beschrieben. Salehi *et al.* setzten 3-Mercaptopropyl-Trimethoxysilan (MPTS) zur Beschichtung magnetischer Nanopartikel ein, um die Lipasen CRL7 aus *Candida rugosa* und TLL aus *Thermomyces lanuginosus* unter Ausbildung von Disulfidbrücken zu immobilisieren [Salehi *et al.*, 2016]. Die erhaltenen Immobilisate konnten erfolgreich zur Umesterung von Triacylglyceriden aus Sojabohnenöl mit EtOH eingesetzt werden. Die Restaktivität nach acht Zyklen betrug 70 %. Zhang *et al.* nutzen ebenfalls das Reagenz MPTS, um Graphenoxid zu funktionalisieren und anschließend eine Lipase aus *Penicillium camemberti* zu koppeln [Zhang *et al.*, 2014]. Dadurch erhöhten sich die Thermostabilität des Enzyms bei 40 °C und 50 °C sowie die Lagerstabilität bei 4 °C. Bei der Hydrolyse von *p*NPP wurde nach zehn Reaktionszyklen eine Restaktivität von ca. 70 % erhalten. Eine Lipase aus *Rhizomucor miehei* wurde auf die oxirangruppenhaltigen Träger Eupergit C und EP-Sepabeads immobilisiert, die zuvor mit Natriumsulfit behandelt wurden [Grazú *et al.*, 2005]. Dabei sollte die initiale Kopplung über die entstanden Thiolgruppen des Trägers ablaufen und eine anschließende Stabilisierung des Enzyms durch Reaktion zwischen proteinogenen Aminogruppen und den Oxirangruppen des Trägers erreicht werden. Mit diesem Ansatz konnte eine Restaktivität von 50 % nach 85-stündiger Inkubation bei 50 °C erzielt werden, wohingegen das freie Enzym unter gleichen Bedingungen vollständig inaktiviert wurde. Eine ähnliche Vorgehensweise wählten Godoy *et al.*, die verschiedene Varianten der Lipase BTL2 aus *Bacillus thermocatenuatus* mit zusätzlichen Cys-Resten auf der Proteinoberfläche generierten [Godoy *et al.*, 2011b]. Zur Untersuchung des Immobilisierungsverhaltens wurde Glyoxyl-Disulfid-Agarose verwendet, so dass eine Kopplung sowohl über Cys-Reste als auch über Aminogruppen erfolgen konnte. Die Kopplungsausbeuten betragen je nach Variante 70 – 100 %. Die Wiederfindung lag zwischen 70 und 95 % bei der Verwendung des kurzkettigen Fettsäureesters *p*-Nitrophenylbutyrat (*p*NPB).

Grundsätzlich soll eine Mehrpunktfixierung zur Erhöhung der Stabilität des immobilisierten Enzyms führen [Fernandez-Lafuente *et al.*, 1995b; Fernandez-Lorente *et al.*, 2008b; Bolivar *et al.*, 2009; Bernal *et al.*, 2013]. Dabei sollen zum einen Verluste durch *leaching* vermieden werden. Zum anderen soll eine Stabilisierung der Enzymstruktur gegenüber Denaturierung erreicht werden, um eine Inaktivierung z.B. durch thermische, chemische oder pH-Einflüsse zu unterbinden. Ausgehend von der erhaltenen Trägeraktivität der Variante LipT1-SXC konnten keine Rückschlüsse gezogen werden, ob eine Mehrpunktfixierung der Lipase an verschiedenen Cys-Positionen stattfand, oder ob die Kopplung nur über jeweils einen Cys-Rest ablief. Die Dichte der funktionellen MAL-Gruppen kann laut Hersteller bis zu 10^{14} cm^{-2} ($= 1 \text{ nm}^{-2}$) betragen [Micro-Surfaces, 2013]. Basierend auf der veröffentlichten Kristallstruktur von LipT1 (PDB-Eintrag: 2DSN, [Matsumura *et al.*, 2008]) wurde für das durch die Cys-Reste aufgespannte Dreieck eine Fläche von $1,42 \text{ nm}^2$ ermittelt (Kantenlängen: $a=2,5 \text{ nm}$; $b=1,2 \text{ nm}$; $c=3,1 \text{ nm}$). Demzufolge sind theoretisch Zweifachkopplungen und bei entsprechend günstiger Anordnung der MAL-Gruppen unter Umständen auch Dreifachkopplungen möglich. Zur Überprüfung der Ausbildung einer Mehrpunktfixierung wurde daher die Stabilität der immobilisierten Lipase-Varianten untersucht (Abschnitt 3.2.2.4). Bei mehrfachem Einsatz der immobilisierten LipT1-Lipase-Varianten in der Hydrolyse von *p*NPP zeigte Mutante SXC mit einer Restaktivität von 87 % die höchste Stabilität. Dies stellt einen Hinweis auf eine Mehrpunktfixierung dar, da alle Einzelmutanten

geringere Restaktivitäten aufwiesen. Unter diesen Einzelmutanten konnte für Variante S333C die höchste Restaktivität (82 %) erhalten werden. Der Aktivitätsverlust der Lipasen könnte durch Auswaschen nicht kovalent gebundener Lipase-Moleküle oder auch durch Inaktivierung zu Stande gekommen sein.

Um die Stabilisierung durch eine mögliche Mehrpunktfixierung genauer zu beleuchten, wurde zusätzlich die Thermostabilität der immobilisierten Lipasen S333C und SXC bei 60 °C untersucht (Abschnitt 3.2.2.5). Hier trat allerdings ein unerwartet hoher Aktivitätsverlust auf. Die Restaktivität lag nach 30 min bei 32 bzw. 19 %. Leow *et al.* konnten für lösliche LipT1 bei 60 °C eine Restaktivität von 50 % nach 14 h ermitteln [Leow *et al.*, 2007]. Aus diesem Grund wurde der Versuch mit den löslichen Varianten S333C und SXC wiederholt. In diesem Fall zeigte S333C mit 89 % eine deutliche höhere Restaktivität nach 30 min, wohingegen Mutante SXC erneut schneller inaktiviert wurde (Restaktivität 33 %). Für den beobachteten Aktivitätsverlust der immobilisierten Lipasen können zum einen eine Enzymablösung vom Träger und zum anderen eine Inaktivierung in Frage kommen. Die gebildete Thioetherbindung zwischen MAL-Gruppe und Cys-Rest ist vergleichsweise stabil und kann unter physiologischen Bedingungen nicht gespalten werden [Wong, 1993]. Daher ist es wahrscheinlicher, dass die erhöhte Temperatur zur Ablösung noch verbliebener, rein adsorptiv gebundener Lipase-Moleküle führte. Es ist bekannt, dass Proteine hitzeinduziert von Oberflächen desorbiert werden können [Kiesel *et al.*, 2014]. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Temperatur Veränderungen in der Beschichtung des Trägers hervorgerufen hat, die zu einem Ablösen eines Teils der PEG/MAL-Lipase-Schicht führten. Zur chemischen Beschaffenheit, Homogenität und Stabilität der Beschichtung der PEG/MAL-Objektträger waren keine Informationen verfügbar. Veränderung der Beschichtungseigenschaften könnten ebenfalls dazu geführt, dass zusätzliche Wechselwirkungen zwischen gekoppelter Lipase und der darunter liegenden Glasoberfläche auftraten. Eine adsorptionsbedingte Entfaltung ist bereits für verschiedene Lipasen auf Silica-Partikeln beobachtet wurden [Cruz *et al.*, 2010].

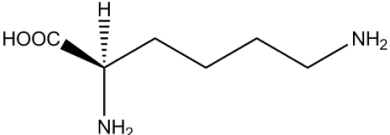
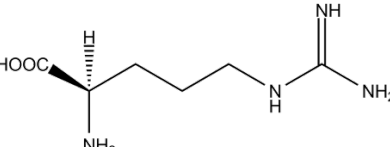
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die verwendeten PEG/MAL-OT nur bedingt für Untersuchungen zur Thermostabilität geeignet waren. Trotz der genannten Limitierungen konnte das Trägersystem jedoch erfolgreich als Modelloberfläche zur Untersuchung der Kopplungsposition eingesetzt werden. Es konnte eine zielgerichtete Immobilisierung der Lipase-Varianten realisiert werden, wodurch eine Identifizierung geeigneter Cys-Mutanten möglich wurde. Die Kopplung zwischen Enzym und Träger war dabei ausreichend stabil, so dass die immobilisierten Lipasen wiederholt in einer Hydrolysereaktion eingesetzt werden konnten. Für weiterführende Untersuchungen zur Mehrpunktfixierung und Thermostabilität ist der Einsatz alternativer Trägermaterialien erforderlich.

4.6 Immobilisierung über Aminogruppen

Die zielgerichtete Lipase-Immobilisierung über proteinogene Aminogruppen sollte über eine definierte, lysinreiche Ebene auf der Proteinoberfläche ablaufen. Die gewählte Ebene umfasste vier Lysinreste sowie die Aminogruppe des N-Terminus. Zur Kontrolle der Orientierung auf dem Träger wurde eine Mutante generiert, bei der Lys-Reste außerhalb dieser Ebene durch Arg-Reste ersetzt wurden (LipT1-KXR).

Die Immobilisierung der Varianten LipT1-KXR und LipT1-WT wurde unter Verwendung verschiedener Kopplungsreaktionen, Trägermaterialien und Bedingungen untersucht (Abschnitt 3.2.3.2). Allerdings stellte sich heraus, dass der Einsatz der Mutante KXR in allen Ansätzen zu geringeren Aktivitäten auf dem Träger und somit zu einer niedrigeren Wiederfindung führte. Beim Vergleich der beiden freien Lipasen hinsichtlich ihrer Stabilität in den verwendeten Kopplungspuffern zeigte Variante KXR jeweils einen deutlich höheren Aktivitätsverlust bis hin zur vollständigen Inaktivierung. Obwohl die durchgeführten Mutationen nahezu keinen Einfluss auf die spezifische Aktivität des Enzyms hatten, scheinen sich die Lys → Arg-Austausche negativ auf die Stabilität des Enzyms ausgewirkt zu haben. Grundsätzlich weisen Lys und Arg sehr ähnliche Eigenschaften auf (Tabelle 4-4). Beide gehören zu den positiv geladenen, polaren Aminosäuren und können an der Ausbildung von Salzbrücken im Protein beteiligt sein [Betts und Russell, 2003]. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wird zur konservativen Substitution von Lys in der Regel Arg verwendet [Summers *et al.*, 1989; Betts und Russell, 2003; Ryan und Ó'Fágáin, 2007]. Trotz der Gemeinsamkeiten scheinen die strukturellen Unterschiede der Seitenketten die Stabilität der Lipase LipT1-KXR zu beeinflussen. Da die Seitenkette im Arg-Molekül aufgrund ihrer Größe mehr Raum einnimmt, können sterische Effekte auftreten, die die Mikroumgebung in der Nähe der Mutationsposition verändern. Möglich sind diesem Zusammenhang auch Veränderungen bei der Ausbildung von Salzbrücken zu umgebenden Aminosäureresten [Meuzelaar *et al.*, 2016]. Ebenso kann die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu benachbarten Seitenketten beeinflusst werden [Betts und Russell, 2003].

Tabelle 4-4: Eigenschaften der Aminosäuren Lysin und Arginin im Vergleich [Römpp, 2017].

Aminosäure	Charakter	Polarität	Ladung	pK _s Seitenkette	Molare Masse	Struktur
L-Lysin	basisch	polar	+	10,3	146,2	
L-Arginin	basisch	polar	+	12,5	174,2	

Der Austausch verschiedener Lys-Reste einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) führte zu einer verringerten Thermo- und Lösungsmittelstabilität [Ryan und Ó'Fágáin, 2007]. Im Gegensatz dazu konnten Mrabet *et al.* durch Lys→Arg-Substitutionen die Thermostabilität einer humanen Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase sowie einer D-Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* erhöhen [Mrabet *et al.*, 1992]. Durch das Ersetzen aller Lysine durch Argininreste in der Struktur des *green fluorescent protein* (GFP) wurde eine Variante erhalten, die sich durch eine höhere Stabilität gegenüber Denaturierungsmitteln wie Harnstoff, basischen pH-Werten und ionischen Detergenzien auszeichnete [Sokalingam *et al.*, 2012]. Die Thermostabilität wurde nicht beeinflusst. Es zeigt sich demnach, dass der

Einfluss von Lys→Arg-Austauschen stark vom jeweiligen Protein und der entsprechenden Mutationsposition im Protein abhängig ist.

Letztendlich kann geschlussfolgert werden, dass eine Immobilisierung der Lipase LipT1-KXR über Aminogruppen prinzipiell möglich war. Aufgrund der begrenzten Stabilität konnten jedoch keine Vorteile aus dem Einsatz der Mutante gezogen werden.

4.7 Lipase-Aktivierung durch Glutaraldehyd

Bei den Untersuchungen zur Immobilisierung der Lipase LipT1-WT mittels GA konnte unter bestimmten Bedingungen eine deutliche Steigerung der Aktivität festgestellt werden (Abschnitt 3.2.4). Durch Anwesenheit von GA im Puffer (50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10; 1 % (v/v) Triton X-100; 500 mM NaCl) erhöhte sich die Aktivität der Lipase bei der Hydrolyse von *p*NPP um das 8-fache. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits von Fernandez-Lorente *et al.* für die eukaryotischen Lipasen A und B aus *Candida antarctica* (CaIA und CaIB) sowie für Lipase aus *Candida rugosa* (CRL) beobachtet [Fernández-Lorente *et al.*, 2006]. Die Lipasen wurden in Anwesenheit von Triton X-100 an einen aminierten Träger adsorbiert und zeigten nach Quervernetzung mit GA eine bis zu 10-fach höhere Aktivität.

Generell kann eine Aktivitätssteigerung von Lipasen über verschiedene Vorgehensweisen erfolgen (Tabelle 4-5). Häufig ist bereits die Adsorption an einen hydrophoben Träger ausreichend. Batisda *et al.* adsorbierten CaIA und verschiedene andere Lipasen u.a. aus *Pseudomonas fluorescens* (PFL), *Rhizomucor miehei* (RML) und *Humicola lanuginosa* (HLL) an Octyl-Sepharose und konnten eine Erhöhung der Aktivität gegenüber dem löslichen Substrat *p*NP-Propionat um das 1,5 - 20-fache feststellen [Bastida *et al.*, 1998]. Bei Verwendung des hydrophoberen Trägers Octadecyl-Sepabeads konnte ebenfalls eine Hyperaktivierung der Lipasen RML, CaIB, CRL und BTL2 erhalten werden [Palomo *et al.*, 2002; Palomo *et al.*, 2004]. Im Vergleich zu den löslichen Enzymen stieg die Aktivität gegenüber *p*NP-Propionat auf 120 - 500 %. Unter Einsatz des Substrates Ethylbutyrat war eine bis zu 20-fache Steigerung möglich. Auch Trägermaterialien mit kürzerkettigen Alkylresten wie Butyl-Sepabeads oder Hexyl-Toyopearl führten zu einer Lipase-Aktivierung [Fernandez-Lorente *et al.*, 2008a; Branco *et al.*, 2010].

Weiterhin kann in der Regel durch Zusatz von Detergenzien zur Lipase-Präparation eine Aktivierung erreicht werden. Dabei haben neben der Art des jeweiligen Detergenz auch dessen Konzentration und das verwendete Substrat einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Aktivierung. Die Aktivität von CaIA gegenüber *p*NP-Propionat konnte mit 1 % Triton X-100 um das 1,5-fache gesteigert werden [Fernandez-Lorente *et al.*, 2007]. Lipase PFL, immobilisiert an cyanogenbromidaktivierte Sepharose (CNBr-Sepharose), zeigte in Anwesenheit von 0,01 % Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) eine 8-fach höhere Aktivität gegenüber *p*NP-Propionat und eine 19-fache Steigerung bei Verwendung von Ethylbutyrat [Fernandez-Lorente *et al.*, 2007]. Nach Adsorption von Lipase RML auf Sepharose Q in Gegenwart von Sucrose-Laurat stieg die Aktivität gegenüber *p*NP-Butyrat um den Faktor 20 [Filice *et al.*, 2011a].

Die Aktivität von Lipasen kann ebenso durch zielgerichtete, chemische Modifikationen auf der Proteinoberfläche beeinflusst werden. Godoy *et al.* generierten eine Mutante der Lipase BTL2 mit einem Cys-Rest an Position 64, um thiolhaltige Polymere wie Dextran- oder PEG-Derivate zu koppeln und somit Einfluss auf die Konformationsänderungen bei der Öffnung

der Deckelregion nehmen zu können [Godoy *et al.*, 2010]. Mit diesem Ansatz gelang eine Verdopplung der Aktivität bei der Hydrolyse von *p*NP-Butyrat. In einer Erweiterung des Ansatzes wurde die Aktivität von BTL2 durch Modifikation mit PEG1500, Immobilisierung auf CNBr-Sepharose und Inkubation mit 20 % Dioxan in Kombination mit 0,01 % (w/v) Triton X-100 um das 11-fache gesteigert [Godoy *et al.*, 2011a]. Einen ähnlichen Ansatz nutzen Lopez-Gallego *et al.* zur Veränderung der Grenzflächenaktivierung der Lipase BTL2 [López-Gallego *et al.*, 2012]. Durch Modifizierung einer Cys-Mutante (S320C) mit verschiedenen Thioalkanen im Bereich des aktiven Zentrums konnte eine Lipase-Variante mit permanent geöffneter Deckelkonformation generiert werden. Diese zeigte eine 2,5-fach erhöhte Aktivität gegenüber *p*NP-Butyrat und eine 12-fach höhere Effizienz bei der Synthese von Oxiran-2-ylbutyrat.

Tabelle 4-5: Methoden zur Steigerung der Hydrolyseaktivität verschiedener Lipasen.

Lipase	Methode	Substrat	Aktivitätssteigerung [-fach]	Referenz
CalA, CalB, CRL	Adsorption an NH ₂ -funkt. Träger (Triton X-100), Zusatz GA	u.a. Mandelsäuremethylester	1,6 - 7	[Fernández-Lorente <i>et al.</i> , 2006]
CalA, PFL, RML, HLL	Adsorption an Octyl-Sepharose	<i>p</i> NP-Propionat	1,2 - 20	[Bastida <i>et al.</i> , 1998]
RML, CalB, CRL, BTL2	Adsorption an Octyadecyl-Sepabeads	<i>p</i> NP-Propionat, Ethylbutyrat	1,2 - 20	[Palomo <i>et al.</i> , 2002; Palomo <i>et al.</i> , 2004]
CalA	Zusatz Detergenz Triton X-100	<i>p</i> NP-Propionat	1,5	[Fernandez-Lorente <i>et al.</i> , 2007]
PFL	kovalente Immobilisierung an CNBr-Sepharose, Zusatz CTAB	<i>p</i> NP-Propionat, Ethylbutyrat	8 - 19	[Fernandez-Lorente <i>et al.</i> , 2007]
RML	Adsorption an Q-Sepharose, Zusatz Sucrose-Laurat	<i>p</i> NP-Butyrat	20	[Filice <i>et al.</i> , 2011a]
BTL2	kovalente Modifikation der Proteinoberfläche mit Dextran bzw. PEG	<i>p</i> NP-Butyrat	2 - 11	[Godoy <i>et al.</i> , 2010; Godoy <i>et al.</i> , 2011a]
BTL2	kovalente Modifikation der Substratbindetasche	<i>p</i> NP-Butyrat	2,5	[López-Gallego <i>et al.</i> , 2012]
LipT1	Zusatz von Triton X-100 und GA	<i>p</i> NP-Palmitat	5 - 8	vorliegende Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde der Aktivierungseffekt der Lipase LipT1 durch GA genauer untersucht. Die Untersuchungen fanden in Lösung ohne festen Träger statt, um zusätzliche Einflüsse durch Adsorptionsvorgänge sowie Diffusions- und Verteilungseffekte ausschließen zu können. Ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen in Abschnitt 3.2.3.1 wurde die

Hypothese aufgestellt, dass Triton X-100 als Detergenz im Ansatz die Öffnung des Deckels oberhalb des aktiven Zentrums und somit eine Grenzflächenaktivierung der Lipase bewirkt. Diese „offene“ Konformation wurde vermutlich durch Zugabe von GA fixiert, indem verschiedene Lysinreste in der Nähe der Deckelregion miteinander quervernetzt wurden.

Die Wirkung von Triton X-100 auf die Konformation der Deckelregion wurde bereits für zahlreiche Lipasen nachgewiesen. Zum einen konnte durch Zusatz des Detergenz eine Aktivitätssteigerung beobachtet werden [Wilson *et al.*, 2006; Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Godoy *et al.*, 2011a; López-Gallego *et al.*, 2012]. Zum anderen konnte BTL2, eine mit LipT1 strukturverwandte Lipase, nach Behandlung mit Triton X-100 in offener Konformation kristallisiert werden [Carrasco-Lopez *et al.*, 2009]. In Abschnitt 3.2.4.2 konnte gezeigt werden, dass Triton X-100 bei Aktivierung von LipT1-WT durch GA eine entscheidende Rolle spielt. Ohne Zusatz des Detergenz trat keine Aktivitätssteigerung auf, was den Schluss nahe legt, dass für den beobachteten Aktivierungseffekt zwingend die Anwesenheit einer Grenzfläche notwendig ist.

Bei den Untersuchungen wurde außerdem festgestellt, dass die Aktivierung der Lipase durch NaCl beeinflusst wird. In Abwesenheit von NaCl fand anstatt einer 5,4-fachen Steigerung der Aktivität (500 mM NaCl) nur eine Erhöhung um den Faktor 3,8 statt. Zum Einfluss der Ionenstärke auf die Reaktivität von GA sind gegensätzliche Effekte beschrieben. Bei der Quervernetzung von α -Chymotrypsin mit GA führte die Verringerung der Ionenstärke zu einer beschleunigten Reaktion [Tomimatsu *et al.*, 1970]. El-Thaher *et al.* stellten ebenfalls fest, dass der Einsatz von Salzen einen geringen, negativen Einfluss auf die Quervernetzung von Peptonen hat [El-Thaher *et al.*, 2013]. Die genaue Beteiligung von NaCl bei der Aktivierung von LipT1-WT durch GA ist nicht bekannt. Die Ergebnisse legen jedoch nahe, dass die Anwesenheit von NaCl und somit die Verringerung ionischer Wechselwirkungen im Ansatz den Aktivierungseffekt zu verstärken.

Weiterhin wurde zur Bestätigung der o.g. Hypothese untersucht, ob die beobachtete Aktivitätssteigerung tatsächlich auf eine Fixierung der Deckelregion zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck war der Einsatz einer Lipase ohne Deckel erforderlich. Die Deckelregion in LipT1 wird aus den Helices α_6 und α_7 gebildet und umfasst min. 55 Aminosäuren (D175-K229) [Rahman *et al.*, 2012]. Da es sich um eine intramolekulare Domäne des aus 397 Aminosäuren bestehenden Lipase-Moleküls handelt, schien die Konstruktion einer Mutante mit deletierter Deckelregion nicht vielversprechend. Aus diesem Grund wurde Lipase LipA aus *B. subtilis* zur Untersuchung herangezogen, die in ihrer nativen Form keine lipasetypische Deckelstruktur aufweist (Abbildung 1-3) [Lesuisse *et al.*, 1993; Pouderoyen *et al.*, 2001]. Es sollte überprüft werden, ob eine Modifikation der vorhandenen Lys-Reste (11) mit GA in Anwesenheit von Triton X-100 ebenfalls zu einer Aktivierung führt (Abschnitt 3.2.4.3). Dabei stellte sich heraus, dass im eingesetzten Konzentrationsbereich keine mit LipT1-WT vergleichbare Aktivitätssteigerung möglich war. Es wurde lediglich eine 1,2-fache Erhöhung der Aktivität bei einer GA-Konzentration von 367 μ M erhalten. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Inkubation mit GA und Triton X-100 die Aktivität von LipA zwar leicht stimuliert wird, jedoch das Fehlen der lipasetypischen Deckeldomäne ein ausgeprägtes Aktivierungsverhalten verhindert. Die eukaryotischen Lipasen CalA, CalB und CRL, die nach Adsorption an einen aminierten Träger durch Behandlung mit Triton X-100 und GA aktiviert werden konnten, besitzen ausnahmslos Deckelstrukturen, die in geschlossener Konformation das aktive Zentrum abschirmen [Fernández-Lorente *et al.*, 2006].

Zur Charakterisierung des Aktivierungseffekts von LipT1-WT wurde zunächst untersucht, ob die Aldehyd-Modifikation einzelner Lysinreste auf der Proteinoberfläche ausreicht oder, ob eine Quervernetzung verschiedener Lysine notwendig ist. Zu diesem Zweck wurde alternativ zu GA ein monofunktionelles Aldehyd mit gleicher *spacer*-Länge von 5 C-Atomen eingesetzt. Die Behandlung der Lipase mit Valeraldehyd hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Aktivität, was den Schluss zuließ, dass die Bifunktionalität von GA eine entscheidende Rolle bei der Lipase-Aktivierung spielt. GA ist je nach vorliegenden Bedingungen zur Ausbildung verschiedener, höhermolekularer Strukturen in der Lage [Rasmussen und Albrechtsen, 1974; Margel und Rembaum, 1980]. Unter sauren und neutralen Bedingungen kann GA als zyklisches Hemiacetal (Abschnitt 1.2.1) sowohl in monomerer als auch in polymerer Form vorkommen [Migneault *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2014]. Im basischen pH-Bereich ist neben dimerem, zyklischem GA auch das Auftreten von α,β -ungesättigten Aldehyd-Polymeren möglich. Der genaue Mechanismus bei der Quervernetzung von Proteinen durch GA ist bis heute nicht vollständig verstanden [Barbosa *et al.*, 2014]. Denkbar ist sowohl die Entstehung von Schiff'schen Basen (Iminen) zwischen den Aldehyd- und Aminogruppen als auch eine Michael-Addition der Aminogruppen an die Doppelbindungen der α,β -ungesättigten Aldehyd-Oligomere (Abbildung 1-7).

Zur Untersuchung der modifizierten Aminogruppen und Identifizierung möglicher Quervernetzungspositionen im Lipase-Molekül wurden verschiedene massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Allerdings konnten weder mit MALDI-TOF noch mit ESI-MS aussagekräftige Ergebnisse erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Speziell im Fall der ESI-MS-Experimente konnten zwar nach Trypsin-Verdau eindeutig Peptide der Lipase identifiziert werden (Sequenzabdeckung 51 %), ein Nachweis modifizierter Peptide war jedoch nicht möglich. Die Detektion wurde durch die o.g. Polymerisationsneigung von GA und die verschiedenen, möglichen Reaktionsmechanismen erschwert. Es lag ein komplexes Gemisch unterschiedlich großer Polymerisationsprodukte vor, was eine eindeutige Zuordnung der u.U. heterogen modifizierten Peptide verhinderte.

Als alternatives Quervernetzungsreagenz wurde der Imidoester Dimethyladipimidat (DMA) eingesetzt, der selektiv mit Aminogruppen reagiert, eine ähnliche *spacer*-Länge wie monomeres GA aufweist und nicht zur Polymerisation neigt [Hermanson, 2010]. Da unter Verwendung von DMA keinerlei Aktivitätssteigerung auftrat (Daten nicht gezeigt), konnten jedoch keine Rückschlüsse gezogen, welche Aminogruppen an der Lipase-Aktivierung durch GA beteiligt sind.

Im Gegensatz dazu ließen die Ergebnisse der Mutante LipT1-KXR Schlüsse hinsichtlich möglicher Modifikationspositionen in LipT1-WT zu. Da Variante KXR keine Aktivitätssteigerung nach GA-Behandlung zeigte, müssen sich unter den Austauschpositionen (28, 84, 185, 207, 229, 251 und 329) Lysinreste befinden, die an der Aktivierung von LipT1-WT beteiligt sind. Die Lysinreste K28, K207 und K329 liegen in *random coil*-Strukturen, wohingegen die Lysine K84, K185, K229 und K251 in verschiedenen α -Helices positioniert sind. Lysinreste sind aufgrund ihrer Polarität auf Proteinoberfläche meist besonders exponiert und weisen unter den proteinogenen Aminosäuren (neben Glutamat) die höchste Lösungsmittelzugänglichkeit auf [Lins *et al.*, 2003; Hermanson, 2010]. Grundsätzlich sind Aminosäureseitenketten in flexiblen Bereichen des Proteins zugänglicher für das umgebende Medium als Reste, die in Sekundärstrukturen positioniert sind. Allerdings konnte auch für verschiedene in α -Helices vorkommende Lys-Reste (K84, K185) der Lipase LipT1 nachgewiesen werden, dass eine Modifikation z.B. mit Propionaldehyd möglich ist [Cheong *et al.*, 2011].

In Abbildung 4-2 sind die Positionen der o.g. Lys-Reste der Lipase hervorgehoben. Da die Kristallstruktur der offenen Form von LipT1 bisher nicht verfügbar ist, wurde zum Vergleich die offene Konformation der zu LipT1 strukturverwandten Lipase BTL2 (Homologie 95 %) dargestellt [Carrasco-Lopez *et al.*, 2009]. Die Öffnung des Deckels konnte durch Zusatz von Triton X-100 erreicht werden. Die Lys-Reste K185 und K229 liegen innerhalb der Deckelregion auf Helix α_6 bzw. Helix α_7 . Die Seitenkette von K207 befindet sich in geschlossener Konformation auf einem Loop zwischen den beiden Helices. Die beiden Reste K84 und K251 sind mit einem Abstand von 26 – 32 Å von den Lysinen des Deckels (K185 und K229) entfernt. Durch die in Anwesenheit einer Grenzfläche ausgelöste Deckelbewegung hin zur geöffneten Konformation nähern sich die Reste K84, K251, K185 und K229 einander an, so dass sie in der Endposition eine Ebene aufspannen. Es ist denkbar, dass bei der beobachteten Aktivierung von LipT1-WT mindestens zwei der vier Lysinreste in diesem Bereich durch GA miteinander quervernetzt wurden und dadurch eine Stabilisierung der offenen, aktiveren Form der Lipase auftrat. Eine Beteiligung der weiter entfernten Lys-Reste K28 und K329 an der Aktivierung kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden.

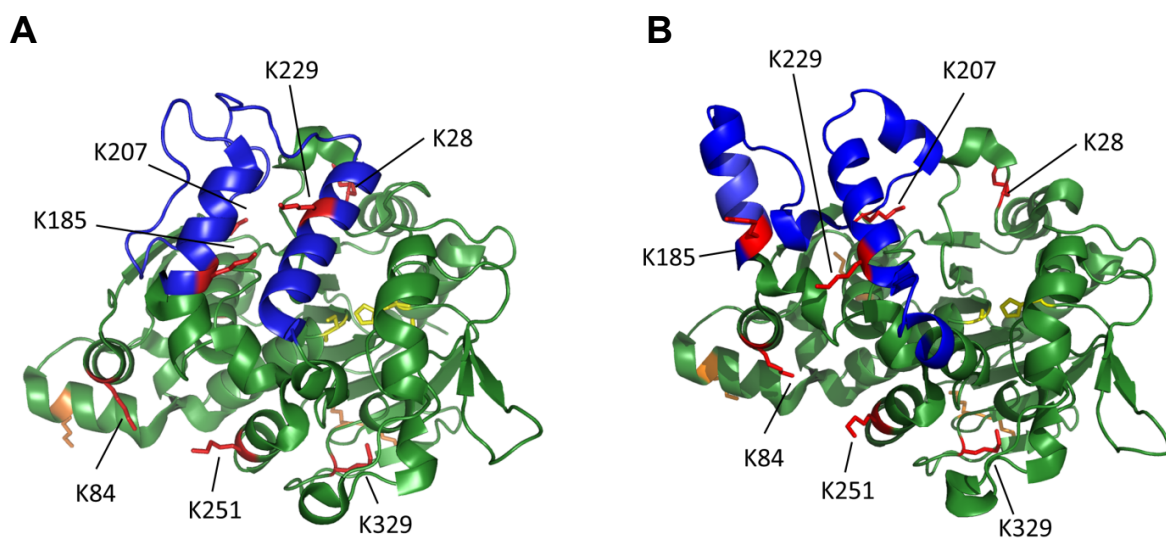


Abbildung 4-2: Vergleich der geschlossenen und geöffneten Konformation der Lipasen LipT1 (A) und BTL2 (B). Lysinreste (*sticks*) mit potentieller Beteiligung an GA-vermittelter Lipase-Aktivierung in rot; Lysinreste in Immobilisierungsebene (K102, K138, K344, K345) in orange; Aminosäuren des aktiven Zentrums (S113, D317, H358) in gelb (*sticks*); Deckelregion (L170 – A240) in blau; *ribbon*-Darstellungen erstellt mit *pymol* basierend auf PDB-Einträgen 2DSN und 2W22 [Matsumura *et al.*, 2008; Carrasco-Lopez *et al.*, 2009].

In Abschnitt 3.2.4.4 wurde der Einfluss der GA-Konzentration auf die Aktivitätssteigerung von LipT1-WT untersucht. Bis 676 μM GA konnte eine Zunahme des Aktivierungseffekt festgestellt werden. Bei höheren Konzentrationen war die Wirkung von GA rückläufig. Da die Polymerisation von GA konzentrationsabhängig verläuft [Migneault *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2014], wurde vermutet, dass im unteren Konzentrationsbereich kleinere GA-Oligomere auftraten, die mit den Aminogruppen der Lipase reagierten und so die aktivierte Form der Lipase stabilisierten. Bei einem höherem GA-Anteil im Ansatz nahm der Polymerisationsgrad

der GA-Strukturen zu, so dass möglicherweise ein immer dichteres Netzwerk um die Lipase-Moleküle gebildet wurde, was u.U. zu einer Abschirmung des aktiven Zentrums führte [Walt und Agayn, 1994]. Die in Abschnitt 3.2.4.5 beobachtete Verringerung der Aktivität bei Verlängerung der Reaktionsdauer von 3 auf 19 h könnte auf einem ähnlichen Effekt beruhen. Weiterhin wurde versucht, den Aktivierungseffekt auf alternative Substrate zu übertragen. Allerdings stellte sich heraus, dass die GA-Behandlung von LipT1-WT nicht zur Steigerung der Aktivität gegenüber Olivenöl führte. Ebenso wurden keine Auswirkungen auf die Hydrolyse des kürzerkettigen Substrats Tributyrin festgestellt (Abschnitt 3.2.4.6). Demzufolge scheint die GA-vermittelte Aktivierung von LipT1 vom jeweiligen Substrat abhängig zu sein. Möglicherweise sind die durch Triton X-100 und GA hervorgerufenen Konformationsänderungen nicht ausreichend, um die Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum zu verbessern und die Hydrolyse der eingesetzten Triacylglyceride zu beschleunigen. Eine Verwendung von Dreifachestern in Kombination mit GA-aktivierten Lipasen ist bisher nicht beschrieben. Fernandez-Lorente *et al.* konnten einen Aktivierungseffekt durch GA für die Lipasen CalA, CalB und RML nachweisen [Fernández-Lorente *et al.*, 2006]. Als Substrate wurden verschiedene Einfachester wie Methylbutyrat, *p*NP-Propionat, Mandelsäuremethylester, 2-Hydroxy-4-Phenylbuttersäureethylester oder Glycidylbutyrat eingesetzt. Je nach Substrat und Lipase traten deutliche Unterschiede im Ausmaß der Aktivierung auf. Für Lipase RML konnte nach Aktivierung mit Sucrose-Laurat und Adsorption an Q-Sepharose eine 7-fach höhere Aktivität bei der Hydrolyse von Fischöl (Sardine) erhalten werden [Filice *et al.*, 2011a].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mithilfe der durchgeführten Untersuchungen ein besseres Verständnis für die Lipase-Aktivierung durch GA in Gegenwart von Triton X-100 gewonnen werden konnte. Die Aktivierung hing vor allem vom Vorhandensein einer Deckelregion über dem aktiven Zentrum sowie der Positionierung der Lysinreste auf der Proteinoberfläche ab. Der Einsatz von GA als Quervernetzer war elementar. Alternative aminogruppenreaktive Reagenzien zeigten keine Wirkung auf die Aktivität der Lipase. Weiterhin konnte der Einfluss der GA-Konzentration auf das Ausmaß der Aktivitätssteigerung nachgewiesen werden. Letztendlich lieferte die beschriebene GA-Behandlung eine 5- 8-fach höhere Aktivität der Lipase LipT1-WT und war somit auch im Hinblick auf die Immobilisierung des Enzyms relevant.

4.8 Immobilisierung mittels Polyhistidin-tag

Als alternative Strategie zur zielgerichteten Immobilisierung wurde die Kopplung von LipT1-WT über den vorhandenen C-terminalen His₆-tag untersucht. Insbesondere sollte dabei festgestellt werden, ob eine Kombination aus Lipase-Aktivierung durch GA und eine Immobilisierung realisierbar ist. Zunächst wurden Untersuchungen zur Immobilisierung der unmodifizierten Lipase durchgeführt.

Wie bereits bei der Reinigung beobachtet, war sowohl die Kopplung an Ni²⁺-SC als auch eine anschließende Elution des Zielproteins möglich (Abschnitt 3.2.5.1). Die Kopplung der initial eingesetzten Lipase-Aktivität verlief in allen Ansätzen vollständig (Kopplungsausbeuten $\geq 99\%$) und führte zu einer stabilen Verbindung zwischen Enzym und Träger, so dass keine Verluste in den Waschschrritten beobachtet werden konnten. Bei einer theoretischen Beladung von 8,6 U₀/g konnten allerdings nur 2 U₀/g auf dem Träger nachgewiesen werden,

was einer Wiederfindung von 23 % entspricht. Als Hauptursache für den nicht nachweisbaren Anteil der eingesetzten Aktivität wurden auftretende Stofftransportlimitierungen in den Poren des Trägers angesehen (Abschnitt 4.3.1). Es wurde vermutet, dass die Reaktion hauptsächlich auf der äußeren Oberfläche bzw. in oberflächennahen Poren der Partikel ablief und Lipase-Moleküle in tieferen Poren aufgrund niedriger Substratkonzentration nur bedingt zur Produktbildung beitrugen. Zur Verifizierung der Hypothese wurde eine Elution des Zielproteins über die Zugabe von Imidazol durchgeführt. Dadurch konnten 85 % der initial eingesetzten Aktivität rückgewonnen werden. Demnach kann der scheinbare Aktivitätsverlust eher auf eine Diffusionslimitierung des Substrates als auf eine Inaktivierung infolge der Kopplung zurückgeführt werden. Dieser Zusammenhang konnte zusätzlich bestätigt werden, indem die Beladung des Trägers variiert wurde (Abschnitt 3.2.5.2). Bei Verringerung der Beladung auf 2 U_C/g konnten bis zu 49 % der Startaktivität auf dem Träger wiedergefunden werden. Ein ähnlicher Einfluss der Beladung auf die Aktivität und Wiederfindung wurde bereits bei verschiedenen Untersuchungen zur Lipase-Immobilisierung beobachtet [Hu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Vahidi *et al.*, 2015]. Die Kopplung von Proteinen über Affinitäts-*tags* und speziell Polyhistidin-*tags* ist eine oft angewendete Methode zur zielgerichteten Immobilisierung. Cassimjee *et al.* modifizierten Silica-Partikel zur Komplexierung von Co²⁺, um die Kopplung verschiedener Lipasen wie CalB oder LipA über einen His₆-*tag* zu untersuchen [Cassimjee *et al.*, 2011]. Die Wiederfindung der Aktivität lag bei 58 %. Zusätzlich konnte die Funktionalität der Biokatalysatoren sowohl in Phosphatpuffer als auch in Lösungsmitteln wie Cyclohexan oder Acetonitril nachgewiesen werden. Lipase L1 aus *Bacillus stearothermophilus* konnte mittels His-*tag* an magnetische Nanopartikel gekoppelt werden, die zuvor mit Silica / IDA beschichtet und mit Cu²⁺ beladen wurden [Kim *et al.*, 2009]. Diese Enzym-Träger-Kombination erwies sich hinsichtlich Aktivität und Stabilität als vorteilhaft gegenüber einer an Silica-Gel bzw. Silica-Gel-Cu²⁺ immobilisierten Lipase L1. Unter Einsatz multifunktionaler Materialien konnte die Histidin-Affinitätskopplung verschiedener Enzyme mit einer Mehrpunktfixierung an oxirangruppenhaltige Träger kombiniert werden [Mateo *et al.*, 2000b; Palomo *et al.*, 2003b]. Ashjari *et al.* modifizierten Silica- und Silica-Nanopartikel sowohl mit Oxirangruppen als auch mit einem Cu²⁺-Komplexbildner zur Immobilisierung einer Lipase aus *Rhizopus oryzae* (ROL) [Ashjari *et al.*, 2015]. Die Kopplungsausbeuten lagen zwischen 83 und 99 %. Die Immobilisate wurde neben der Spaltung von *p*NP-Butyrat auch zur Hydrolyse von Fischöl eingesetzt.

Zur Erhöhung der Lipase-Aktivität auf dem Träger wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die GA-vermittelte Aktivitätssteigerung mit der Immobilisierung über den His₆-*tag* zu kombinieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kopplung von LipT1-WT auch nach GA-Modifikation erfolgreich durchführbar war (Abschnitt 3.2.5.2). Offensichtlich wurde die Zugänglichkeit des His₆-*tags* durch eine potentielle Modifikation der umliegenden Lys-Reste K102, K344 und K345 nicht beeinträchtigt. Ebenso war eine Kopplung ohne vorherigen Pufferwechsel auf Bindepuffer (pH 8) möglich. Die Proteinbindung mittels His₆-*tag* wird standardmäßig bei neutralem bzw. leicht basischem pH-Wert (pH 7 - 8) durchgeführt [Bornhorst und Falke, 2000; Schlieben *et al.*, 2004; Charlton und Zachariou, 2008]. Der deutlich basischere pH-Wert des Puffer zur GA-Behandlung (pH 10) schien die Kopplung der Lipase an Ni²⁺-SC nicht zu beeinflussen. Durch Immobilisierung der GA-modifizierten LipT1-WT konnte eine maximale Aktivität von 3,8 U_C/g auf dem Träger nachgewiesen werden. Vermutlich wurde in diesem Punkt eine vollständige Beladung der äußeren Oberfläche der Partikel erreicht. Die hohe Aktivitätsdichte auf der Oberfläche in Kombination mit der o.g.

Diffusionslimitierung führte folglich zu einer unzureichenden Substratverteilung im Inneren der Partikel. Somit konnte trotz nahezu 100 %-iger Kopplungsausbeute durch Erhöhung der Beladung keine weitere Steigerung der Aktivität auf dem Träger erzielt werden. Bei Variation der Trägerbeladung ergab sich für GA-LipT1-WT qualitativ der gleiche Sättigungsverlauf wie bei der unmodifizierten Lipase-Variante. Die absolute trägerbezogene Aktivität lag jedoch im Vergleich zur unbehandelten Lipase 1,2 – 2,5-fach höher. Die GA-Behandlung verbesserte dementsprechend auch die Wiederfindung der immobilisierten Aktivität. So waren bei Verringerung der Beladung auf 1 U_C/g bis zu 91 % der initial eingesetzten Aktivität auf dem Träger nachweisbar.

Zur Untersuchung der Stabilität wurde die mittels His₆-tag gekoppelte Lipase GA-LipT1-WT mehrfach zu Hydrolyse von pNPP eingesetzt (Abschnitt 3.2.5.3). Das Immobilisat zeigte nahezu keinen Aktivitätsverlust. Die Restaktivität lag nach zehn Durchgängen bei 96 %. Demzufolge war der gebildete Komplex zwischen His₆-tag des Enzyms und Ni²⁺-IDA-Gruppen des Trägers für ein Recycling des Biokatalysators ausreichend stabil und ein Auswaschen rein adsorptiv gebundener Lipase vernachlässigbar.

Tabelle 4-6 zeigt vergleichend die Stabilität beschriebener Lipase-Immobilisate nach mehrfachem Einsatz in Hydrolyse- bzw. Synthesereaktionen. Kim *et al.* konnten Lipase L1 nach Immobilisierung an Cu²⁺-beladene, magnetische Silica-Nanopartikel wiederholt zur Hydrolyse von pNP-Butyrat einsetzen und erhielt eine Restaktivität von über 70 % nach fünf Durchgängen [Kim *et al.*, 2009]. Die Wiederverwendbarkeit von His-tag-immobilisierter Lipase L1 wurde ebenfalls bei der Hydrolyse von Olivenöl untersucht [Woo *et al.*, 2010]. Die Restaktivität betrug nach zehn Zyklen 65 %. Durch Anpassungen hinsichtlich Trägermaterial und Liganden konnte die Restaktivität der Lipase auf 80 % nach zehn Zyklen gesteigert werden [Woo *et al.*, 2015]. Vahidi *et al.* nutzten magnetische Nanopartikel mit Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure zur Kopplung von CalB und TLL aus *Pichia pastoris*-Fermentationsüberständen [Vahidi *et al.*, 2015]. Die Immobilisate (TLL) wurden zur Produktion von Biodiesel (Fettsäuremethylestern) aus Altfett eingesetzt. Nach sieben Durchgängen konnte kaum Aktivitätsverlust festgestellt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Immobilisierung mittels Polyhistidin-tag sind mit bisherigen Literaturdaten vergleichbar. Die Kombination aus GA-Aktivierung und Immobilisierung stellt einen neuartigen und vielversprechenden Ansatz zur Anwendung der Lipase dar.

Tabelle 4-6: Operationelle Stabilität verschiedener Lipasen nach Immobilisierung mittels His-tag.

Lipase	Träger	Reaktion / Substrat	Anzahl Zyklen	Restaktivität	Referenz
Lipase L1	Cu ²⁺ -Silica-Nanopartikel	Hydrolyse von pNP-Butyrat	5	70 %	[Kim <i>et al.</i> , 2009]
Lipase L1	Cu ²⁺ -Silica-Nanopartikel	Hydrolyse von Olivenöl	10	65 %	[Woo <i>et al.</i> , 2010]
Lipase L1	Silan-beschichtete, magn. Nanopartikel	Hydrolyse von Olivenöl	10	85 %	[Woo <i>et al.</i> , 2015]
Lipase TLL	Ni ²⁺ -NTA-funkt. Nanopartikel	Synthese von Fettsäuremethylestern	7	~ 100 %	[Vahidi <i>et al.</i> , 2015]
LipT1	Ni ²⁺ -Streamline Chelating	Hydrolyse pNPP	10	96 %	vorliegende Arbeit

Zusammenfassend zeigen die diskutierten Resultate, dass eine zielgerichtete Immobilisierung der Lipase LipT1 neben exponierten Cysteinresten und MTG-zugänglichen Glutaminseitenketten auch über einen Polyhistidin-*tag* realisiert werden kann. Die His₆-*tag*-basierte Kopplung erwies sich, verglichen mit der MTG-katalysierten Immobilisierung, als vorteilhaft hinsichtlich der Aktivitätswiederfindung und Stabilität des Immobilisats. Ferner kommt diese Methode ohne den Einsatz eines zusätzlichen Kopplungsreagenz bzw. -enzym aus. Die Reversibilität der Bindung erlaubt im Fall einer prozessbedingten Lipase-Inaktivierung eine Regenerierung des Trägermaterials. Die Immobilisierung mittels MTG zeichnet sich dagegen durch eine besonders hohe Spezifität aus, da das zu koppelnde Protein eine definierte Erkennungssequenz aufweisen muss. Im Gegensatz dazu können an Ni²⁺-IDA-Trägermaterialien auch andere proteinogene Verunreinigungen binden, die in ihrer nativen Struktur Histidinreste auf der Oberfläche tragen wie z.B. die *E. coli*-eigenen Proteine ArnA und SlyD [Andersen *et al.*, 2013]. Zusätzlich bot die MTG-basierte Kopplung die Möglichkeit höhere trägergebundene Aktivitäten zu erzielen, wies allerdings auch den Nachteil auf, dass die Kopplung aufgrund einer Nebenreaktion nicht vollständig ablief. Grundsätzlich konnte auch über die Nutzung von Cysteinresten eine zielgerichtete Immobilisierung der Lipasen realisiert werden. Für einen direkten Vergleich sind jedoch weitere Untersuchungen zum Einsatz alternativer Trägermaterialien notwendig.

Prinzipiell stellen die beschriebenen Methoden vielversprechende Ansätze auf dem Gebiet der Immobilisierung, Aktivierung und Stabilisierung von Lipasen dar und bieten auch entsprechendes Entwicklungspotenzial für eine Übertragung auf andere Enzymklassen.

5 Zusammenfassung

Lipasen sind vielseitig einsetzbare Enzyme, die für zahlreiche biotechnologische Fragestellungen interessant sind. Im Hinblick auf einen effektiven und wirtschaftlichen Einsatz des Biokatalysators kann sich eine Immobilisierung als vorteilhaft erweisen. Zu diesem Zweck werden Verfahren angestrebt, mit denen eine Immobilisierung unter Erhalt der Enzymaktivität realisiert werden kann und, die zu einem stabilen Immobilisat führen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war in diesem Zusammenhang Immobilisierungsstrategien zu entwickeln, die ausgehend von spezifisch designten Lipase-Varianten eine zielgerichtete Kopplung der Enzyme ermöglichen.

Im Rahmen der Arbeit wurden insgesamt zehn Varianten der drei Lipasen LipT1 aus *Geobacillus* sp. T1, LipA aus *Bacillus subtilis* 168 und LipL1 aus *Geobacillus stearothermophilus* L1 untersucht. Alle Varianten konnten erfolgreich in *E. coli* BL21 Gold(DE3) im Schüttelkolbenmaßstab produziert werden. Für die drei Wildtyp-Lipasen LipT1, LipA und LipL1 wurde die Produktion in Form eines *fed-batch*-Verfahrens auf den Bioreaktor (12 L) übertragen. Darauf aufbauend konnte eine Vergrößerung des Maßstabs auf 36 L realisiert werden. Für Lipase LipT1 erfolgte am Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse in Leuna (CBP) ein weiteres Scale-Up des Prozesses auf 200 L. Die produzierte Lipase-Aktivität (U_T) wurde titrimetrisch über die Hydrolyse von Olivenöl bestimmt. In allen Maßstäben zur Produktion von LipT1 konnte eine vergleichbare biomassespezifische Aktivität von rund $1,1 \cdot 10^4 U_T/g_{BFM}$ erreicht werden, was $4 \text{ mg}/g_{BFM}$ bzw. $20 \text{ mg}/g_{BTM}$ entsprach. Die Reinigung der zehn Lipase-Varianten in aktiver Form gelang mithilfe eines C-terminalen His₆-tags.

Zur Untersuchung der zielgerichteten Immobilisierung wurden verschiedene Strategien verfolgt, in denen die Kopplung über Glutaminreste, Cysteinreste, proteinogene Aminogruppen und über einen His₆-tag erfolgen sollte. Zu diesem Zweck wurden insgesamt sieben verschiedene Varianten der Lipase LipT1 erzeugt. In Tabelle 5-1 ist eine Auswahl der besten Immobilisierungsergebnisse aufgeführt.

Im ersten Ansatz zur Immobilisierung wurde eine mikrobielle Transglutaminase (MTG) zur Lipase-Kopplung genutzt. Hierfür wurde ausgehend von der Substratspezifität der MTG ein peptidbasierter Immobilisierungs-tag konstruiert und N- bzw. C-terminal mit LipT1 fusioniert. Beide Varianten konnten zielgerichtet an ein aminogruppenhaltiges Trägermaterial gekoppelt werden. Für die C-terminale tag-Variante wurden trägerbezogene Aktivitäten von bis zu $6 U_C/g_{Träger}$ erhalten. Bei Untersuchungen zur Wiederverwendbarkeit der Immobilisate für die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP) lag die Restaktivität nach 12 Reaktionszyklen bei 76 %.

Weiterhin wurden verschiedene Mutanten der Lipase LipT1 mit jeweils einem Ser→Cys-Austausch (S2C, S259C und S333C) sowie eine Kombinationsmutante der drei Positionen (SXC) konstruiert. Das Immobilisierungsverhalten der Varianten wurde unter Einsatz von maleinimidfunktionalisierten Glasobjektträgern untersucht. Hier zeigten die Varianten S333C und SXC die besten Ergebnisse hinsichtlich Aktivität und Stabilität. Für SXC wurden eine Aktivität von $2,7 \text{ mU}_C/\text{cm}^2$ und eine Wiederfindung von 63 % erhalten.

Die Lipase-Kopplung über proteinogene Aminogruppen wurde unter Verwendung von glutaraldehyd- sowie oxirangruppenhaltigen Trägermaterialien durchgeführt. Zur Kontrolle der Orientierung der Lipase auf dem Träger wurde eine Mutante mit sieben Lys→Arg-Substitutionen eingesetzt. Durch Reduktion der Anzahl an primären Aminogruppen auf der

Proteinoberfläche sollte die Kopplung über die verbliebenen fünf Aminogruppen innerhalb einer definierten Immobilisierungsebene ablaufen. Die erzeugte Variante LipT1-KXR konnte in aktiver Form produziert und gereinigt werden, zeigte aber gegenüber der Wildtyp-Lipase unter den getesteten Kopplungsbedingungen keine Vorteile hinsichtlich Aktivität oder Stabilität.

In Untersuchungen zur Inkubation der löslichen Lipase LipT1-WT mit Triton X-100 und Glutaraldehyd (GA) wurde beobachtet, dass gegenüber dem Substrat *p*NPP eine fünffach höhere Aktivität auftrat. Für Triacylglyceride als Substrate konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Dieser Aktivierungseffekt wurde hinsichtlich verschiedener Einflüsse (u.a. Aldehyd-Spezies und -Konzentration, Reaktionsdauer und Anwesenheit von Detergenz) untersucht und mit einer Immobilisierung über den His₆-tag der Lipase kombiniert. Durch Variation der Trägerbeladung konnte eine maximale Aktivität von 3,8 U_C/g_{Träger} ermittelt werden. Die Wiederfindung lag bei geringer Beladung (1 U_C/g) bei 91 %. Hinsichtlich der Wiederverwendbarkeit des Immobilisats wurde eine Restaktivität von 96 % nach 10 Zyklen erreicht.

Die zielgerichtete Immobilisierung der Lipase LipT1 ist bisher nicht beschrieben und konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals unter Anwendung verschiedener rationaler Ansätze gezeigt werden. Von den untersuchten Methoden lieferte die MTG-basierte Kopplung die höchste trägerbezogene Aktivität. Hinsichtlich Kopplungsausbeute und Aktivitätswiederfindung wurden die besten Ergebnisse bei der Kombination aus GA-Modifikation und Immobilisierung mittels His₆-tag erhalten. Ebenso erwies sich diese Methode vorteilhaft bezüglich der operationellen Stabilität bei mehrmaliger Verwendung des Immobilisats.

Zusammenfassend leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Entwicklung von Produktionsverfahren für industriell relevante Biokatalysatoren. Die beschriebenen Methoden stellen vielversprechende Ansätze auf dem Gebiet der zielgerichteten Immobilisierung und Stabilisierung von Lipasen dar und bieten darüber hinaus Entwicklungspotenzial für eine Übertragung auf andere Enzymklassen.

Tabelle 5-1: Vergleich verschiedener Methoden zur zielgerichteten Immobilisierung der Lipase LipT1. Die Bestimmung der Lipase-Aktivität (U_C) in den Untersuchungen zur Kopplung und Wiederverwendung der Immobilisate (Recycling) erfolgte colorimetrisch unter Verwendung des Substrates *p*-Nitrophenylpalmitat.

Immobilisierung über	Lipase-Variante	Träger	Max. Kopplungsausbeute [%]	Max. Wiederfindung [%]	Max. trägerbezog. Aktivität [U _C /g _{Träger}]	Restaktivität Recycling in [%] nach x Zyklen
Glutamine (MTG)	LipT1-CQ	EAH-Sepharose	80	26	6	76 nach 12 Z.
Cysteine	SXC	maleinimid-funkt. Objektträger	28	63	2,7 mU _C /cm ²	87 nach 6 Z.
Histidine	LipT1-WT nach GA-Modifikation	<i>Streamline Chelating</i>	99	91	3,8	96 nach 10 Z.

6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergaben sich interessante Fragestellungen, die zukünftig weiter untersucht werden sollten.

Hinsichtlich der Produktion der Lipasen im Bioreaktor könnte eine Optimierung der Prozessbedingungen zu einer weiteren Steigerung der Ausbeute führen. Eine höhere Ausbeute könnte zum einen durch Erhöhung der intrazellulären Produktkonzentration (biomassespezifische Aktivität) und zum anderen durch Steigerung der Biomassekonzentration (volumetrische Aktivität) erreicht werden. Als Parameter für eine Optimierung würden sich zum Beispiel die Induktionstemperatur, die Fermentationsdauer sowie die Substratzufütterungsstrategie anbieten.

Bei der Reinigung der Lipasen traten teilweise hohe Aktivitätsverluste infolge von Aggregation auf. In diesem Zusammenhang wären zusätzliche Untersuchungen zur Verringerung der Aggregationsneigung denkbar. Durch die Auswahl geeigneter Zusätze in den Reinigungspuffern könnte u.U. eine Steigerung der Ausbeute erreicht werden. Hier könnten verschiedene Detergenzien (z.B. Triton X-100, LDAO) oder auch organische Lösungsmittel (z.B. Isopropanol) auf ihre Eignung getestet werden [Schlieben *et al.*, 2004]. Diese Zusätze sollten sich allerdings möglichst nicht auf das Immobilisierungsverhalten der Lipasen auswirken.

Bei der Immobilisierung mittels MTG konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Kopplung zwischen den Q-tag-Lipasen und dem Trägermaterial möglich ist. Im Hinblick auf eine Steigerung der Kopplungsausbeute und Verkürzung der Kopplungsdauer wäre eine Optimierung der Kopplungsbedingungen, insbesondere von pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur, vielversprechend. Des Weiteren sollte zur Unterdrückung der MTG-katalysierten Q-E-Modifikation die Verfügbarkeit der Aminkomponente auf dem Trägermaterial verbessert werden. In diesem Zusammenhang wäre die Verwendung eines Trägers mit höherer Dichte an funktionellen Aminogruppen denkbar. Zusätzlich könnte der Einfluss der Hydrophilie und die spacer-Länge auf das Kopplungsverhalten untersucht werden.

Zur Untersuchung der zielgerichteten Immobilisierung der LipT1-Cys-Mutanten wurden PEG/MAL-Objektträger eingesetzt, die erfolgreich als Testsystem zur Auswahl geeigneter Mutationspositionen genutzt werden konnten. Für eine zukünftige Anwendung der Cys-Mutanten sollten allerdings *bead*-basierte Trägermaterialien aufgrund der höheren Beladungskapazitäten und der einfacheren Handhabung vorgezogen werden. Als Alternative zu MAL-Gruppen wäre eine Kopplung auch an thiol- oder thiosulfonataktivierte Trägermaterialien denkbar [Mansfeld *et al.*, 1999; Ovsejevi *et al.*, 2013]. Da in diesem Fall das Enzym eluierbar wäre, könnte die Aktivität bei der Immobilisierung einfacher bilanziert und somit untersucht werden, inwiefern die Kopplungsreaktion zu einer möglichen Enzyminaktivierung führt. Hinsichtlich der Wiederverwendbarkeit würde ein weiterer Vorteil darin bestehen, dass aufgrund der Reversibilität der Bindung inaktiviertes Enzym entfernt werden kann und dadurch ein Recycling des Trägers möglich wird.

Durch eine Behandlung mit GA konnte in Gegenwart von Triton X-100 die Aktivität der Lipase LipT1-WT deutlich gesteigert werden. Im Hinblick auf die Nutzbarkeit des Aktivierungseffekts für wirtschaftlich relevante Anwendungen, wäre eine weiterführende Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen der Aktivitätssteigerung durch GA hilfreich. Hier wäre in erster Linie eine Identifizierung der modifizierten Lysinreste im Protein notwendig. Durch eine Abreicherung störender GA-Polymerisationsprodukte, z.B. mittels

IMAC, könnte nach einem Protein-Verdau die Analyse der modifizierten Peptidfragmente mittels MS erleichtert werden. Für Mutante LipT1-KXR wurde keine Aktivitätssteigerung durch GA festgestellt. Hier wäre eine schrittweise Rücksubstitution der Lys→Arg-Austausche denkbar, um die Beteiligung der einzelnen Lysinreste an der Aktivierung zu untersuchen. Weiterhin könnte eine Untersuchung der Stabilität der GA-modifizierten Lipase erfolgen. In diesem Zusammenhang wäre zu überprüfen, inwiefern die aktive Form der Lipase auch bei harschen Bedingungen, wie erhöhter Temperatur oder Zusatz von organischen Lösungsmitteln, durch GA stabilisiert wird. Nicht zuletzt könnte ein Screening nach alternativen Substraten durchgeführt werden, auf deren Umsetzung sich der Aktivierungseffekt anwenden lässt.

Die Untersuchung der Stabilität der erzeugten Immobilisate erfolgte durch wiederholten Einsatz in einer Hydrolyse-Reaktion im Batch-Verfahren. Als alternative Untersuchungsmöglichkeit für die operationelle Stabilität könnten auch kontinuierlich betriebene Systeme (kontinuierlicher Rührkessel oder *packed-bed*-Reaktor) in Betracht gezogen werden. Außerdem wäre eine weiterführende Charakterisierung der Immobilisate z.B. hinsichtlich der Bestimmung der kinetischen Kenndaten denkbar. Ebenso könnte die Anwendung der immobilisierten Lipasen bei der selektiven Umsetzung von Pflanzenölen zu industriell benötigten Synthesebausteinen untersucht werden.

7 Literatur

- Abdel-Fattah, Y. R. und Gaballa, A. A. (2008). "Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli*." *Microbiological Research*, **163**, 13-20.
- Abian, O., Grazú, V., Hermoso, J., González, R., García, J. L., Fernández-Lafuente, R. und Guisán, J. M. (2004). "Stabilization of Penicillin G Acylase from *Escherichia coli*: Site-Directed Mutagenesis of the Protein Surface To Increase Multipoint Covalent Attachment." *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 1249-1251.
- Acharya, P. und Rao, N. M. (2002). "Anomalous Ester Hydrolysis in Mixed Micelles of p-Nitrophenyloleate-Triton X-100 in the Presence of Guanidinium Chloride: Implications in Lipase Assays." *Langmuir*, **18**, 3018-3026.
- Adlercreutz, P. (2013). "Immobilisation and application of lipases in organic media." *Chemical Society Reviews* **42**, 6406-6436.
- Adriano, W. S., Filho, E. H. C., Silva, J. A., Giordano, R. L. C. und Gonçalves, L. R. B. (2005). "Stabilization of Penicillin G Acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan." *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **22**, 529-538.
- Adrio, J. L. und Demain, A. L. (2014). "Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes." *Biomolecules*, **4**, 117-139.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. und Schwab, H. (2014). "Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, 5301-5317.
- Ahn, J.-O., Jang, H.-W., Lee, H.-W., Choi, E.-S., Haam, S.-J., Oh, T.-K. und Jung, J.-K. (2003). "Overexpression of Thermoalkalophilic Lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1 in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **13**, 451-456.
- Al-Mulla, E. A. J., Yunus, W. M. Z. W., Ibrahim, N. A. B. und Rahman, M. Z. A. (2010). "Properties of epoxidized palm oil plasticized polylactic acid." *Journal of Materials Science*, **45**, 1942-1946.
- Ali, M. S., Yun, C., Chor, A., Rahman, R., Basri, M. und Salleh, A. (2012). "Purification and Characterisation of an F16L Mutant of a Thermostable Lipase." *The Protein Journal*, **31**, 229-237.
- Alkan, H., Baysal, Z., Uyar, F. und Dogru, M. (2007). "Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **136**, 183-192.
- Andersen, K. R., Leksa, N. C. und Schwartz, T. U. (2013). "Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **81**, 1857-1861.
- Andualema, B. und Gessesse, A. (2012). "Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review." *Biotechnology*, **11**, 100-118.
- Antonopoulou, I., Varriale, S., Topakas, E., Rova, U., Christakopoulos, P. und Faraco, V. (2016). "Enzymatic synthesis of bioactive compounds with high potential for cosmeceutical application." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**, 6519-6543.
- Aouf, C., Durand, E., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Dubreucq, E., Fulcrand, H. und Villeneuve, P. (2014). "The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds." *Green Chemistry*, **16**, 1740-1754.
- Aravindan, R., Anbumathi, P. und Viruthagiri, T. (2007). "Lipase applications in food industry." *Indian Journal of Biotechnology*, **6**, 141-158.
- Aris, S. N. A. M., Chor, A. L. T., Ali, M. S. M., Basri, M., Salleh, A. B. und Rahman, R. N. Z. R. A. (2014). "Crystallographic Analysis of Ground and Space Thermostable T1 Lipase Crystal Obtained via Counter Diffusion Method Approach." *BioMed Research International*, **2014**: 904381.
- Arpigny, J. L. und Jaeger, K.-E. (1999). "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties." *Biochemical Journal*, **343**, 177-183.

- Ashjari, M., Mohammadi, M. und Badri, R. (2015). "Selective concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil with immobilized/stabilized preparations of *Rhizopus oryzae* lipase." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **122**, 147-155.
- Backer, M. V., Patel, V., Jehning, B. T., Claffey, K. P. und Backer, J. M. (2006). "Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag." *Biomaterials*, **27**, 5452-5458.
- Balcão, V. M., Kemppinen, A., Malcata, F. X. und Kalo, P. J. (1998). "Modification of butterfat by selective hydrolysis and interesterification by lipase: Process and product characterization." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 1347-1358.
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., Rodrigues, R. C. und Fernandez-Lafuente, R. (2014). "Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization." *RSC Advances*, **4**, 1583-1600.
- Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C. und Fernandez-Lafuente, R. (2012). "Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*." *Process Biochemistry*, **47**, 1220-1227.
- Barros, R. J., Wehtje, E. und Adlercreutz, P. (1998). "Mass transfer studies on immobilized α -chymotrypsin biocatalysts prepared by deposition for use in organic medium." *Biotechnology and Bioengineering*, **59**, 364-373.
- Bartolini, M., Cavrini, V. und Andrisano, V. (2004). "Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies." *Journal of Chromatography A*, **1031**, 27-34.
- Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet, J. und Guisán, J. M. (1998). "A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports." *Biotechnology and Bioengineering*, **58**, 486-493.
- BBC-Research. (2014). "Global Markets for Enzymes in Industrial Applications - Report Code: BIO030H." *BCC Research LLC, Wellesley, MA, USA*.
- Bernal, C., Marciello, M., Mesa, M., Sierra, L., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C. und Guisan, J. M. (2013). "Immobilisation and stabilisation of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using a glyoxyl support." *International Dairy Journal*, **28**, 76-82.
- Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Mateo, G. D.-O. C., Fernández-Lafuente, R. und Guisán, J. M. (2006). "Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions." *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 877-882.
- Betts, M. und Russell, R. (2003). "Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions." In: *Bioinformatics for Geneticists* (Barnes, M. und Gray, I., eds.), Wiley.
- Biermann, U., Bornscheuer, U., Meier, M. A. R., Metzger, J. O. und Schäfer, H. J. (2011). "Oils and Fats as Renewable Raw Materials in Chemistry." *Angewandte Chemie International Edition*, **50**, 3854 – 3871.
- Blank, K., Morfill, J. und Gaub, H. E. (2006). "Site-Specific Immobilization of Genetically Engineered Variants of *Candida antarctica* Lipase B." *ChemBioChem*, **7**, 1349 – 1351.
- Bloomer, S., Adlercreutz, P. und Mattiasson, B. (1990). "Triglyceride interesterification by lipases. 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **67**, 519-524.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Bolivar, J. M., López-Gallego, F., Godoy, C., Rodrigues, D. S., Rodrigues, R. C., Batalla, P., Rocha-Martín, J., Mateo, C., Giordano, R. L. C. und Guisán, J. M. (2009). "The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: New strategies of stabilization by multipoint covalent attachment." *Enzyme and Microbial Technology*, **45**, 477-483.

- Boller, T., Meier, C. und Menzler, S. (2002). "EUPERGIT Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis." *Organic Process Research & Development*, **6**, 509-519.
- Boniello, C., Mayr, T., Klimant, I., Koenig, B., Riethorst, W. und Nidetzky, B. (2010). "Intraparticle Concentration Gradients for Substrate and Acidic Product in Immobilized Cephalosporin C Amidase and Their Dependencies on Carrier Characteristics and Reaction Parameters." *Biotechnology and Bioengineering*, **106**, 528-540.
- Bornhorst, J. A. und Falke, J. J. (2000). "Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags." *Methods in Enzymology*, **326**, 245-254.
- Bornscheuer, U., Reif, O.-W., Lausch, R., Freitag, R., Scheper, T., Kollis, F. N. und Menge, U. (1994). "Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization." *Biochimica et Biophysica Acta*, **1201**, 55-60.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brady, D. und Jordaan, J. (2009). "Advances in enzyme immobilisation." *Biotechnology Letters*, **31**, 1639-1650.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L. und Menge, U. (1990). "A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase." *Nature*, **343**, 767-770.
- Branco, R. V., Gutarra, M. L. E., Freire, D. M. G. und Almeida, R. V. (2010). "Immobilization and Characterization of a Recombinant Thermostable Lipase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on Supports with Different Degrees of Hydrophobicity." *Enzyme Research*, **2010**.
- Braun, M., Teichert, O. und Zweck, A. (2006). "Übersichtsstudie - Biokatalyse in der industriellen Produktion." Zukünftige Technologien Consulting (ZTC) der VDI Technologiezentrum GmbH.
- Brenneis, R., Baeck, B. und Kley, G. (2004). "Alcoholysis of waste fats with 2-ethyl-1-hexanol using *Candida antarctica* lipase A in large-scale tests." *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**, 809-814.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Høge-Jensen, B., Patkar, S. A. und Thim, L. (1991). "A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex." *Nature*, **351**, 491-4.
- Buchholz, K., Kasche, V. und Bornscheuer, U. T. (2005). "Biocatalysts and Enzyme Technology." Wiley-VCH Verlag GmbH & KGaA, Weinheim.
- Burdette, R. A. und Quinn, D. M. (1986). "Interfacial Reaction Dynamics and Acyl-enzyme Mechanism for Lipoprotein Lipase-catalyzed Hydrolysis of Lipid p-Nitrophenyl Esters." *The Journal of Biological Chemistry*, **261**, 12016-12021.
- Buthe, A. (2006). "Charakterisierung und rationale Immobilisierung von Lipasen in biphasischen Reaktionssystemen; Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der RWTH Aachen." *Shaker Verlag Aachen*, ISBN: 3-8322-5516-8.
- Camarero, J. A. (2007). "Recent Developments in the Site-Specific Immobilization of Proteins Onto Solid Supports." *Peptide Science*, **90**, 450-458.
- Camarero, J. A., Kwon, Y. und Coleman, M. A. (2004). "Chemoselective Attachment of Biologically Active Proteins to Surfaces by Expressed Protein Ligation and Its Application for "Protein Chip" Fabrication." *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 14730-14731.
- Cantone, S., Ferrario, V., Corici, L., Ebert, C., Fattor, D., Spizzoa, P. und Gardossi, L. (2013). "Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods." *Chemical Society Reviews*, **42**, 6262-6276.

- Cao, L. (2006). "Covalent Enzyme Immobilization." In: *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 169-316.
- Carrasco-Lopez, C., Godoy, C., Rivas, B. d. I., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J. M., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Martínez-Ripoll, M. und Hermoso, J. A. (2009). "Activation of Bacterial Thermoalkalophilic Lipases Is Spurred by Dramatic Structural Rearrangements." *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 4365-4372.
- Carvalho, P. d. O., Campos, P. R. B., Noffs, M. D. A., Fregolente, P. B. L. und Fregolente, L. V. (2009). "Enzymatic hydrolysis of salmon oil by native lipases: optimization of process parameters." *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **20**, 117-124.
- Carvalho, P. d. O., Contesini, F. J., Bizaco, R., Calafatti, S. A. und Macedo, G. A. (2006). "Optimization of enantioselective resolution of racemic ibuprofen by native lipase from *Aspergillus niger*." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **33**, 713-718.
- Cassimjee, K. E., Kourist, R., Lindberg, D., Wittrup Larsen, M., Thanh, N. H., Widersten, M., Bornscheuer, U. T. und Berglund, P. (2011). "One-step enzyme extraction and immobilization for biocatalysis applications." *Biotechnology Journal*, **6**, 463-469.
- Castro-Ochoa, L. D., Rodriguez-Gomez, C., Valerio-Alfaro, G. und Ros, R. O. (2005). "Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11." *Enzyme and Microbial Technology*, **37**, 648-654.
- Cecchini, D. A., Serra, I., Ubiali, D., Terreni, M. und Albertini, A. M. (2007). "New active site oriented glyoxyl-agarose derivatives of Escherichia colipenicillin G acylase." *BMC Biotechnology*, **7**, 1-11.
- Cha, T., Guo, A., Jun, Y., Pei, D. und Zhu, X.-Y. (2004). "Immobilization of oriented protein molecules on poly(ethylene glycol)-coated Si(111)." *Proteomics*, **4**, 1965-1976.
- Chalker, J. M., Bernardes, G. J. L., Lin, Y. A. und Davis, B. G. (2009). "Chemical Modification of Proteins at Cysteine: Opportunities in Chemistry and Biology." *Chemistry – An Asian Journal*, **4**, 630-640.
- Chaplin, M. F. und Bucke, C. (1990). "Enzyme Technology." Cambridge University Press.
- Charlton, A. und Zachariou, M. (2008). "Immobilized metal ion affinity chromatography of histidine-tagged fusion proteins." *Methods Mol Biol*, **421**, 137-49.
- Chen, B., Zhang, H., Cheong, L.-Z., Tan, T. und Xu, X. (2012). "Enzymatic Production of ABA-Type Structured Lipids Containing Omega-3 and Medium-Chain Fatty Acids: Effects of Different Acyl Donors on the Acyl Migration Rate." *Food and Bioprocess Technology*, **5**, 541-547.
- Cheong, K., Leow, T., Rahman, R., Basri, M., Rahman, M. und Salleh, A. (2011). "Reductive Alkylation Causes the Formation of a Molten Globule-Like Intermediate Structure in *Geobacillus zalihae* Strain T1 Thermostable Lipase." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **164**, 362-375.
- Cherubini, F. (2010). "The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals." *Energy Conversion and Management*, **51**, 1412-1421.
- Chmiel, H. (2006). "Bioprozesstechnik." Elsevier GmbH, München.
- Choi, W.-C., Kim, M. H., Ro, H.-S., Ryu, S. R., Oh, T.-K. und Lee, J.-K. (2005). "Zinc in lipase L1 from *Geobacillus stearothermophilus* L1 and structural implications on thermal stability." *FEBS Letters*, **579**, 3461-3466.
- Choudhary, R. B., Jana, A. K. und Jha, M. K. (2004). "Enzyme Technology Applications in Leather Processing." *Indian Journal of Chemical Technology*, **11**, 659-671.
- Cleland, W. W. (1964). "Dithiothreitol, A New Protective Reagent for SH Groups." *Biochemistry*, **3**, 480-2.
- Cowan, D. A. und Fernandez-Lafuente, R. (2011). "Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization." *Enzyme and Microbial Technology*, **49**, 326-346.
- Cruz, J. C., Pfromm, P. H., Tomich, J. M. und Rezac, M. E. (2010). "Conformational changes and catalytic competency of hydrolases adsorbing on fumed silica nanoparticles: I. Tertiary structure." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **79**, 97-104.
- Daiha, K. d. G., Angeli, R., Oliveira, S. D. d. und Almeida, R. V. (2015). "Are Lipases Still Important Biocatalysts? A Study of Scientific Publications and Patents for

- Technological Forecasting.” *PLoS ONE*, **10**, e0131624. doi:10.1371/journal.pone.0131624.
- Dartois, V., Baulard, A., Schanck, K. und Colson, C. (1992). “Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168.” *Biochimica et Biophysica Acta*, **1131**, 253-260.
- de Fuentes, I. E., Viseras, C. A., Ubiali, D., Terreni, M. und Alcantara, A. R. (2001). “Different phyllosilicates as supports for lipase immobilisation.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **11**, 657-663.
- Deng, L., Tan, T., Wang, F. und Xu, X. (2003). “Enzymatic production of fatty acid alkyl esters with a lipase preparation from *Candida* sp. 99-125.” *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**, 727-734.
- Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M. und Derewenda, Z. S. (1992). “Catalysis at the Interface: The Anatomy of a Conformational Change in a Triglyceride Lipase.” *Biochemistry*, **31**, 1532-1541.
- DGF. (2011). “Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V.: Fettsäurezusammensetzung wichtiger pflanzlicher und tierischer Speisefette und -öle.” <http://www.dgffett.de/material/fszus.php>.
- DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A. J. und Bohlmann, G. (2013). “Industrial use of immobilized enzymes.” *Chemical Society Reviews*, **42**, 6437-6474.
- Ebrahimpour, A., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M. und Salleh, A. B. (2011). “High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM.” *Bioresource Technology*, **102**, 6972-6981.
- Eiteman, M. A. und Altman, E. (2006). “Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations.” *TRENDS in Biotechnology*, **24**, 531-536.
- El-Thaher, N., Mekonnen, T., Mussone, P., Bressler, D. und Choi, P. (2013). “Effects of Electrolytes, Water, and Temperature on Cross-Linking of Glutaraldehyde and Hydrolyzed Specified Risk Material.” *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **52**, 4987-4993.
- Engasser, J.-M. und Horvath, C. (1973). “Effect of Internal Diffusion in Heterogeneous Enzyme Systems: Evaluation of True Kinetic Parameters and Substrate Diffusivity.” *Journal of theoretical Biology*, **42**, 137-155.
- Epstein, C. J. und Anfinsen, C. B. (1962). “The Reversible Reduction of Disulfide Bonds in Trypsin and Ribonuclease Coupled to Carboxymethyl Cellulose.” *The Journal of Biological Chemistry*, **237**, 2175-2179.
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Rodriguez, V. und Guisan, J. M. (1995a). “Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents.” *Enzyme and Microbial Technology*, **17**, 517-523.
- Fernandez-Lafuente, R., Wood, A. N. P. und Cowan, D. A. (1995b). “Reducing enzyme conformational flexibility by multi-point covalent immobilisation.” *Biotechnology Techniques*, **9**, 1-6.
- Fernandez-Lorente, G., Cabrera, Z., Godoy, C., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J. M. und Guisan, J. M. (2008a). “Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties.” *Process Biochemistry*, **43**, 1061-1067.
- Fernandez-Lorente, G., Godoy, C. A., Mendes, A. A., Lopez-Gallego, F., Grazu, V., de las Rivas, B., Palomo, J. M., Hermoso, J., Fernandez-Lafuente, R. und Guisan, J. M. (2008b). “Solid-Phase Chemical Amination of a Lipase from *Bacillus thermocatenuatus* To Improve Its Stabilization via Covalent Immobilization on Highly Activated Glyoxyl-Agarose.” *Biomacromolecules*, **9**, 2553-2561.
- Fernandez-Lorente, G., Palomo, J. M., Cabrera, Z., Fernandez-Lafuente, R. und Guisán, J. M. (2007). “Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium.” *Biotechnology and Bioengineering*, **97**, 242-250.
- Fernández-Lorente, G., Palomo, J. M., Mateo, C., Munilla, R., Ortiz, C., Cabrera, Z., Guisán, J. M. und Fernández-Lafuente, R. (2006). “Glutaraldehyde Cross-Linking of Lipases

- Adsorbed on Aminated Supports in the Presence of Detergents Leads to Improved Performance." *Biomacromolecules*, **7**, 2610-2615.
- Filice, M., Marciello, M., Betancor, L., Carrascosa, A. V., Guisan, J. M. und Fernandez-Lorente, G. (2011a). "Hydrolysis of fish oil by hyperactivated *Rhizomucor miehei* lipase immobilized by multipoint anion exchange." *Biotechnology Progress*, **27**, 961-968.
- Filice, M., Romero, O., Guisan, J. M. und Palomo, J. M. (2011b). "trans,trans-2,4-Hexadiene incorporation on enzymes for site-specific immobilization and fluorescent labeling." *Organic & Biomolecular Chemistry*, **9**, 5535-5540.
- Fluka. (2012). "Herstellerangaben CPC- Silica Carrier silane coated."
- FNR. (2012). "Roadmap Bioraffinerien im Rahmen der Aktionspläne der Bundesregierung zur stofflichen und energetischen Nutzung nachwachsender Rohstoffe." *Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR)*.
- Folk, J. E. und Cole, P. W. (1966). "Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity." *Journal of Biological Chemistry*, **241**, 5518-5525.
- Fontana, A., Spolaore, B., Mero, A. und Veronese, F. M. (2008). "Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase." *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**, 13-28.
- Freedonia. (2014). "World Enzymes - Demand and Sales Forecasts, Market Share, Market Size, Market Leaders Study #3104." *The Freedonia Group, Cleveland, OH, USA*.
- Friehs, K. (2004). "Plasmid Copy Number and Plasmid Stability." *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, **86**, 47-82.
- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. und Rodrigues, R. C. (2011). "Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance." *Advanced Synthesis & Catalysis*, **353**, 2885-2904.
- Garcia-Ochoa, F. und Gomez, E. (2009). "Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview." *Biotechnology Advances*, **27**, 153-176.
- GE-Healthcare. (2009). "Datenblatt EAH-Sepharose."
- GE-Healthcare. (2013). "Datenblatt Streamline Chelating."
- Gentz, R. und Bujard, H. (1985). "Promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase selected by function: highly efficient promoters from bacteriophage T5." *J. Bacteriol.*, **164**, 70-77.
- Gerber, S., Kirchhof, K., Kressler, J., Schmelzer, C. E. H., Scholz, C., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2008). "Cloning, expression, purification, and characterization of a designer protein with repetitive sequences." *Protein Expression and Purification*, **59**, 203-214.
- Ghanem, A. (2007). "Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds." *Tetrahedron*, **63**, 1721-1754.
- Gnoth, S., Jenzsch, M., Simutis, R. und Lübbert, A. (2007). "Control of cultivation processes for recombinant protein production: a review." *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **31**, 21-39.
- Godoy, C. A., de las Rivas, B., Filice, M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. und Palomo, J. M. (2010). "Enhanced activity of an immobilized lipase promoted by site-directed chemical modification with polymers." *Process Biochemistry*, **45**, 534-541.
- Godoy, C. A., Fernandez-Lorente, G., de las Rivas, B., Filice, M., Guisan, J. M. und Palomo, J. M. (2011a). "Medium engineering on modified *Geobacillus thermocatenulatus* lipase to prepare highly active catalysts." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **70**, 144-148.
- Godoy, C. A., Rivas, B. d. I., Grazu, V., Montes, T., Guisan, J. M. und Lopez-Gallego, F. (2011b). "Glyoxyl-Disulfide Agarose: A Tailor-Made Support for Site-Directed Rigidification of Proteins." *Biomacromolecules*, **12**, 1800-1809.
- Godoy, C. A., Romero, O., de las Rivas, B., Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. und Palomo, J. M. (2013). "Changes on enantioselectivity of a genetically modified

- thermophilic lipase by site-directed oriented immobilization." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **87**, 121-127.
- Gómez, J. L., Bódalo, A., Gómez, E., Bastida, J., Hidalgo, A. M. und Gómez, M. (2006). "Immobilization of peroxidases on glass beads: An improved alternative for phenol removal." *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 1016-1022.
- Gopinath, S. und Sugunan, S. (2004). "Leaching studies over immobilized α -amylase. importance of the nature of enzyme attachment." *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, **83**, 79-83.
- Gotor-Fernández, V., Brieva, R. und Gotor, V. (2006). "Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **40**, 111-120.
- Grazu, V., Abian, O., Mateo, C., Batista-Viera, F., Fernandez-Lafuente, R. und Guisan, J. M. (2003). "Novel Bifunctional Epoxy/Thiol-Reactive Support to Immobilize Thiol Containing Proteins by the Epoxy Chemistry." *Biomacromolecules*, **4**, 1495-1501.
- Grazú, V., Abian, O., Mateo, C., Batista-Viera, F., Fernández-Lafuente, R. und Guisán, J. M. (2005). "Stabilization of enzymes by multipoint immobilization of thiolated proteins on new epoxy-thiol supports." *Biotechnology and Bioengineering*, **90**, 597-605.
- Grazu, V., Lopez-Gallego, F., Montes, T., Abian, O., Gonzalez, R., Hermoso, J. A., Garcia, J. L., Mateo, C. und Guisan, J. M. (2010). "Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*." *Process Biochemistry*, **45**, 390-398.
- Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., Heidelberg, T. und Chisti, Y. (2011). "Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters." *Process Biochemistry*, **46**, 2079-2090.
- Guncheva, M. und Zhiryakova, D. (2011). "Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **68**, 1-21.
- Gundersen, M., Keillor, J. und Pelletier, J. (2013). "Microbial transglutaminase displays broad acyl-acceptor substrate specificity." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-12.
- Gupta, N., Rath, P. und Gupta, R. (2002). "Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases." *Analytical Biochemistry*, **311** 98-99.
- Gutiérrez, A., del Río, J. C. und Martínez, A. T. (2009). "Microbial and enzymatic control of pitch in the pulp and paper industry." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **82**, 1005-1018.
- Ha, S. H., Lee, S. H., Dang, D. T., Kwon, M. S., Chang, W.-J., Yu, Y. J., Byun, I. S. und Koo, Y.-M. (2008). "Enhanced stability of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids." *Korean Journal of Chemical Engineering*, **25**, 291-294.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557-580.
- Hanefeld, U., Gardossi, L. und Magner, E. (2009). "Understanding enzyme immobilisation." *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 453-468.
- Hansen, E. H. und Mikkelsen, H. S. (1991). "Enzyme-Immobilization by the Glutardialdehyde Procedure. An Investigation of the Effects of Reducing the Schiff-Bases Generated, as Based on Studying the Immobilization of Glucose Oxidase to Silanized Controlled Pore Glass." *Analytical Letters*, **24**, 1419-1430.
- Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G. M. und Laibinis, P. E. (1998). "Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption." *Journal of Physical Chemistry B*, **102**, 426-436.
- Hasan, F., Shah, A. A. und Hameed, A. (2006). "Industrial Applications of Microbial Lipases." *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 235-251.
- Hasan, F., Shah, A. A., Javed, S. und Hameed, A. (2010). "Enzymes used in detergents: Lipases." *African Journal of Biotechnology*, **9**, 4836-4844.
- Heinz, A., Jung, M. C., Duca, L., Sippl, W., Taddese, S., Ihling, C., Rusciani, A., Jahreis, G., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2010). "Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases - cleavage site specificities and release of matrikines." *FEBS Journal*, **277**, 1939-1956.

- Helistö, P. und Korpela, T. (1998). "Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method." *Enzyme and Microbial Technology*, **23**, 113-117.
- Hellmuth, K., Korz, D. J., Sanders, E. A. und Deckwer, W.-D. (1994). "Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1." *Journal of Biotechnology*, **32**, 289-298.
- Hemdan, E. S., Zhao, Y. J., Sulkowski, E. und Porath, J. (1989). "Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography." *PNAS*, **86**, 1811-1815.
- Heppner, R. (2011). "Untersuchungen zur rekombinanten Produktion einer *Bacillus subtilis* Lipase in *Escherichia coli* und zu deren Reinigung," Zentrum für Ingenieurwissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Hermanson, G. T. (2010). "Bioconjugate Techniques." *Academic Press*, **2nd Edition**.
- Hernandez, K. und Fernandez-Lafuente, R. (2011). "Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance." *Enzyme and Microbial Technology*, **48**, 107-122.
- Hillger, F., Herr, G., Rudolph, R. und Schwarz, E. (2005). "Biophysical Comparison of BMP-2, ProBMP-2, and the Free Pro-peptide Reveals Stabilization of the Pro-peptide by the Mature Growth Factor." *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 14974-14980.
- Hills, G. (2003). "Industrial use of lipases to produce fatty acid esters." *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**, 601-607.
- Holtz, B., Wang, Y., Zhu, X.-Y. und Guo, A. (2007). "Denaturing and refolding of protein molecules on surfaces." *Proteomics*, **7**, 1771-1774.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F. und Stevanato, R. (2013). "Enzyme immobilization: an update." *Journal of Chemical Biology*, **6**, 185-205.
- Hong, G.-P. und Xiong, Y. L. (2012). "Microbial transglutaminase-induced structural and rheological changes of cationic and anionic myofibrillar proteins." *Meat Science*, **91**, 36-42.
- Hoshino, T., Yamane, T. und Shimizu, S. (1990). "Selective Hydrolysis of Fish Oil by Lipase to Concentrate n-3 Polyunsaturated Fatty Acidst." *Agricultural and Biological Chemistry* **54**, 1459-1467.
- Hu, B., Pan, J., Yu, H.-L., Liu, J.-W. und Xu, J.-H. (2009). "Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate." *Process Biochemistry*, **44**, 1019-1024.
- Huang, W., Wang, J., Bhattacharyya, D. und Bachas, L. G. (1997). "Improving the Activity of Immobilized Subtilisin by Site-Specific Attachment to Surfaces." *Analytical Chemistry*, **69**, 4601-4607.
- Iwasaki, Y. und Yamane, T. (2000). "Enzymatic synthesis of structured lipids." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **10**, 129-140.
- Iyer, P. V. und Ananthanarayan, L. (2008). "Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment." *Process Biochemistry*, **43**, 1019-1032.
- Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W. und Reetz, M. T. (1999). "Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases." *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**, 315-51.
- Jaeger, K.-E. und Eggert, T. (2002). "Lipases for biotechnology." *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, **13**, 390-397.
- Jaeger, K.-E. und Reetz, M. T. (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology." *Trends in Biotechnology*, **16**, 396-403.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Koch, H. B., Ferrato, F. und Dijkstra, B. W. (1993). "Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*." *FEBS Letters*, **332**, 143-149.
- Jana, S. und Deb, J. K. (2005). "Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol*, **67**, 289-298.

- Janolino, V. G. und Swaisgood, H. E. (1992). "A Spectrophotometric Assay for Solid Phase Primary Amino Groups." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **36**, 81-85.
- Janson, J.-C. (2012). "Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications." John Wiley & Sons, Methods of Biochemical Analysis.
- Jenzsch, M., Gnoth, S., Beck, M., Kleinschmidt, M., Simutis, R. und Lübbert, A. (2006). "Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes." *Journal of Biotechnology*, **127**, 84-94.
- Jeon, S. I., Lee, J. H., Andrade, J. D. und Gennes, P. G. D. (1991). "Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory." *Journal of Colloid and Interface Science*, **142**, 149-158.
- Jeong, S.-T., Kim, H.-K., Kim, S.-J., Chi, S.-W., Pan, J.-G., Oh, T.-K. und Ryu, S.-E. (2002). "Novel Zinc-binding Center and a Temperature Switch in the *Bacillus stearothermophilus* L1 Lipase." *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 17041-17047.
- Jiang, Y., Zhou, X. und Chen, Z. (2010). "Cloning, expression, and biochemical characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus stearothermophilus* JC." *World J Microbiol Biotechnol*, **26**, 747-751.
- Jin, Z., Ntwali, J., Han, S.-Y., Zheng, S.-P. und Lin, Y. (2012). "Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor." *Journal of Biotechnology*, **159**, 108-114.
- Jones, S. und Thornton, J. M. (1995). "Protein-Protein Interactions: A Review of Protein Dimer Structures." *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **63**, 31-65.
- Jooyandeh, H., Amarjeet, K. und Minhas, K. S. (2009). "Lipases in dairy industry: A review." *Journal of Food Science and Technology*, **46**, 181-189.
- Junker, B. H. (2004). "Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **97**, 347-364.
- Kamal, M. Z., Ahmad, S., Molugu, T. R., Vijayalakshmi, A., Deshmukh, M. V., Sankaranarayanan, R. und Rao, N. M. (2011). "In Vitro Evolved Non-Aggregating and Thermostable Lipase: Structural and Thermodynamic Investigation." *Journal of Molecular Biology*, **413**, 726-741.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R. und Derekova, A. (2003). "Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **22**, 307-313.
- Kamiya, N., Doi, S., Tanaka, Y., Ichinose, H. und Goto, M. (2007). "Functional immobilization of recombinant alkaline phosphatases bearing a glutamyl donor substrate peptide of microbial transglutaminase." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **104**, 195-199.
- Kamiya, N., Doi, S., Tominaga, J., Ichinose, H. und Goto, M. (2005). "Transglutaminase-mediated protein immobilization to casein nanolayers created on a plastic surface." *Biomacromolecules*, **6**, 35-8.
- Kamiya, N., Takazawa, T., Tanaka, T., Ueda, H. und Nagamune, T. (2003a). "Site-specific cross-linking of functional proteins by transglutamination." *Enzyme and Microbial Technology*, **33**, 492-496.
- Kamiya, N., Tanaka, T., Suzuki, T., Takazawa, T., Takeda, S., Watanabe, K. und Nagamune, T. (2003b). "S-peptide as a potent peptidyl linker for protein cross-linking by microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*." *Bioconjug Chem*, **14**, 351-7.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K.-i., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. und Suzuki, E.-i. (2002). "Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*." *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 44252-44260.
- Katchalski-Katzir, E. und Kraemer, D. M. (2000). "Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **10**, 157-176.
- Kaur, G., Singh, A., Sharma, R., Sharma, V., Verma, S. und Sharma, P. K. (2016). "Cloning, expression, purification and characterization of lipase from *Bacillus licheniformis*, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India." *3 Biotech*, **6**, 1-10.

- Kiesel, I., Paulus, M., Nase, J., Tiemeyer, S., Sternemann, C., Ruster, K., Wirkert, F. J., Mende, K., Büning, T. und Tolan, M. (2014). "Temperature-Driven Adsorption and Desorption of Proteins at Solid-Liquid Interfaces." *Langmuir*, **30**, 2077-2083.
- Kiick, K. L., Saxon, E., Tirrell, D. A. und Bertozzi, C. R. (2002). "Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation." *PNAS*, **99**, 19-24.
- Kim, H.-K., Park, S.-Y., Lee, J.-K. und Oh, T.-K. (1998). "Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **62**, 66-71.
- Kim, H.-K., Sung, M.-H., Kim, H.-M. und Oh, T.-K. (1994). "Occurrence of Thermostable Lipase in Thermophilic *Bacillus* Sp. Strain 398." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **58**, 961-962.
- Kim, H., Kwon, H. S., Ahn, J., Lee, C. H. und Ahn, I. S. (2009). "Evaluation of a silica-coated magnetic nanoparticle for the immobilization of a His-tagged lipase." *Biocatalysis and Biotransformation*, **27**, 246-253.
- Kim, M.-H., Kim, H.-K., Lee, J.-K., Park, S.-Y. und Oh, T.-K. (2000). "Thermostable lipase of *Bacillus stearothermophilus*: high-level production, purification, and calcium-dependent thermostability." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **64**, 280-286.
- Kim, T.-H., Jung, J.-K., Kwak, S.-S., Nam, S.-W., Chun, M.-J. und Park, Y.-H. (2002). "Heterologous expression and secretion of sweet potato peroxidase isoenzyme A1 in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*." *Biotechnology Letters*, **24**, 279-286.
- Klaas, M. R. g. und Warwel, S. (1997). "Lipase-catalyzed preparation of peroxy acids and their use for epoxidation." *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **117**, 311-319.
- Knezevic, Z., Milosavic, N., Bezbradica, D., Jakovljevic, Z. und Prodanovic, R. (2006). "Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment." *Biochemical Engineering Journal*, **30**, 269-278.
- Kobayashi, S. (2010). "Lipase-catalyzed polyester synthesis - A green polymer chemistry." *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences*, **86**, 338-365.
- Kourist, R., Hollmann, F. und Nguyen, G. S. (2014). "Lipases as Sustainable Biocatalysts for the Sustainable Industrial Production of Fine Chemicals and Cosmetics." *JSM Biotechnology & Biomedical Engineering*, **2**, 1029.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680-685.
- Lang, K. und Chin, J. W. (2014). "Cellular Incorporation of Unnatural Amino Acids and Bioorthogonal Labeling of Proteins." *Chemical Reviews*, **114**, 4764-4806.
- Lanxess. (2011). "Datenblatt Lewatit VP OC 1065."
- Larios, A., García, H. S., Oliart, R. M. und Valerio-Alfaro, G. (2004). "Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**, 373-376.
- Lee, J.-H., Song, C., Kim, D.-H., Park, I.-H., Lee, S.-G., Lee, Y.-S. und Kim, B.-G. (2013). "Glutamine (Q)-peptide screening for transglutaminase reaction using mRNA display." *Biotechnology and Bioengineering*, **110**, 353-362.
- Lee, S. Y. (1996). "High cell-density culture of *Escherichia coli*." *Trends in Biotechnology*, **14**, 98-105.
- Leow, T. C., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M. und Salleh, A. B. (2004). "High level expression of thermostable lipase from *Geobacillus* sp. Strain T1." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **68**, 96-103.
- Leow, T. C., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M. und Salleh, A. B. (2007). "A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1." *Extremophiles*, **11**, 527-535.
- Lesuisse, E., Schank, K. und Colson, C. (1993). "Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme." *Eur. J. Biochem.*, **216**, 155-160.

- Lima, V. M. G., Krieger, N., Mitchell, D. A., Baratti, J. C., Filippis, I. d. und Fontana, J. D. (2004). "Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **31**, 53-61.
- Lin-Cereghino, G. P., Lin-Cereghino, J., Ilgen, C. und Cregg, J. M. (2002). "Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*." *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 329-332.
- Lin, Y.-C. (2013). "Catalytic valorization of glycerol to hydrogen and syngas." *International Journal of Hydrogen Energy*, **38**, 2678-2700.
- Link, A. J., Vink, M. K. S. und Tirrell, D. A. (2004). "Presentation and Detection of Azide Functionality in Bacterial Cell Surface Proteins." *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 10598-10602.
- Lins, L., Thomas, A. und Brasseur, R. (2003). "Analysis of accessible surface of residues in proteins." *Protein Science*, **12**, 1406-1417.
- Liou, Y.-C., Marangoni, A. G. und Yada, R. Y. (1998). "Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase." *Food Research International*, **31**, 243-248.
- Litantra, R., Lobionda, S., Yim, J. H. und Kim, H. K. (2013). "Expression and Biochemical Characterization of Cold-Adapted Lipases from Antarctic *Bacillus pumilus* Strains." *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**.
- López-Gallego, F., Abian, O. und Guisán, J. M. (2012). "Altering the Interfacial Activation Mechanism of a Lipase by Solid-Phase Selective Chemical Modification." *Biochemistry*, **51**, 7028-7036.
- López-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Guisán, J. M. und Fernández-Lafuente, R. (2004). "Optimization of an industrial biocatalyst of glutaryl acylase: Stabilization of the enzyme by multipoint covalent attachment onto new amino-epoxy Sepabeads." *Journal of Biotechnology*, **111**, 219-227.
- López-Gallego, F., Betancor, L., Mateo, C., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisán, J. M. und Fernández-Lafuente, R. (2005a). "Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports." *Journal of Biotechnology*, **119**, 70-75.
- López-Gallego, F., Montes, T., Fuentes, M., Alonso, N., Grazu, V., Betancor, L., Guisán, J. M. und Fernández-Lafuente, R. (2005b). "Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports." *Journal of Biotechnology*, **116**, 1-10.
- Losen, M., Frölich, B., Pohl, M. und Büchs, J. (2004). "Effect of Oxygen Limitation and Medium Composition on *Escherichia coli* Fermentation in Shake-Flask Cultures." *Biotechnology Progress*, **20**, 1062-1068.
- Ma, J., Zhang, Z., Wang, B., Kong, X., Wang, Y., Cao, S. und Feng, Y. (2006). "Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*." *Protein Expression and Purification*, **45**, 22-29.
- Madan, B. und Mishra, P. (2009). "Overexpression, Purification and Characterization of Organic Solvent Stable Lipase from *Bacillus licheniformis* RSP-09." *J Mol Microbiol Biotechnol*, **17**, 118-123.
- Mahapatra, P., Kumari, A., Kumar Garlapati, V., Banerjee, R. und Nag, A. (2009). "Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **60**, 57-63.
- Malešević, M., Migge, A., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2015). "A Fluorescence-Based Array Screen for Transglutaminase Substrates." *ChemBioChem*, **16**, 1169-1174.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Burg, B. V. d., Eijsink, V. G. H. und Ulbrich-Hofmann, R. (1999). "Probing the Unfolding Region in a Thermolysin-like Protease by Site-Specific Immobilization." *Biochemistry*, **38**, 8240-8245.
- Margel, S. und Rembaum, A. (1980). "Synthesis and Characterization of Poly(glutaraldehyde). A Potential Reagent for Protein Immobilization and Cell Separation." *Macromolecules*, **13**, 19-24.
- Martin, J. C., Bello, J. F., Burguillo, F. J. und Roig, M. G. (1994). "Kinetic behaviour and reaction mechanism of the hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in mixed micelles with

- Triton X-100 catalyzed by lipase from *Candida rugosa*." *Journal of Molecular Catalysis*, **93**, 37-52.
- Martinelle, M., Holmquist, M. und Hult, K. (1995). "On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase." *Biochimica et Biophysica Acta*, **1258**, 272-276.
- Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2008). "Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat sensitive variants." *Journal of Biotechnology*, **136**, 156-162.
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pedroche, J., Fernández-Lafuente, R. und Guisan, J. M. (2002). "Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment." *Biotechnology Progress*, **18**, 629-634.
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pessela, B. C. C., Grazu, V., Guisan, J. M. und Fernandez-Lafuente, R. (2006). "Immobilization-Stabilization of Enzymes by Multipoint Covalent Attachment on Supports Activated With Epoxy Groups." In: *Immobilization of Enzymes and Cells* (Guisan, J. M., ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 47-55.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. und Guisan, J. M. (2000a). "Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment." *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 509-515.
- Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abian, O., Fernández-Lafuente, R. und Guisán, J. M. (2000b). "Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage." *Biomacromolecules*, **1**, 739-745.
- Mateo, C., Grazu, V., Palomo, J. M., Lopez-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R. und Guisan, J. M. (2007a). "Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports." *Nature Protocols*, **2**, 1022-1033.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. und Fernandez-Lafuente, R. (2007b). "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques." *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1451-1463.
- Mateo, C., Torres, R., Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Hidalgo, A., López-Gallego, F., Abian, O., Palomo, J. M., Betancor, L., Pessela, B. C. C., Guisan, J. M. und Fernández-Lafuente, R. (2003). "Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method." *Biomacromolecules*, **4**, 772-777.
- Matsumura, H., Yamamoto, T., Leow, T. C., Mori, T., Salleh, A. B., Basri, M., Inoue, T., Kai, Y. und Rahman, R. N. Z. R. A. (2008). "Novel cation-pi interaction revealed by crystal structure of thermoalkalophilic lipase." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **70**, 592 - 598.
- Matsumura, Y., Chanyongvorakul, Y., Kumazawa, Y., Ohtsuka, T. und Mori, T. (1996). "Enhanced susceptibility to transglutaminase reaction of alpha-lactalbumin in the molten globule state." *Biochim Biophys Acta*, **1292**, 69-76.
- Meier, M. A. R., Metzger, J. O. und Schubert, U. S. (2007). "Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science." *Chemical Society Reviews* **36**, 1788-1802.
- Ménard, A., Huang, Y., Karam, P., Cosa, G. und Auclair, K. (2012). "Site-Specific Fluorescent Labeling and Oriented Immobilization of a Triple Mutant of CYP3A4 via C64." *Bioconjugate Chemistry*, **23**, 826-836.
- Metzger, J. O. (2009). "Fats and oils as renewable feedstock for chemistry." *European Journal of Lipid Science and Technology*, **111**, 865-876.
- Metzger, J. O. und Bornscheuer, U. (2006). "Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **71**, 13-22.
- Meuzelaar, H., Vreede, J. und Woutersen, S. (2016). "Influence of Glu/Arg, Asp/Arg, and Glu/Lys Salt Bridges on α -Helical Stability and Folding Kinetics." *Biophysical Journal*, **110**, 2328-2341.
- Micro-Surfaces. (2013). "Persönliche Mitteilung."

- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J. und Waldron, K. C. (2004). "Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking." *BioTechniques*, **37**, 790-802.
- Modregger, J. (2010). "Bereitstellung der Plasmide pJExpress-X zur Expression der Lipasen LipL1, LipA und LipT1-WT sowie LipT1-Varianten." *Eucondis Bioscience*.
- Mohamed, I. O. (2012). "Lipase-Catalyzed Synthesis of Cocoa Butter Equivalent from Palm Olein and Saturated Fatty Acid Distillate from Palm Oil Physical Refinery." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **168**, 1405-1415.
- Mori, Y., Goto, M. und Kamiya, N. (2011). "Transglutaminase-mediated internal protein labeling with a designed peptide loop." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **410**, 829-833.
- Moriyama, K., Sung, K., Goto, M. und Kamiya, N. (2011). "Immobilization of alkaline phosphatase on magnetic particles by site-specific and covalent cross-linking catalyzed by microbial transglutaminase." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **111**, 650-653.
- Mormeneo, M., Andrés, I., Bofill, C., Díaz, P. und Zueco, J. (2008). "Efficient secretion of *Bacillus subtilis* lipase A in *Saccharomyces cerevisiae* by translational fusion to the Pir4 cell wall protein." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **80**, 437-445.
- Mrabet, N. T., Broeck, A. V. d., brande, I. V. d., Stanssens, P., Laroche, Y., Lambeir, A.-M., Matthijssens, G., Jenkins, J., Chiadmi, M., Tilbeurgh, H. v., Rey, F., Janin, J., Quax, W. J., Lasters, I., Maeyer, M. D. und Wodak, S. J. (1992). "Arginine Residues as Stabilizing Elements in Proteins." *Biochemistry*, **31**, 2239-2253.
- Nagarajan, S. (2012). "New Tools for Exploring "Old Friends—Microbial Lipases". " *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **168**, 1163-1196.
- Nakanishi, K., Sakiyama, T., Kumada, Y., Imamura, K. und Imanaka, H. (2008). "Recent Advances in Controlled Immobilization of Proteins onto the Surface of the Solid Substrate and Its Possible Application to Proteomics." *Current Proteomics*, **5**, 161-175.
- Nieuwenhuizen, W. F., Dekker, H. L., Koning, L. J. d., Gröneveld, T., Koster, C. G. d. und Jong, G. A. H. d. (2003). "Modification of Glutamine and Lysine Residues in Holo and Apo r-Lactalbumin with Microbial Transglutaminase." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7132-7139.
- Norjannah, B., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Juan, J. C. und Chong, W. T. (2016). "Enzymatic transesterification for biodiesel production: a comprehensive review." *RSC Advances*, **6**, 60034-60055.
- Nthangeni, M. B., Patterton, H.-G., Tonder, A. v., Vergeer, W. P. und Litthauer, D. (2001). "Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases." *Enzyme and Microbial Technology*, **28**, 705-712.
- Ohtsuka, T., Ota, M., Nio, N. und Motoki, M. (2000a). "Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors." *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**, 2608-13.
- Ohtsuka, T., Sawa, A., Kawabata, R., Nio, N. und Motoki, M. (2000b). "Substrate Specificities of Microbial Transglutaminase for Primary Amines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 6230-6233.
- Oschmann, J. (2008). "Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung des humanen Parathormon-Rezeptors," Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Oteng-Pabi, S. K., Pardin, C., Stoica, M. und Keillor, J. W. (2014). "Site-specific protein labelling and immobilization mediated by microbial transglutaminase." *Chemical Communications*, **50**, 6604-6606.
- Ovsejevi, K., Manta, C. und Batista-Viera, F. (2013). "Reversible Covalent Immobilization of Enzymes via Disulfide Bonds." In: *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition* (Guisan, M. J., ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 89-116.
- Pagliaro, M., Ciriminna, R., Kimura, H., Rossi, M. und Della Pina, C. (2007). "From Glycerol to Value-Added Products." *Angewandte Chemie International Edition*, **46**, 4434-4440.

- Palomo, J. M., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Guisan, J. M. und Fernández-Lafuente, R. (2003a). "General Trend of Lipase to Self-Assemble Giving Bimolecular Aggregates Greatly Modifies the Enzyme Functionality." *Biomacromolecules*, **4**, 1-6.
- Palomo, J. M., Muñoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R. und Guisán, J. M. (2002). "Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **19–20**, 279-286.
- Palomo, J. M., Muñoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fuentes, M., Guisan, J. M. und Fernández-Lafuente, R. (2003b). "Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins: Hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyroyl-2-phenylacetic acid." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **21**, 201-210.
- Palomo, J. M., Segura, R. L., Fernández-Lorente, G., Pernas, M., Rua, M. L., Guisán, J. M. und Fernández-Lafuente, R. (2004). "Purification, Immobilization, and Stabilization of a Lipase from *Bacillus thermocatenulatus* by Interfacial Adsorption on Hydrophobic Supports." *Biotechnology Progress*, **20**, 630-635.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. und Soccol, V. T. (1999). "The realm of microbial lipases in biotechnology." *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **29**, 119-131.
- Paradies, H. H. (1980). "Shape and size of a nonionic surfactant micelle. Triton X-100 in aqueous solution." *The Journal of Physical Chemistry*, **84**, 599-607.
- Pasternack, R., Laurent, H.-P., Rùth, T., Kaiser, A., Schön, N. und Fuchsbauer, H.-L. (1997). "A Fluorescent Substrate of Transglutaminase for Detection and Characterization of Glutamine Acceptor Compounds." *Analytical Biochemistry*, **15**, 54-60.
- Patel, R. N. (2008). "Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis." *Coordination Chemistry Reviews*, **252**, 659-701.
- Patzsch, K., Riedel, K. und Pietzsch, M. (2010). "Parameter Optimization of Protein Film Production Using Microbial Transglutaminase." *Biomacromolecules*, **11**, 896-903.
- Perler, F. B. und Adam, E. (2000). "Protein splicing and its applications." *Current Opinion in Biotechnology*, **11**, 377-383.
- Pollard, D. J. und Woodley, J. M. (2007). "Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now." *Trends in Biotechnology*, **25**, 66-73.
- Pouderoyen, G. v., Eggert, T., Jaeger, K.-E. und Dijkstra, B. W. (2001). "The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal a/b Hydrolase Fold Enzyme." *J. Mol. Biol.*, **309**, 215-226.
- Pourzolfaghar, H., Abnisa, F., Daud, W. M. A. W. und Aroua, M. K. (2016). "A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **61**, 245-257.
- Quyen, D. T., Schmidt-Dannert, C. und Schmid, R. D. (2003). "High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase." *Protein Expression and Purification*, **28**, 102-110.
- Rabilloud, T. (1990). "Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: A 10-year synthesis." *Electrophoresis*, **11**, 785-794.
- Rachel, N. M. und Pelletier, J. N. (2013). "Biotechnological Applications of Transglutaminases." *Biomolecules*, **3**, 870-888.
- Rahman, I. A., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B. und Basri, M. (2013). "Formulation and Evaluation of an Automatic Dishwashing Detergent Containing T1 Lipase." *Journal of Surfactants and Detergents*, **16**, 427-434.
- Rahman, M. Z. A., Salleh, A. B., Rahman, R. N. Z. R. A., Rahman, M. B. A., Basri, M. und Leow, T. C. (2012). "Unlocking the mystery behind the activation phenomenon of T1 lipase: A molecular dynamics simulations approach." *Protein Science*, **21**, 1210-1221.
- Rahman, R. N. Z. R. A., Leow, T. C., Salleh, A. B. und Basri, M. (2007). "*Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia." *BMC Microbiology*, **7**.

- Rajendran, A., Palanisamy, A. und Thangavelu, V. (2009). "Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries." *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **52**, 207-219.
- Rao, S. V., Anderson, K. W. und Bachas, L. G. (1998). "Oriented immobilization of proteins." *Microchimica Acta*, **128**, 127-143.
- Rasmussen, K.-E. und Albrechtsen, J. (1974). "Glutaraldehyde. The Influence of pH, Temperature and Buffering on the Polymerization Rate." *Histochemistry*, **38**, 19--26
- Reddie, K. G. und Carroll, K. S. (2008). "Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation." *Current Opinion in Chemical Biology*, **12**, 746-754.
- Redeker, E. S., Ta, D. T., Cortens, D., Billen, B., Guedens, W. und Adriaensens, P. (2013). "Protein Engineering For Directed Immobilization." *Bioconjugate Chemistry*, **24**, 1761-1777.
- Redondo, Herrero, A., Bello, J. F., Roig, M. G., Calvo, M. V., Plou, F. J. und Burguillo, F. J. (1995). "Comparative kinetic study of lipases A and B from *Candida rugosa* in the hydrolysis of lipid p-nitrophenyl esters in mixed micelles with Triton X- 100." *Biochimica et Biophysica Acta*, **1243**, 15-24.
- Reetz, M. T. (2002). "Lipases as practical biocatalysts." *Current Opinion in Chemical Biology*, **6**, 145-150.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E. und Miller, R. (2009). "Lipases at interfaces: A review." *Advances in Colloid and Interface Science*, **147**, 237-250.
- Resindion. (2010). "Datenblatt Sepabeads EC-EP/S."
- Ribeiro, B. D., Castro, A. M. d., Coelho, M. A. Z. und Freire, D. M. G. (2011). "Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production." *Enzyme Research*, **2011**, 16.
- Richards, F. M. und Knowles, J. R. (1968). "Glutaraldehyde as a Protein Cross-linking Reagent." *Journal of Molecular Biology*, **37**, 231-233.
- Riederer, I. M., Herrero, R. M., Leuba, G. und Riederer, B. M. (2008). "Serial protein labeling with infrared maleimide dyes to identify cysteine modifications." *Journal of Proteomics*, **71**, 222-230.
- Rodrigues, Á. R., Cabral, J. M. S. und Taipa, M. A. (2002). "Immobilization of *Chromobacterium viscosum* lipase on Eudragit S-100: coupling, characterization and kinetic application in organic and biphasic media." *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 133-141.
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R. und Fernandez-Lafuente, R. (2013). "Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization." *Chemical Society Reviews*.
- Römpp. (2017). "Lexikon der Chemie - Online; <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/Welcome.do>; Einträge zu Lysin und Arginin." *Georg Thieme Verlag*, abgerufen am 10.04.2017.
- Rosano, G. L. und Ceccarelli, E. A. (2014). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges." *Frontiers in Microbiology*, **5**, 172.
- Rother, C., Nidetzky, B. und Flickinger, M. C. (2009). "Enzyme Immobilization by Microencapsulation: Methods, Materials, and Technological Applications." In: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Rua, M. L., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A. und Schmid, R. D. (1997). "Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*: Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity." *Journal of Biotechnology*, **56**, 89-102.
- Rueda, N., dos Santos, J. C. S., Ortiz, C., Torres, R., Barbosa, O., Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á. und Fernandez-Lafuente, R. (2016). "Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities." *The Chemical Record*, **16**, 1436-1455.
- Ruslan, R., Rahman, R. N. Z. R. A., Leow, T. C., Ali, M. S. M., Basri, M. und Salleh, A. B. (2012). "Improvement of Thermal Stability via Outer-Loop Ion Pair Interaction of Mutated T1 Lipase from *Geobacillus zalihae* Strain T1." *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 943-960.

- Rusmini, F., Zhong, Z. und Feijen, J. (2007). "Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips." *Biomacromolecules*, **8**, 1775-1789.
- Ryan, B. J. und Ó'Fágáin, C. (2007). "Arginine-to-lysine substitutions influence recombinant horseradish peroxidase stability and immobilisation effectiveness." *BMC Biotechnology*, **7**, 1-9.
- Sabri, S., Rahman, R. N. Z. R. A., Leow, T. C., Basri, M. und Salleh, A. B. (2009). "Secretory expression and characterization of a highly Ca²⁺-activated thermostable L2 lipase." *Protein Expression and Purification*, **68**, 161-166.
- Sakaki, K., Giorno, L. und Drioli, E. (2001). "Lipase-catalyzed optical resolution of racemic naproxen in biphasic enzyme membrane reactors." *Journal of Membrane Science*, **184**, 27-38.
- Salameh, M. d. A. und Wiegel, J. (2010). "Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two Alkalithermophilic Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*." *The Open Biochemistry Journal*, **4**, 22-28.
- Salehi, Z., Ghahfarokhi, H. H., Kodadadi, A. A. und Rahimnia, R. (2016). "Thiol and urea functionalized magnetic nanoparticles with highly enhanced loading capacity and thermal stability for lipase in transesterification." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **35**, 224-230.
- Salimon, J., Salih, N. und Yousif, E. (2012). "Industrial development and applications of plant oils and their biobased oleochemicals." *Arabian Journal of Chemistry*, **5**, 135-145.
- Sanchez, S. und Demain, A. L. (2011). "Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance." *Organic Process Research & Development*, **15**, 224-230.
- Saxena, R. K., Ghosh, P. K., Gupta, R., Davidson, W. S., Bradoo, S. und Gulati, R. (1999). "Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry." *Current Science*, **77**, 101-116.
- Schlieben, N. H., Niefind, K. und Schomburg, D. (2004). "Expression, purification, and aggregation studies of His-tagged thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*." *Protein Expression and Purification*, **34**, 103-110.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. und Witholt, B. (2001). "Industrial biocatalysis today and tomorrow." *Nature*, **409**, 258-268.
- Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., McNeill, G. P. und Schmid, R. D. (1999). "Highly Selective Synthesis of 1,3-Oleoyl-2-Palmitoylglycerol by Lipase Catalysis." *Biotechnology and Bioengineering* **64**, 678-684.
- Schmidt-Dannert, C., Rua, M. L., Atomi, H. und Schmid, R. D. (1996). "Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties." *Biochimica et Biophysica Acta*, **1301**, 105-114.
- Schmidt, F. (2005). "Optimization and scale up of industrial fermentation processes." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **68**, 425-435.
- Schmidt, S., Adolf, F. und Fuchsbauer, H.-L. (2008). "The transglutaminase activating metalloprotease inhibitor from *Streptomyces mobaraensis* is a glutamine and lysine donor substrate of the intrinsic transglutaminase." *FEBS Letters*, **582**, 3132-3138.
- Schrag, J. D. und Cygler, M. (1997). "Lipases and α/β hydrolase fold." In: *Methods in Enzymology*, Academic Press, 85-107, Volume 284.
- Scopes, R. K. (1994). "Protein Purification: Principles and Practice." Springer Science & Business Media, Springer Advanced Texts in Chemistry.
- Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Gatti-Lafranconi, P., Brocca, S., Lotti, M., Jaeger, K.-E., Puls, M. und Eggert, T. (2006). "The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **39**, 166-170.
- Shariff, F. M., Leow, T. C., Mukred, A. D., Salleh, A. B., Basri, M. und Rahman, R. N. Z. R. A. (2007). "Production of L2 lipase by *Bacillus* sp. strain L2: nutritional and physical factors." *Journal of Basic Microbiology*, **47**, 406-412.
- Shariff, F. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M. und Salleh, A. B. (2011). "A Newly Isolated Thermostable Lipase from *Bacillus* sp." *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, 2917-2934.

- Sharma, R., Chisti, Y. und Banerjee, U. C. (2001). "Production, purification, characterization, and applications of lipases." *Biotechnology Advances*, **19**, 627-662.
- Sheldon, R. A. (2007). "Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance." *Advanced Synthesis & Catalysis*, **349**, 1289 - 1307.
- Sheldon, R. A. und Pelt, S. v. (2013). "Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how." *Chemical Society Reviews*, **42**, 6223-6235.
- Shiloach, J. und Fass, R. (2005). "Growing *E. coli* to high cell density—A historical perspective on method development." *Biotechnology Advances*, **23**, 345-357.
- Shimada, Y., Maruyama, K., Nakamura, M., Nakayama, S., Sugihara, A. und Tominaga, Y. (1995). "Selective hydrolysis of polyunsaturated fatty acid-containing oil with *Geotrichum candidum* lipase." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **72**, 1577-1581.
- Sigma-Aldrich. (1999). "Produktdatenblatt Triton X-100."
- Sigma-Aldrich. (2006). "Datenblatt Sepharose 4B".
- Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R. und Lee, J.-K. (2013). "From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes." *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 1232-1277.
- Sokalingam, S., Raghunathan, G., Soundrarajan, N. und Lee, S.-G. (2012). "A Study on the Effect of Surface Lysine to Arginine Mutagenesis on Protein Stability and Structure Using Green Fluorescent Protein." *PLoS ONE*, **7**, e40410. doi:10.1371/journal.pone.0040410.
- Soliman, N. A., Knoll, M., Abdel-Fattah, Y. R., Schmid, R. D. und Lange, S. (2007). "Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt." *Process Biochemistry*, **42**, 1090-1100.
- Sommer, C., Hertel, T. C., Schmelzer, C. E. und Pietzsch, M. (2012). "Investigations on the activation of recombinant microbial pro-transglutaminase: in contrast to protein-ase K, dispase removes the histidine-tag." *Amino Acids*, **42**, 997-1006.
- Sommer, C., Volk, N. und Pietzsch, M. (2010). "Model based optimization of the fed-batch production of a highly active transglutaminase variant in *Escherichia coli*." *Protein Expression and Purification*, **7**, 9-19.
- Sørensen, A.-D. M., Xu, X., Zhang, L., Kristensen, J. B. und Jacobsen, C. (2010). "Human Milk Fat Substitute from Butterfat: Production by Enzymatic Interesterification and Evaluation of Oxidative Stability." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **87**, 185-194.
- Spickett, C. M. und Pitt, A. R. (2012). "Protein oxidation: role in signalling and detection by mass spectrometry." *Amino Acids*, **42**, 5-21.
- Spolaore, B., Raboni, S., Ramos Molina, A., Satwekar, A., Damiano, N. und Fontana, A. (2012). "Local Unfolding Is Required for the Site-Specific Protein Modification by Transglutaminase." *Biochemistry*, **51**, 8679-8689.
- Stergiou, P.-Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L. G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A. und Papamichael, E. M. (2013). "Advances in lipase-catalyzed esterification reactions." *Biotechnology Advances*, **31**, 1846-1859.
- Suarez, G., Jackson, R. J., Spoor, J. A. und McNeil, C. J. (2007). "Chemical Introduction of Disulfide Groups on Glycoproteins: A Direct Protein Anchoring Scenario." *Analytical Chemistry*, **79**, 1961-1969.
- Sugimura, Y., Ueda, H., Maki, M. und Hitomi, K. (2007). "Novel site-specific immobilization of a functional protein using a preferred substrate sequence for transglutaminase 2." *J. Biotechnol.*, **131**, 121-127.
- Sugimura, Y., Yokoyama, K., Nio, N., Maki, M. und Hitomi, K. (2008). "Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* using a phage-displayed peptide library." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **477**, 379-383.
- Summers, R. G., Harris, C. R. und Knowless, J. R. (1989). "A Conservative Amino Acid Substitution, Arginine for Lysine, Abolishes Export of a Hybrid Protein in *Escherichia coli*." *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, 20082-20088.

- Sung, K., Kamiya, N., Kawata, N., Kamiya, S. und Goto, M. (2010). "Functional glass surface displaying a glutamyl donor substrate for transglutaminase-mediated protein immobilization." *Biotechnology Journal*, **5**, 456-462.
- Takaç, S. und Marul, B. (2008). "Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **35**, 1019-1025.
- Takazawa, T., Kamiya, N., Ueda, H. und Nagamune, T. (2004). "Enzymatic Labeling of a Single Chain Variable Fragment of an Antibody With Alkaline Phosphatase by Microbial Transglutaminase." *Biotechnology and Bioengineering*, **86**.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng und Wang, F. (2010). "Biodiesel production with immobilized lipase: A review." *Biotechnology Advances*, **28**, 628-634.
- Tanaka, T., Kamiya, N. und Nagamune, T. (2004). "Peptidyl linkers for protein heterodimerization catalyzed by microbial transglutaminase." *Bioconjug Chem*, **15**, 491-7.
- Tanaka, T., Kamiya, N. und Nagamune, T. (2005). "N-terminal glycine-specific protein conjugation catalyzed by microbial transglutaminase." *FEBS Lett*, **579**, 2092-6.
- Tanaka, Y., Doi, S., Kamiya, N., Kawata, N., Kamiya, S., Nakama, K. und Goto, M. (2008). "A chemically modified glass surface that facilitates transglutaminase-mediated protein immobilization." *Biotechnology Letters*, **30**, 1025-1029.
- Tanaka, Y., Tsuruda, Y., Nishi, M., Kamiya, N. und Goto, M. (2007). "Exploring enzymatic catalysis at a solid surface: a case study with transglutaminase-mediated protein immobilization." *Organic and Biomolecular Chemistry*, **5**, 1764-1770.
- Tardioli, P. W., Pedroche, J., Giordano, R. L. C., Fernández-Lafuente, R. und Guisán, J. M. (2003). "Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose." *Biotechnology Progress*, **19**, 352-360.
- Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **60**, 523-533.
- Tomimatsu, Y., Jansen, E. F., Gaffield, W. und Olson, A. C. (1970). "Physical Chemical Observations on the alpha-Chymotrypsin Glutaraldehyde System during Formation of an Insoluble Derivate." *Journal of Colloid and Interface Science*, **36**, 51-64.
- Tominaga, J., Kamiya, N., Doi, S., Ichinose, H. und Goto, M. (2004). "An enzymatic strategy for site-specific immobilization of functional proteins using microbial transglutaminase." *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 613-618.
- Tominaga, J., Kamiya, N., Doi, S., Ichinose, H., Maruyama, T. und Goto, M. (2005). "Design of a Specific Peptide Tag that Affords Covalent and Site-Specific Enzyme Immobilization Catalyzed by Microbial Transglutaminase." *Biomacromolecules*, **6**, 2299-2304.
- Tominaga, J., Kemori, Y., Tanaka, Y., Maruyama, T., Kamiya, N. und Goto, M. (2007). "An enzymatic method for site-specific labeling of recombinant proteins with oligonucleotides." *Chemical Communications*, 401-403.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M. und Oliveira, J. V. (2010). "A Review on Microbial Lipases Production." *Food and Bioprocess Technology*, **3**, 182-196.
- Trivedi, M. V., Laurence, J. S. und Siahaan, T. J. (2009). "The role of thiols and disulfides in protein chemical and physical stability." *Current protein & peptide science*, **10**, 614-625.
- Tudorache, M., Protesescu, L., Negoii, A. und Parvulescu, V. I. (2012). "Recyclable biocatalytic composites of lipase-linked magneticmacro-/nano-particles for glycerol carbonate synthesis." *Applied Catalysis A: General*, **437**, 90-95.
- Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S. und Jones, T. A. (1994). "The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*." *Structure*, **2**, 293-308.
- Vahidi, A. K., Yang, Y., Ngo, T. P. N. und Li, Z. (2015). "Simple and Efficient Immobilization of Extracellular His-Tagged Enzyme Directly from Cell Culture Supernatant As Active

- and Recyclable Nanobiocatalyst: High-Performance Production of Biodiesel from Waste Grease." *ACS Catalysis*, **5**, 3157-3161.
- Vasel, B., Hecht, H.-J., Schmid, R. D. und Schomburg, D. (1993). "3D-Structures of the lipase from *Rhizomucor miehei* at different temperatures and computer modelling of a complex of the lipase with triaurylglycerol." *Journal of Biotechnology*, **28**, 99-115.
- Verger, R. (1997). "'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts." *Trends in Biotechnology*, **15**, 32-38.
- Verger, R. und Haas, G. H. d. (1976). "Interfacial Enzyme Kinetics of Lipolysis." *Annual Reviews of Biophysics and Bioengineering 1976*, **5**, 77-117.
- Vyas, V. V., Gupta, S. und Sharma, P. (1994). "Stability of a recombinant shuttle plasmid in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*." *Enzyme Microb Technol*, **16**, 240-6.
- Wahab, R. A., Basri, M., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., Rahman, M. B. A. und Leow, T. C. (2015). "Development of a catalytically stable and efficient lipase through an increase in hydrophobicity of the oxyanion residue." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **122**, 282-288.
- Walt, D. R. und Agayn, V. I. (1994). "The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde." *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **13**, 425-430.
- Wang, W., Zhou, W., Wei, W., Li, J., Hao, D., Su, Z. und Ma, G. (2016). "Towards A Deeper Understanding of the Interfacial Adsorption of Enzyme Molecules in Gigaporous Polymeric Microspheres." *Polymers*, **8**.
- Wang, X., Liu, X., Yan, X., Zhao, P., Ding, Y. und Xu, P. (2011). "Enzyme-Nanoporous Gold Biocomposite: Excellent Biocatalyst with Improved Biocatalytic Performance and Stability." *PLoS ONE*, **6**, e24207.
- Wang, Y., Wei, D.-Q. und Wang, J.-F. (2010). "Molecular Dynamics Studies on T1 Lipase: Insight into a Double-Flap Mechanism." *Journal of Chemical Information and Modeling*, **50**, 875-878.
- Wang, Y. J., Wu, T. C. und Chiang, C. L. (1989). "Effect of pore size distribution on enzyme immobilization in porous supports." *AIChE Journal*, **35**, 1551-1554.
- Wilson, L., Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Illanes, A., Guisán, J. M. und Fernández-Lafuente, R. (2006). "Effect of lipase-lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp." *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 259-264.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A. und Hunziker, W. (1990). "Structure of human pancreatic lipase." *Nature*, **343**, 771-774.
- Wong, L. S., Khan, F. und Micklefield, J. (2009). "Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications." *Chem. Rev.*, **109**, 4025-4053.
- Wong, S. S. (1993). "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking." CRC Press; ISBN 0849358868.
- Woo, E.-J., Kwon, H.-S. und Lee, C.-H. (2015). "Preparation of nano-magnetite impregnated mesocellular foam composite with a Cu ligand for His-tagged enzyme immobilization." *Chemical Engineering Journal*, **274**, 1-8.
- Woo, E., Ponvel, K. M., Ahn, I.-S. und Lee, C.-H. (2010). "Synthesis of magnetic/silica nanoparticles with a core of magnetic clusters and their application for the immobilization of His-tagged enzymes." *Journal of Materials Chemistry*, **20**, 1511-1515.
- Xu, X. (2000). "Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review." *European Journal of Lipid Science and Technology*, **102**, 287-303.
- Xu, Y., Guo, S., Wang, W., Wang, Y. und Yang, B. (2013). "Enzymatic hydrolysis of palm stearin to produce diacylglycerol with a highly thermostable lipase." *European Journal of Lipid Science and Technology*, **115**, 564-570.
- Yang, Y. und Lowe, M. E. (2000). "The open lid mediates pancreatic lipase function." *Journal of Lipid Research*, **41**, 48-57.
- Yedgar, S., Barenholz, Y. und Cooper, V. G. (1974). "Molecular weight, shape and structure of mixed micelles of Triton X-100 and sphingomyelin." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **363**, 98-111.

- Yee, L. und Blanch, H. W. (1992). "Recombinant Protein Expression in High Cell Density Fed-Batch Cultures of *Escherichia Coli*." *Nat Biotech*, **10**, 1550-1556.
- Yilmaz, E., Can, K., Sezgin, M. und Yilmaz, M. (2011). "Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester." *Bioresource Technology*, **102**, 499-506.
- Zaks, A. und Klibanov, A. M. (1985). "Enzyme-catalyzed processes in organic solvents." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **82**, 3192-3196.
- Zhang, D.-H., Yuwen, L.-X., Li, C. und Li, Y.-Q. (2012). "Effect of poly(vinyl acetate–acrylamide) microspheres properties and steric hindrance on the immobilization of *Candida rugosa* lipase." *Bioresource Technology*, **124**, 233-236.
- Zhang, D.-H., Yuwen, L.-X. und Peng, L.-J. (2013). "Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme." *Journal of Chemistry*, **2013**, 7.
- Zhang, G., Ma, J., Wang, J., Li, Y., Zhang, G., Zhang, F. und Fan, X. (2014). "Lipase Immobilized on Graphene Oxide As Reusable Biocatalyst." *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **53**, 19878-19883.
- Zhao, L.-L., Pan, J. und Xu, J.-H. (2010). "Efficient production of diltiazem chiral intermediate using immobilized lipase from *Serratia marcescens*." *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **15**, 199-207.
- Zhao, X., Qi, F., Yuan, C., Du, W. und Liu, D. (2015). "Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **44**, 182-197.
- Zhao, X. S., Bao, X. Y., Guo, W. und Lee, F. Y. (2006). "Immobilizing catalysts on porous materials." *Materials Today*, **9**, 32-39.
- Zimmermann, J. L., Nicolaus, T., Neuert, G. und Blank, K. (2010). "Thiol-based, site-specific and covalent immobilization of biomolecules for single-molecule experiments." *Nat. Protocols*, **5**, 975-985.

8 Anhang

8.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

GCAAGCCTGCGTGCAAATGATGCACCGATTGTTCTGCTGCATGGTTTTACCGGTTGGGGTCGTG
 AAGAAATGTTTGGCTTTAAATATTGGGGTGGTGTGCGTGGTGATATTGAACAGTGGCTGAATGAT
 AATGGTTATCGCACCTTTACCCTGGCAGTTGGTCCGCTGTCTAGTAATTGGGATCGTGCATGTGA
 AGCATATGCACAGCTGGTTGGTGGCACC GTT GATTATGGCGCAGCACATGCAGCAAACATGGT
 CATGCACGTTTTGGTTCGTACCTATCCGGGTCTGCTGCCGGAAC TGAACGTGGTGGTTCGCATTC
 ATATCATTGCACATAGCCAGGGTGGTCAGACCGCACGTATGCTGGTTAGCCTGCTGGAAAATGGT
 AGCCAGGAAGAACGCGAATACGCCAAAGCCCATAATGTTAGCCTGTCTCCGCTGTTTGAAGTG
 GTCATCATTTTTGTTCTGAGCGTGACCACCATTGCAACACCGCATGATGGCACCACCCTGGTTAAT
 ATGGTGGATTTTACCGATCGCTTTTTTATCTGCAGAAAGCAGTTCTGGAAGCAGCAGCAGTTGC
 AAGCAATGTTCCGTATACCAGCCAGGTGTATGATTTTAAACTGGATCAGTGGGGTCTGCGTCGTC
 AGCCTGGTGAATCTTTTATCATTATTTTGAACGCCTGAAACGTTCTCCGGTTTGGACCAGCACC
 GATACCGCACGTTATGATCTGAGCGTTAGCGGTGCAGAAAAC TGAATCAGTGGGTTTCAGGCAA
 GCCCGAATACCTATTATCTGAGCTTTAGCACCGAACGTACCTATCGTGGTGCAC T GACCGGTAAT
 CATTATCCGGAAC TGGGTATGAATGCATTTAGCGCAGTTGTTTGTGCACCGTTTCTGGGTAGCTA
 TCGTAATCCGACCCTGGGTATTGATGATCGTTGGCTGGAAAATGATGGCATTGTTAATACCGTGA
 GCATGAATGGTCCGAAACGTGGTAGCAGCGATCGTATTGTTCCGTATGATGGCACCCTGAAAAAA
 GGTGTGTGGAATGATATGGGCACCTATAATGTGGATCATCTGGAAATTATTGGCGTTGATCCGAA
 TCCGAGCTTTGATATTCGTGCCTTTTATCTGCGTCTGGCAGAACAGCTGGCAAGCCTGCAGCCGC
 TCGAGCACCACCACCACCACCAC

Abbildung 8-1: Nukleotidsequenz codierend für Lipase LipT1-WT mit C-terminalem His₆-tag.

10	20	30	40	50	60
ASLRANDAPI	VLLHGFTGWG	REEMFGFKYW	GGVRGDIEW	LNDNGYRTFT	LAVGPLSSNW
70	80	90	100	110	120
DRACEAYACL	VGGTVDYGAA	HAAKHGHARF	GRTYPGLLPE	LKRGGRIHII	AHSCGGGTAR
130	140	150	160	170	180
MLVSLLENGS	EEEREYAKAH	NVSLSPLFEG	GHHFVLSVTT	IATPHDGTTL	VNMVDFTDRE
190	200	210	220	230	240
FDLCKAVLEA	AAVASNVPYT	SVYDFKLDQ	WGLRRQPGES	FDHYFERLKR	SPVWTSTDTA
250	260	270	280	290	300
RYDLSVSGAE	KLNQWVQASP	NTYYLSFSTE	RTYRGALTGN	HYPELG MNAF	SAVVCAPFLG
310	320	330	340	350	360
SYRNPTLGID	DRWLENDGIV	NTVSMNGPKR	GSSDRIVPYD	GTLKKGVWND	MGTYNVDHLE
370	380	390			
IIGVDPNPSF	DIRAFYLRLA	EQLASLQPLE	HHHHHH		

Abbildung 8-2: Aminosäuresequenz der mit C-terminalem His₆-tag fusionierten Lipase LipT1-WT. Glutaminreste sind rot und Lysinreste in blau hervorgehoben.

GCAGAACATAATCCGGTTGTTATGGTGCATGGTATCGGTGGTGCCAGCTTTAATTTTGCCGGTAT
 TAAAAGCTATCTGGTTAGCCAGGGTTGGAGCCGTGATAAACTGTATGCCGTGGATTTTTGGGATA
 AAACAGGCACCAATTATAACAATGGTCCGGTTCTGAGCCGTTTTGTTGAGAAAGTTCTGGATGAAA
 CCGGTGCCAAAAAGTTGATATTGTGGCCATTCTATGGGTGGTGCAAATACCCTGTATTATATTA
 AAAATCTGGATGGTGGCAATAAAGTTGCCAATGTTGTTACCCTGGGTGGTGCCAATCGTCTGACC
 ACCGGTAAAGCACTGCCTGGCACCGATCCGAATCAGAAAATTCTGTATACCAGCATTTATAGCAG
 CGCAGATATGATTGTGATGAATTATCTGAGCCGTCTGGATGGTGCACGTAATGTTTCAGATTCATG
 GCGTTGGTCATATTGGTCTGCTGTATAGCAGCCAGGTTAATAGCCTGATTAAGAAGGTCTGAAC
 GGAGGAGGTCAGAATACCAACCTCGAGCACCACCACCACCAC

Abbildung 8-3: Nukleotidsequenz codierend für Lipase LipA mit C-terminalem His₆-tag.

10 20 30 40 50 60
 AEHNPVVMVH GIGGASFNFA GIKSYLVSQG WSRDKLYAVD FWDKTGTNYN NGPVLRSRFVQ
 70 80 90 100 110 120
 KVLDETGAKK VDIVAHSMGG ANTLYYIKNL DGGNKVANVV TLGGANRLTT GKALPGTDPN
 130 140 150 160 170 180
 QKILYTSIYS SADMIVMNYL SRLDGARNVQ IHGVGHIGLL YSSQVNSLIK EGLNGGGQNT
 NLEHHHHHH

Abbildung 8-4: Aminosäuresequenz der mit C-terminalem His₆-tag fusionierten Lipase LipA.

GCATCTCCGCGTGCAAATGATGCACCGATTGTTCTGCTGCATGGTTTTACCGGTTGGGGTCGTGA
 AGAAATGCTGGGCTTTAAATATTGGGGTGGTGTGCGTGGTGATATTGAACAGTGGCTGAATGATA
 ATGGTTATCGCACCTATACCCTGGCAGTTGGTCCGCTGTCTAGTAATTGGGATCGTGCATGTGAA
 GCATATGCACAGCTGGTTGGTGGCACCGTTGATTATGGCGCAGCACATGCAGCAAATGATGGTC
 ATGCACGTTTTGGTCGTACCTATCCGGGTCTGCTGCCGGAACGAAACGTGGTGGTCGTGTTTAT
 ATCATTGCACATAGCCAGGGTGGTCAGACCGCACGTATGCTGGTTAGCCTGCTGGAAAATGGTA
 GCCAGGAAGAACGCGAATACGCCAAAGAACATAATGTTAGCCTGTCTCCGCTGTTTGAAGGTGGT
 CATCGTTTTGTTCTGAGCGTGACCACCATTGCAACACCGCATGATGGCACCACCCTGGTTAATAT
 GGTGGATTTTACCGATCGCTTTTTTATCTGCAGAAAGCAGTTCTGGAAGCAGCAGCAGTTGCAA
 GCAATGCACCGTATAACAGCGAAATTTATGATTTTAACTGGATCAGTGGGGTCTGCGTCGTGAA
 CCGGGTGAATCCTTTGATCATTATTTTGAACGCCTGAAACGTTCTCCGGTTTGGACCAGCACCGA
 TACCGCACGTTATGATCTGTCTGTTCCGGGTGCAGAAACCCTGAATCGTTGGGTTAAAGCAAGCC
 CGAATACCTATTATCTGAGCTTTAGCACCGAACGTACCTATCGTGGTGCACCTGACCGGTAATTATT
 ATCCGGAACCTGGGCATGAATGCATTTAGCGCCATTGTTTGTGCACCGTTTCTGGGTAGCTATCGT
 AATGCAGCACTGGGTATTGATAGCCATTGGCTGGGTAATGATGGCATTGTGAATACCATTAGCAT
 GAATGGTCCGAAACGTGGTAGCAATGATCGTATTGTCCGTATGATGGCACCCTGAAAAAGGTG
 TGTGGAATGATATGGGCACCTATAAAGTGGATCATCTGGAAGTTATTGGCGTTGATCCGAATCCG
 AGCTTTAATATTCGTGCCTTTTATCTGCGTCTGGCAGAACAGCTGGCAAGCCTGCGTCCGCTCGA
 GCACCACCACCACCAC

Abbildung 8-5: Nukleotidsequenz codierend für Lipase LipL1 mit C-terminalem His₆-tag.

10 20 30 40 50 60
ASPRANDAPI VLLHGFTGWG REEMLGFKYW GGVRGDIEQW LNDNGYRTYT LAVGPLSSNW

70 80 90 100 110 120
DRACEAYAQL VGGTVDYGAA HAANDGHARF GRTYPGLLPE LKRGGRVHII AHSQGGQTAR

130 140 150 160 170 180
MLVSLLENGS QEEREYAKEH NVSLSPLFEG GHRFVLSVTT IATPHDGTTL VNMVDFDTRF

190 200 210 220 230 240
FDLQKAVLEA AAVASNAPYT SEIYDFKLDQ WGLRREPGES FDHYFERLKR SPVWTSTDTA

250 260 270 280 290 300
RYDLSVPGAE TLNRWVKASP NTYYLSFSTE RTYRGALTGN YYPELGMNAF SAIVCAPFLG

310 320 330 340 350 360
SYRNAALGID SHWLGNDGIV NTISMNGPKR GSNDRIVPYD GTLKKGVWND MGTYKVDHLE

370 380 390
VIGVDPNPSF NIRAFYLRLA EQLASLRPLE HHHHHH

Abbildung 8-6: Aminosäuresequenz der mit C-terminalem His₆-tag fusionierten Lipase LipL1.

8.2 Ergänzende Ergebnisse

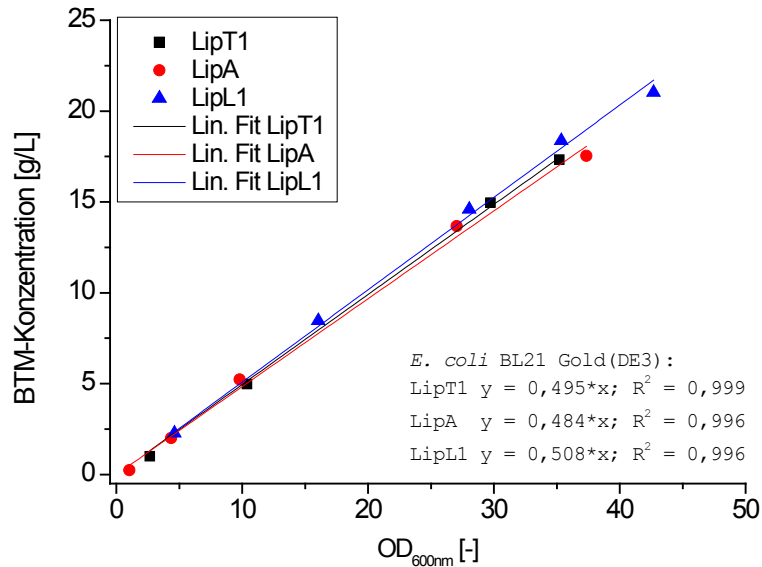


Abbildung 8-7: Bestimmung der Korrelation zwischen OD_{600nm} und BTM-Konzentration. Die Kultivierung von *E. coli* BL21 Gold(DE3) pJExpress-XX erfolgte bei 37 °C und pH 7 in einem Startvolumen von 36 L PM-Medium. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden 1 mL Proben entnommen und in vorgetrocknete 2 mL-Reaktionsgefäße überführt. Der Überstand wurde nach Zentrifugation für 2 min bei 16.100 x g abgetrennt. Das Pellet wurde zweimal mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung gewaschen, über 22 h bei 80 °C getrocknet und anschließend dessen Trockengewicht bestimmt.

Tabelle 8-1: Ausbeute und spezifische Aktivität verschiedener Lipase LipT1-Varianten nach BA-Reinigung. Die zur Reinigung der Mutanten eingesetzte BFM stammte aus der Schüttelkolbenkultivierung nach Abschnitt 2.9.3. Die Lipasen wurden nach Dialyse mit 50 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte titrimetrisch unter Verwendung von Olivenöl als Substrat. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradfordtest bestimmt.

Nummer Mutante	Lipase-Bezeichnung	Aktivitätsausbeute Elutionspool [%]	Spezifische Aktivität Elutionspool [U _T /mg]	Aktivitätsausbeute nach Dialyse [%]	Spezifische Aktivität nach Dialyse [U _T /mg]
1	LipT1-KXR	72	2.520	44	2.310
2	NQ-LipT1	69	2.140	43	2.360
3	LipT1-CQ	66	2.920	10	2.400
4	LipT1-S2C	65	2.980	31	2.820
5	LipT1-S259C	64	2.840	51	2.830
6	LipT1-S333C	50	2.490	41	2.730
7	LipT1-SXC	59	2.590	20	2.450
Wildtyp	LipT1-WT	59	2.680	25	2.880

Tabelle 8-2: Spezifische Aktivität der WT-Lipasen nach BA-Reinigung und Dialyse. Die Lipasen wurden nach Dialyse mit 50 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte titrimetrisch mit Olivenöl als Substrat sowie colorimetrisch mit pNPP als Substrat. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradfordtest bestimmt.

Substrat	LipT1-WT	LipA	LipL1
Olivenöl [U _T /mg]	2.880	218	1.411
pNPP [U _C /mg]	266	6	22

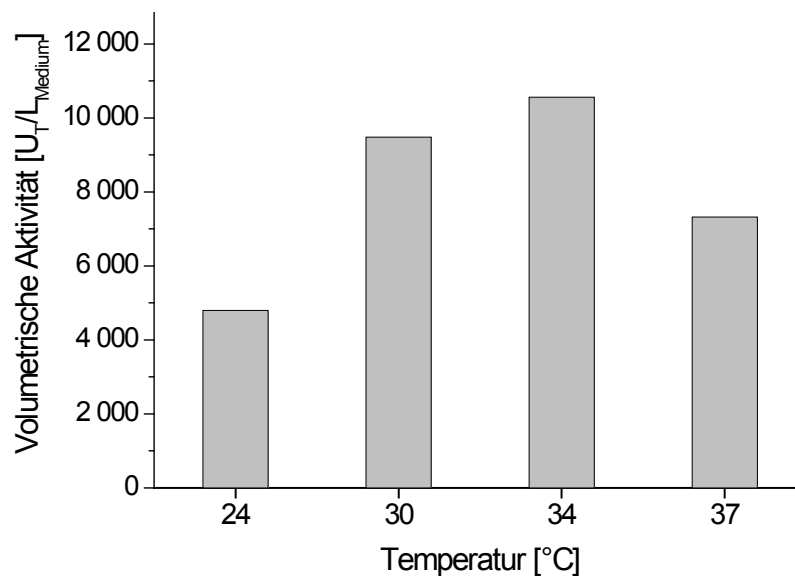


Abbildung 8-8: Einfluss der Expressionstemperatur auf die produzierte Aktivität der Lipase LipA [Heppner, 2011]. Die Kultivierung von *E. coli* BL21 Gold(DE3) pJExpress-LipA erfolgte bei 37 °C und 80 rpm in 500 mL PM_{Amp}-Medium ab einer Start-OD von 0,1. Bei einer OD_{600nm} von 0,5 wurde die Temperatur entsprechend abgesenkt und mit 1 mM IPTG induziert. Die Induktionsphase dauerte 4 h. Die geerntete Biofeuchtmasse wurde mittels HDH (drei Passagen bei 1000 bar) aufgeschlossen und die unlöslichen Bestandteile mittels Zentrifugation (40 min bei 17.000 x g) abgetrennt. Die Aktivitätsbestimmung im Rohextrakt erfolgte titrimetrisch mit Olivenöl als Substrat.

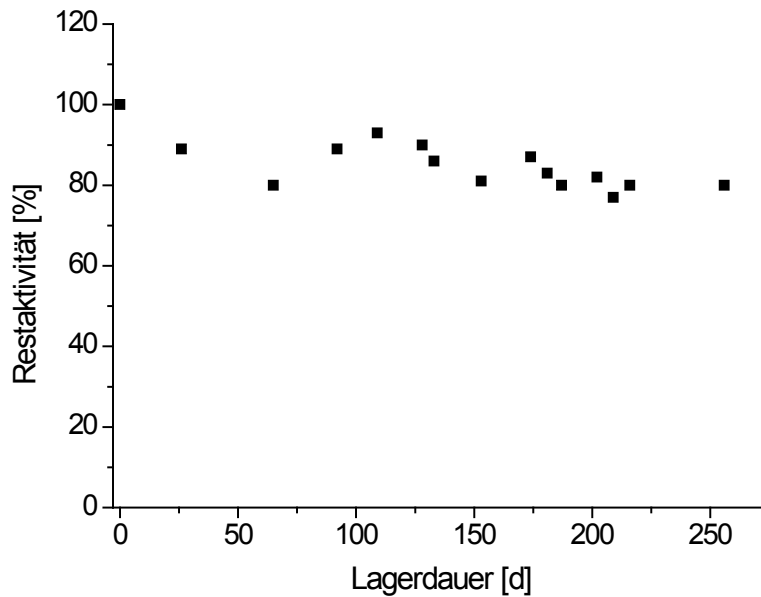


Abbildung 8-9: Lagerstabilität der Lipase LipT1-WT. Die Lagerung der Lipase (0,21 mg/mL) erfolgte in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 mit 50 % (v/v) Glycerin bei -20 °C. Die Aktivität der Lipase wurde nach entsprechender Verdünnung (50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10, 500 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100) gegenüber pNPP bestimmt. Die angegebene Restaktivität entspricht der gemessenen spezifischen Aktivität der Lipase nach Lagerung bezogen auf die initiale spezifische Aktivität nach Reinigung (266 U_c/mg).

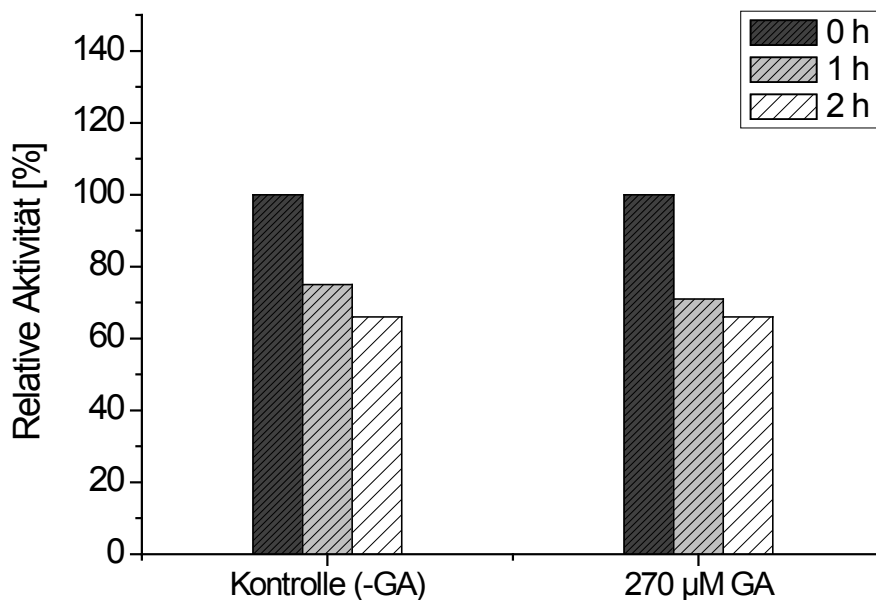


Abbildung 8-10: Einfluss von Glutaraldehyd auf die Aktivität der Lipase LipT1-KXR. Die Inkubation von 2 U_c/mL der Lipase mit 270 µM GA erfolgte in 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10 mit 1 % (v/v) Triton X-100 sowie 500 mM NaCl bei 25 °C und 550 rpm (Thermomixer) für 2 h. Die relative Aktivität entspricht der nach Inkubation mit GA erhaltenen Aktivität gegenüber pNPP bezogen auf die Startaktivität.

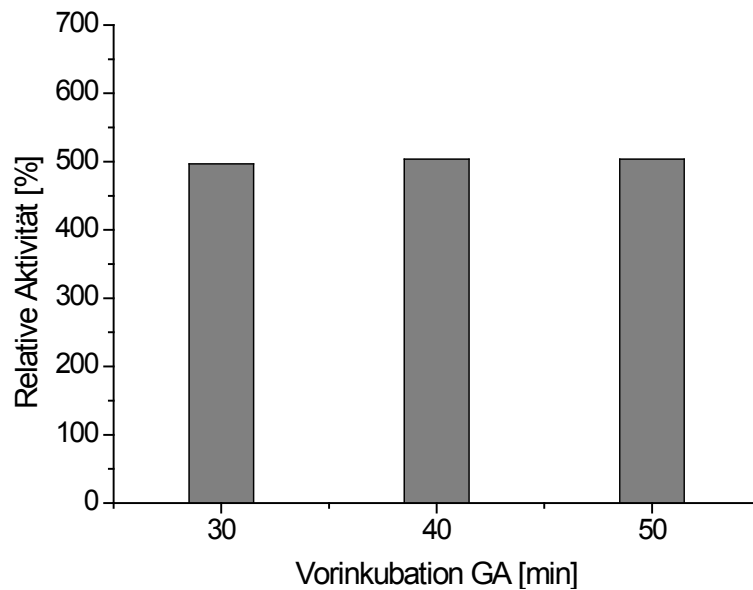


Abbildung 8-11: Einfluss der Vorinkubation von Glutaraldehyd im Reaktionspuffer auf die Aktivität der Lipase LipT1-WT. GA wurde mit 50 mM Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 10 mit 1 % (v/v) Triton X-100 sowie 500 mM NaCl auf 54 mM verdünnt, für die angegebenen Zeiten inkubiert und mit 2 U_C/mL der Lipase (GA-Konz. im Ansatz: 270 μM) bei 25 °C und 550 rpm (Thermomixer) für 2 h weiter inkubiert. Die relative Aktivität entspricht der nach Inkubation mit GA erhaltenen hydrolytischen Aktivität gegenüber pNPP bezogen auf die Startaktivität.

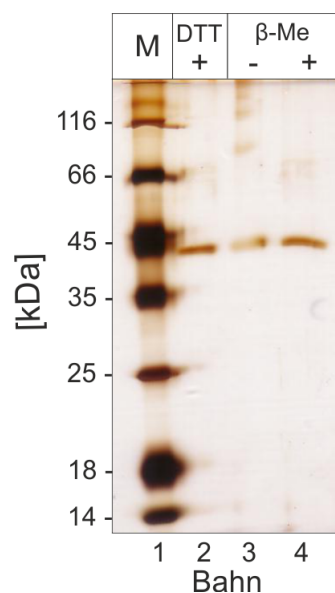


Abbildung 8-12: Multimerisierungsverhalten der Lipase LipT1-SXC in Anwesenheit verschiedener Reduktionsmittel. Zur Behandlung mit DTT wurde gereinigte Lipase LipT1-SXC (0,01 mg/mL) in 50 mM Phosphatpuffer pH 8 mit 25 mM DTT für 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend zur Probenvorbereitung mit SDS-PAGE-Probenpuffer (ohne β-ME) 1 : 2 verdünnt und direkt auf das Gel aufgetragen (Bahn 2). Als Vergleich diente LipT1-SXC (0,01 mg/mL) 1 : 2 verdünnt mit Probenpuffer ohne (Bahn 3) und mit β-ME (Bahn 4) nach Inkubation für 5 min bei 99 °C. Der Nachweis der Proteinbanden erfolgte mittels Silberfärbung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Martin Wolfram
 Geburtsdatum / -ort: 04.09.1984 in Ebersdorf / Thüringen
 Nationalität: deutsch
 Familienstand: ledig
 Akademischer Grad: Diplom-Ingenieur

Schulischer und beruflicher Werdegang

- 02/10 – derzeit **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Pharmazie (AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte)
 Kultivierung von Bakterien, Hefen und Mikroalgen
 Rekombinante Proteinproduktion und –reinigung
 Enzymimmobilisierung
 Betreuung von Masterarbeiten und Praktika
 Dissertationsthema: „Untersuchungen zur Produktion und zielgerichteten Immobilisierung rekombinanter Lipasen“
- 10/04 – 01/10 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
 Studium: Bioingenieurwesen (Vertiefung: Bioprozesstechnik)
 Diplomarbeit am Institut für Pharmazie (AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte)
 Thema: „Untersuchungen zur enzymkatalysierten Synthese von Guanosinmono-, -di- und -triphosphat“
- 06/08 – 08/08 **Probiodrug AG Halle (Saale) in Kooperation mit AG Bioverfahrenstechnik (MLU Halle-Wittenberg)**
 Praktikum
- 02/07 – 03/07 **Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale) - Bereich**
 07/07 – 08/07 **Stoffwechsel und Zellbiologie**
 Praktikum
- 10/03 – 06/04 **Wehrdienst in Füßen**
 Stabsdienst
- 09/95 – 06/03 **Christian-Gottlieb-Reichard-Gymnasium Bad Lobenstein**
 Allgemeine Hochschulreife