

# Klonierung und Charakterisierung neu entdeckter Ene-Reduktasen



<b>Diplomand</b>	David Aregger
<b>Korrektorin ZHAW</b>	Prof. Dr. Rebecca Buller
<b>Korrektor extern</b>	Prof. Dr. Thorsten Stafforst

Durch ihre hohe Chemo-, Regio- und Enantioselektivität sind Biokatalysatoren für den Einsatz in der nachhaltigen Produktion von chiralen und hochfunktionellen chemischen Verbindungen prädestiniert. Die Anwendung biokatalytischer Umsetzungen in der Industrie scheitert jedoch immer wieder an der Suche nach einem geeigneten Biokatalysator. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Bachelorarbeit neue Ene-Reduktasen erstmalig rekombinant exprimiert und für den Aufbau einer Ene-Reduktasen Bibliothek verwendet. Ene-Reduktasen der Old Yellow Enzyme (OYE) Familie sind NAD(P)H-abhängige Flavinmononucleotid (FMN)-enthaltende Oxidoreduktasen, welche die stereo- und enantioselektive Reduktion von  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Ketonen, Aldehyden, Nitroalkanen und Carbonsäuren katalysieren.

In dieser Bachelorarbeit wurden die beiden Ene-Reduktasen 321\_1 und 321\_2 aus *Sporosarcina psychrophila* sowie die Ene-Reduktase 230\_1 aus *Pseudomonas brassicacearum* charakterisiert. Um alle Enzyme löslich und

aktiv in *E. coli* zu exprimieren, wurden unter verschiedenen Bedingungen Kultivationen durchgeführt. Zusätzlich wurden zur Unterstützung der Proteinexpression Chaperone eingesetzt. Die Aktivität der exprimierten Ene-Reduktasen wurde mittels Biokatalysen bestimmt und das Substratspektrum mittels diverser Substrate definiert. Die beiden Ene-Reduktasen aus *S. psychrophila* konnten selbst nach allen Optimierungen nur in geringen Konzentrationen als lösliche Enzyme exprimiert werden. Bei der Aktivitätsbestimmung konnte gezeigt werden, dass die Ene-Reduktase 321\_1 als aktives Enzym vorlag, während für 321\_2 aus demselben Organismus keine Aktivität messbar war. Die Ene-Reduktase aus *P. brassicacearum* zeigte bei den durchgeführten Biokatalysen für die Substrate Cyclohexanon, Carvon, Zimtaldehyd und Butylacrylat vollständige Umsätze. Zusammenfassend konnte eine Ene-Reduktase neu kloniert und drei noch nicht beschriebene Enzyme erstmalig in *E. coli* rekombinant exprimiert werden.

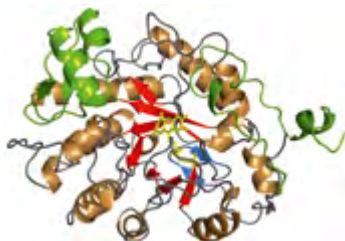


Abb. 1: 3D-Modell der Kristallstruktur von Ene-Reduktase OYE 1 aus *Saccharomyces pastorianus*.



Abb. 2: Die beiden Teilreaktionen der NAD(P)H-abhängigen Reduktion von aktivierten Alkenen durch Ene-Reduktasen.