

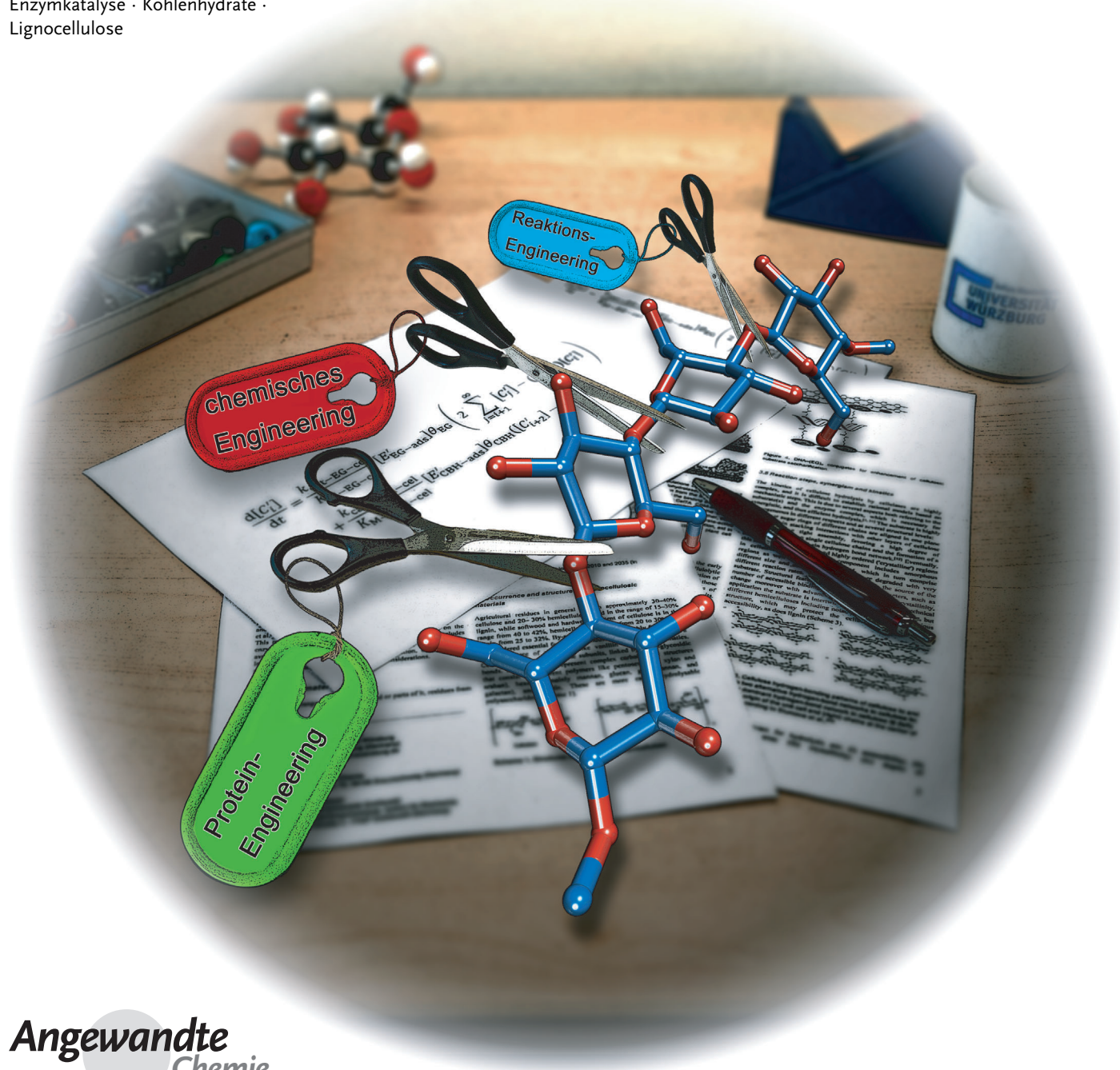
# Enzymatischer Abbau von (Ligno)Cellulose

Uwe Bornscheuer, Klaus Buchholz und Jürgen Seibel\*

## Stichwörter:

Biokraftstoffe · Biomasse ·  
Enzymkatalyse · Kohlenhydrate ·  
Lignocellulose

Professor Volker Kasche  
zum 75. Geburtstag gewidmet



**G**lycoside abbauende Enzyme spielen eine dominante Rolle bei der biochemischen Umwandlung cellulosischer Biomasse zu preiswerten Biokraftstoffen und wertschöpfenden Chemikalien. Neue Einsichten in Proteinfunktionen und Substratstrukturen, Kinetiken zur Erkennung und Abbauereignisse münden in einem substanziell verbesserten Verständnis des Celluloseabbaus.

## 1. Einleitung

Biokraftstoffe aus Lignocellulose-Material stellen eine bedeutende Herausforderung dar: Sie offerieren ein großes Potenzial für die Produktion von Treibstoffen, stellen neue Rohstoffquellen zur Verfügung, ohne mit der Herstellung von Lebensmitteln zu konkurrieren, und bieten die Option auf eine erhebliche Reduktion der Treibhausgasemission. Eine kürzlich publizierte Analyse konstatierte, dass Ethanol aus Cellulose verglichen mit konventionellem Benzin die Emission von Treibhausgasen um 90 % reduziert.<sup>[1]</sup> Allerdings müssen noch ernsthafte Probleme im Hinblick auf Infrastruktur, Logistik und Transport, weiterhin technische und wirtschaftliche Aufgaben, die Konkurrenz mit anderen Treibstoffen, Biokraftstoffe inbegriffen, und besonders die Verbrennung von Biomasse zur Gewinnung von Elektrizität und thermischer Energie in dezentralen Einrichtungen gelöst werden; auch das „Fracking“ als neue konkurrierende Technologie scheint die Kommerzialisierung von Lignocellulose-basierten Verfahren zu verzögern. Schätzungen zufolge liegen die Produktionskosten von Ethanol aus Lignocellulose bei 0.5 US\$ pro Liter und damit doppelt so hoch wie für Ethanol aus Stärke.<sup>[1,2]</sup>

Die Forschung zum enzymatischen Celluloseabbau wurde in den letzten 30 Jahren mit schwankender Intensität betrieben.<sup>[3]</sup> Die Thematik ist seit den 1970er Jahren, nach der ersten Ölkrise, wiederholt in Mode gekommen. Ihr Wegbereiter war Elwin T. Reese,<sup>[4]</sup> der in den frühen 1950er Jahren die Verrottung von Zelten aus Baumwolltuch in den Labors der US-Army untersuchte. Er identifizierte Pilze der Gattung *Trichoderma*, die erhebliche Mengen an Cellulasen produzierten und Cellulose zu Glucose hydrolysieren, einschließlich einer Spezies, die später als *Trichoderma reesei* bezeichnet wurde. Zu Reese stieß 1956 Mary Mandels, und der Schwerpunkt der Cellulaseforschung verschob sich von der Verhinderung der Hydrolyse hin zu ihrer Verstärkung für die Gewinnung von Glucose. Die Gruppe von Henrissat bereitete den Weg sowohl für die Klassifizierung und Charakterisierung als auch die Erforschung der Reaktionen und der Synergie von Cellulasen.<sup>[5]</sup> Zu den ersten Übersichten und Veröffentlichungen über Kinetik und Reaktionsführung gehören die von Ladisch und Zhao,<sup>[6]</sup> Ghose<sup>[7]</sup> und Buchholz et al.<sup>[8]</sup> Der vorliegende Aufsatz bietet eine aktuelle Übersicht über den Stand der Forschung zum enzymatischen Abbau von (Ligno)Cellulose-Material. Er behandelt die Verfügbarkeit und Struktur der Ausgangsmaterialien, weiterhin eine Einführung über die erforderlichen Enzyme, ihre Reaktionsweise, die Suche („Screening“) nach (neuen) Aktivitäten und das Protein-Engineering, sowie Aspekte der Reaktionsführung.

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	11055
<b>2. Biomasse</b>	11055
<b>3. Cellulose spaltende Enzyme</b>	11058
<b>4. Aspekte der Reaktionstechnik, Pilot- und Demonstrationsanlagen</b>	11065
<b>5. Identifizierung neuer CAZymes</b>	11066
<b>6. Protein-Engineering von CAZymes</b>	11069
<b>7. Zusammenfassung und Ausblick</b>	11070

## 2. Biomasse

Ein breites Spektrum an Substraten und Ausgangsmaterialien wurde untersucht, darunter Holz oder Teile von Holz, Restmaterialien aus Verarbeitungsprozessen der Lebensmittelindustrie, Getreidereste, Maisstroh, Maiskolben, Zuckerrohrbagasse und Energiepflanzen, vor allen Dingen Rutenhirse und Pappel-Hybride. Treibstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen decken zurzeit 10 % des Weltenergiebedarfs, oder 53 Exajoule.<sup>[9]</sup> Das globale Potenzial für Bioenergie aus dem gezielten Anbau von Biomasse im 21. Jahrhundert wurde unter Berücksichtigung einer Reihe von Anforderungen bezüglich Nachhaltigkeit geschätzt, um die Nahrungsmittelproduktion und die Biodiversität zu erhalten, sowie eine angemessene Kohlenstoffbilanz im Boden zu gewährleisten. Biotreibstoffe bieten das Potenzial, in Zukunft ein Viertel des Energiebedarfs der Welt zu decken (153 von 623 Exajoule im Jahr 2035; Abbildung 1).<sup>[10]</sup>

### 2.1. Vorkommen und Strukturen von Lignocellulose-Materialien

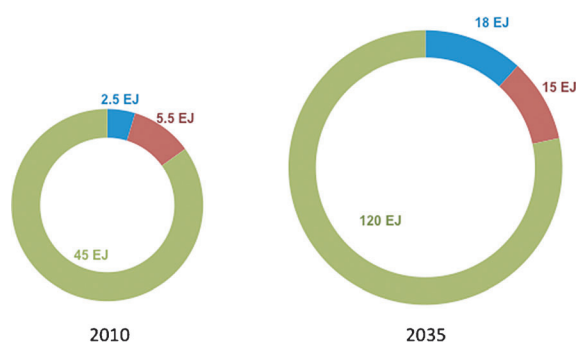
Landwirtschaftliche Reststoffe enthalten in der Regel etwa 30–40 % Cellulose, 20–30 % Hemicellulosen und in der Größenordnung von 15–30 % Lignin, während der Cellulosegehalt von Nadelholz und Laubholz im Bereich von 40–

[\*] Prof. Dr. J. Seibel

Institut für Organische Chemie  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)  
E-Mail: seibel@chemie.uni-wuerzburg.de

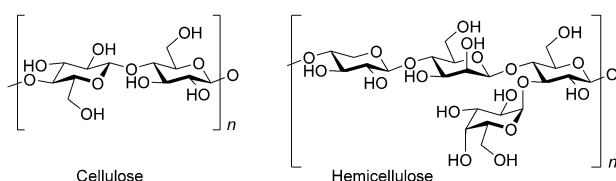
Prof. Dr. K. Buchholz  
Institut für Technische Chemie  
Hans-Sommer-Straße 10, 38106 Braunschweig (Deutschland)

Prof. Dr. U. Bornscheuer  
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
Biotechnologie und Enzymkatalyse, Institut für Biochemie  
Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Deutschland)



**Abbildung 1.** Nutzung von Biomasse in den Jahren 2010 (insgesamt 53 EJ) und 2035 (insgesamt 153 EJ). 1 EJ = 1 Exajoule =  $10^{18}$  J. Grün: Wärmeenergie; blau: Transport; rot: Elektrizität.<sup>[10]</sup>

42 % liegt mit etwa 20–30 % Hemicellulosen und 25–32 % Lignin. Die Nutzung der Nebenprodukte, im besonderen Maße des Lignins, wird als entscheidend für einen wirtschaftlichen industriellen Prozess erachtet. So kann Lignin ein geeignetes Ausgangsmaterial für Chemikalien wie Vanillin und andere Aromaten darstellen. Die Cellulose setzt sich aus  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpften D-Glucose-Untereinheiten zusammen. Die Hemicellulosen repräsentieren komplexe Kohlenhydratstrukturen, die sich aus unterschiedlichen Polysacchariden wie Pentosanen (z.B. Xylan und Arabin), Hexosepolymeren (vorwiegend Mannan, Glucan, Glucmannan und Galactan) sowie Pektin aufbauen. Diese Polysaccharide sind leicht zu hydrolysieren (Schema 1).



**Schema 1.** Strukturen von Cellulose und Hemicellulose.

Dagegen ist Lignin ein dreidimensionales statistisch verknüpftes Polypropanoid( $C_9$ )-Polyphenol, das vorzugsweise über Arylglyceryl-Etherbindungen zwischen Phenol-*p*-cumaryl(H)-, Coniferyl(G)- und Sinapyl(S)-Alkohol-Bausteinen

nen verknüpft ist (Schema 2).<sup>[11]</sup> Gymnosperm-Lignin besteht nahezu vollständig aus G (G-Lignin), Dicotyledon-Angiosperm-Lignin stellt eine Mischung aus G- und S- (GS-Lignin) und Monocotyledon-Lignin eine Mischung aller drei Typen (GSH-Lignin) dar. Das Polymer ist nahezu resistent gegen mikrobiellen (und enzymatischen) Abbau.<sup>[12]</sup>

## 2.2. Vorbehandlung

Ein erhebliches Problem für den Zugang der Enzyme zu den Polysacchariden in (Ligno)Cellulose-Material stellt die Resistenz der Pflanzenzellwand gegen biologischen Abbau dar. Dieses Kernproblem muss für eine kostengünstige Produktion von Treibstoffen und Chemikalien als erstes angegangen werden, um cellulosehaltige Feststoffe durch enzymatische Hydrolyse mit Ausbeuten von über 90 % in angemessener Reaktionszeit (bis zu einem Tag) abzubauen, und um hohe Zuckerkonzentrationen (über 10 % für Glucose, zusätzlich Arabinose und Xylose) für die anschließende Fermentation zu erzielen. Ohne Vorbehandlung wären die enzymatische Umsetzung der Substrate, die Reaktionsgeschwindigkeit und die Produktkonzentrationen zu niedrig und somit unwirtschaftlich. Schlüsselfaktoren sind deshalb das In-Lösung-Bringen der Hemicellulosen und die Veränderung der Ligninstruktur, sodass die Zugänglichkeit der Cellulose für hydrolytische Enzyme durch eine Struktur mit vergrößertem Porenvolumen, die entschützt, aufgebrochen und hydratisiert ist, verbessert wird. Die Eigenschaften des Substrats, die die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse bestimmen, umfassen die Zugänglichkeit für Enzyme und den Kristallisationsgrad, Regionen hoher Kristallinität sind von amorphen Regionen unterbrochen, von Hemicellulosen und durch Lignin geschützt. Die Bildung von Inhibitoren durch die Fermentation (Ameisen-, Essig- und Lävulinsäure, Furanderivate und phenolische Komponenten) muss minimiert werden. Ebenso wesentlich sind ein geringer Bedarf an Wärme- und elektrischer Energie, sowie geringe Kosten. In diesem Aufsatz kann nur kurz darauf eingegangen werden; allerdings umfassen neuere Übersichten zur Vorbehandlung alle wesentlichen Aspekte und sollten bezüglich einzelner Details herangezogen werden. Diese betreffen: die Zerkleinerung des Substrats, die Verbesserung der Zugänglichkeit, die Rolle der Entfernung von Komponenten, be-

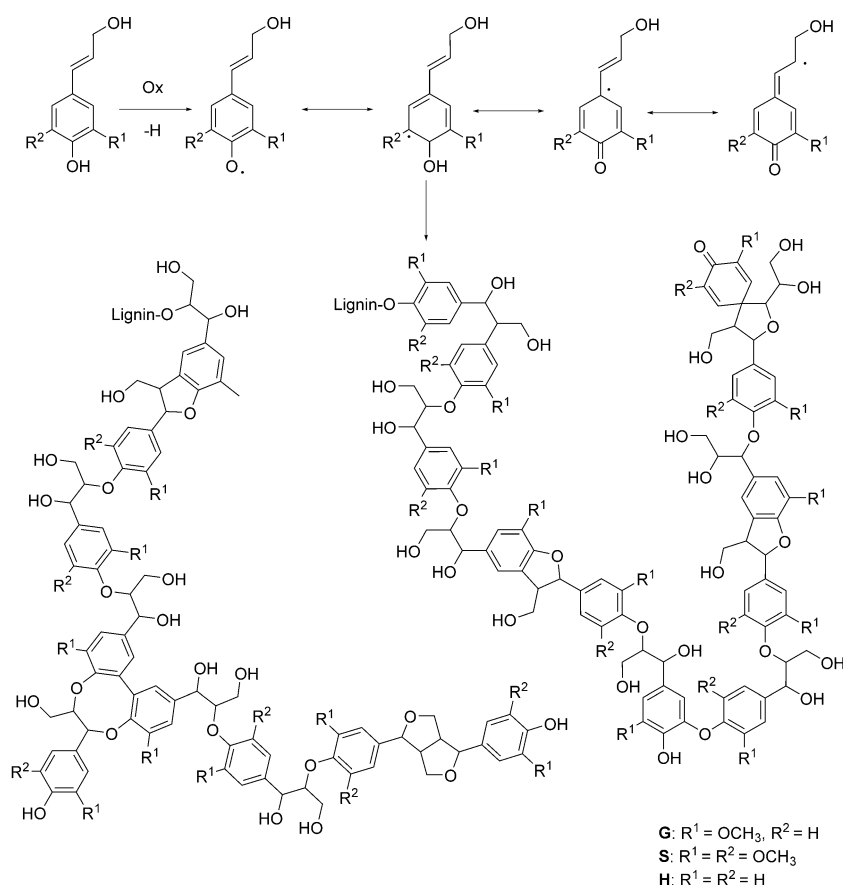


Uwe T. Bornscheuer studierte an der Universität Hannover Chemie und promovierte dort 1993. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der Universität Nagoya (Japan) habilitierte er sich 1998 am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart. Seit 1999 ist er Professor am Institut für Biochemie der Universität Greifswald. Er ist Editor-in-Chief von Eur. J. Lipid Sci. Technol. und Co-Chairman von ChemCatChem. 2008 wurde ihm der BioCat2008-Preis verliehen und 2012 die Chevreul-Medaille der französischen Gesellschaft für Lipidforschung.



Klaus Buchholz studierte Chemie an den Universitäten Saarbrücken und Heidelberg und promovierte 1969 an der TU München. In der Folge schuf er eine Forschungsgruppe für Enzymtechnologie bei der Dechema e.V. in Frankfurt/Main. 1981 habilitierte er sich an der TU Braunschweig, und ab 1982 war er am dortigen Institut für Landwirtschaftliche Technologie und Zuckerindustrie tätig. Von 1988 an stand er dem Institut vor, und 1991 erhielt er eine Professur für Kohlenhydrattechnologie am Institut für Technische Chemie an der TU.





**Schema 2.** Ligninsynthese und -struktur.<sup>[11]</sup> Der Polymerisationsschritt wird durch Peroxidase- und Laccaseenzyme katalysiert über kombinatorische radikalische Verknüpfungsreaktionen zwischen delokalisierten phenolischen Monolignol-Radikalen.

sonders bezüglich der Hemicellulose/des Lignins, die Inhibierung durch einzelne Komponenten, die Rolle der Reaktionsbedingungen und die substratspezifische Optimierung.<sup>[12, 13]</sup>

Die Elementarfibrillen der Cellulose und ihre Aggregation sind in der Natur ausgebildet in nativen Fasern, wie Baumwoll- oder Holzfasern und finden sich in unterschiedlichen Lagen von Zellwänden in typischen Anordnungen.<sup>[14]</sup> Drei verschiedene Arten von Polymeren – Cellulose, Hemi-

cellulosen und Lignin – sind eng untereinander verknüpft und hemmen den enzymatischen Abbau.

Leu und Zhu<sup>[13c]</sup> erkannten, dass die Entfernung von Hemicellulosen wichtiger ist als die von Lignin, um für Cellulasen zugängliche Poren zu erzeugen. Die partielle Entfernung von Lignin ist erforderlich, um eine hinreichende Verzuckerung von Lignocellulosen mit hohem Lignin-gehalt zu erzielen, z.B. bei Nadelholz. Behandlungen, die die Eigenschaften der Oberfläche von Lignin modifizieren, können effizient sein, um die Hemmung von Cellulasen durch Lignin zu reduzieren oder zu eliminieren, und so eine verbesserte Hydrolyse von Cellulose zu bewirken.

Die Dampfexplosion („steam explosion“) ist die am weitesten verbreitete physikalisch-chemische Methode für die Vorbehandlung von Lignocellulose-Biomasse, in der die Biomasse hohem Dampfdruck und hoher Temperatur (bis 240 °C) für einige Minuten ausgesetzt wird, und anschließend plötzlicher Entspannung unterworfen wird.<sup>[12]</sup> Diese Art der Vorbehandlung vereint mechanische Kräfte, verursacht durch die Dekompression, und chemische Effekte der Hydrolyse durch die Protonen des Wassers und der Acetylgruppen, die in Hemicellulosen vorliegen (Bildung von Essigsäure).

Lignin wird umgelagert und teilweise von den Fasern entfernt. Die Entfernung von Hemicellulosen exponiert die Celluloseoberfläche und erhöht so ihre Zugänglichkeit für Enzyme. Diese Vorbehandlung erzielt gute Umsetzung bei der enzymatischen Hydrolyse mit hoher Ausbeute an Zuckern und vermeidet gleichzeitig die Bildung von Inhibitoren. Sie hat sich für eine Reihe von Rohstoffen, z. B. Pappelholz und Reste aus landwirtschaftlichen Produkten wie Mais- und Weizenstroh, als effizient erwiesen. Sie eignet sich für die Übertragung in den industriellen Maßstab, erfordert relativ geringen Investitionsaufwand und bietet im Vergleich zu einer Vorbehandlung mit ionischen Flüssigkeiten ein größeres Potenzial für die Energieeffizienz.<sup>[12]</sup>

Für eine Vorbehandlung mit heißem Wasser wird dieses als Flüssigkeit unter Druck bei hohen Temperaturen angewendet (2–5 bar, 160–240 °C, Reaktionszeiten von wenigen Minuten bis zu einer Stunde), um Veränderungen der Struktur von Lignocellulosen zu bewirken, die bedingt sind durch die Verschiebung im pH-Wert des Wassers bei diesen Bedingungen.<sup>[12]</sup> Ziel dabei ist es, vorwiegend die Hemicellulosen zu hydrolysieren, um so die Cellulose besser zugänglich zu machen, und die Bildung von Inhibitoren zu vermeiden (unter anderem durch Kontrolle des pH-Wertes). Man erhält zwei Fraktionen: eine feste, Cellulose-reiche Fraktion und eine lösliche Fraktion, die reich an Hemicellulose-Oligomeren ist. Rohstoffe, die untersucht wurden, sind



Jürgen Seibel studierte Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen und promovierte bei Prof. Lutz F. Tietze. Im Jahr 2000 wechselte er an die Universität Oxford, wo er bei Professor Chris Schofield als Postdoktorand forschte. 2002 gründete er eine Nachwuchsgruppe an der Technischen Universität Braunschweig. 2006 schloss er seine Habilitation ab und wechselte 2007 an das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung. Seit 2009 ist er Professor am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg. 2008 wurde er mit dem Jochen-Block-Preis der Dechema ausgezeichnet, und 2012 erhielt er den DuPont Young Professor Award.

z. B. Mais- und Weizenstroh sowie Zuckerrohrbagasse. Eine ausführliche Studie ergab eine Steigerung der Glucoseausbeute ausgehend von natürlichem, nicht vorbehandeltem Weizenstroh von 3–9 % auf nahezu 100 % bei optimalen Bedingungen von 200 °C und 20 Minuten, wobei mit Celluclast (aus *T. reesei*) und Novozym 188 (beide von Novozymes A/S, Dänemark) kommerzielle Enzympräparate eingesetzt wurden.<sup>[13b]</sup> Die Methode erscheint besonders wegen ihres Kosteneinsparungspotentials und der kostengünstigen Reaktorkonstruktion (geringe Korrosionsgefahr) attraktiv.<sup>[12, 13h,j]</sup>

Eine Organosolv-analoge Prozessführung wurde lange zur Delignifizierung der Holz-Ultrastrukturen diskutiert.<sup>[15]</sup> Sie verwendet organische Lösungsmittel (z. B. Ethanol oder kurzkettige Alkohole) und Wasser, die Teile des Lignins und der Hemicellulosen auflösen, die so gelösten Lignin- und Hemicellulose-Bestandteile abtrennen und durch eine Änderung der Konzentration der organischen Lösungsmittel ihre Gewinnung ermöglichen. Die hohen Kosten der Lösungsmittel werden als prohibitiv für den Organosolv-Prozess angesehen.<sup>[16]</sup> Als Alternative wurde ein Zweiphasenverfahren für die Vorbehandlung von Biomasse vorgeschlagen. Dieser Organocat-Prozess verwendet eine wässrige Lösung von Oxalsäure als katalytisches Agens und 2-Methyltetrahydrofuran (MTHF) als organisches Lösungsmittel,<sup>[17]</sup> das Lignin auflöst, während die teilweise hydrolysierten Hemicellulosen in der wässrigen Phase gelöst werden. Cellulose bleibt als Feststoff übrig. Dieser Prozess wurde kürzlich hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit untersucht.<sup>[16]</sup> Der angenommene Energiebedarf liegt bei 5 MJ je kg Trockenbiomasse, vorwiegend aufgrund des Lösungsmittel-Recyclings. Die Attraktivität des Organocat-Prozesses beruht jedoch auf der effizienten Abtrennung des Lignins und der potenziellen Synthese von Aromaten, Propylen und Butadien.

### 3. Cellulose spaltende Enzyme

#### 3.1. CAZyme-Klassifizierung

Glycosid-Hydrolasen sind Schlüsselenzyme des Kohlenhydratmetabolismus, die in den drei grundlegenden Domänen (Archaeobakterien, Eubakterien, Eukaryoten) vorkommen. Die IUB-Enzymnomenklatur basiert auf den Reaktionstypen, die Enzyme katalysieren, und ihrer Substratspezifität. Bei Glycosid-Hydrolasen (EC 3.2.1.x) bezeichnen die ersten drei Ziffern Enzyme, die *O*-Glycosyl-Verknüpfungen hydrolysieren, während die letzten Zahlen das Substrat ausweisen und zuweilen den molekularen Mechanismus reflektieren. 1991 klassifizierte Henrissat Glycosid-Hydrolasen über Aminosäuresequenz-Ähnlichkeiten und schlug eine Änderung der Enzym Nomenklatur vor.<sup>[18]</sup> Durch das Zusammentragen von mehr Daten war die Datenbank CAZy – „Carbohydrate-Active enZymes“ (<http://www.cazy.org/>)<sup>[19]</sup> geboren. Die CAZy-Datenbank umschließt Familien strukturverwandter katalytischer und Kohlenhydrat-bindender Module (oder funktioneller Domänen) von Enzymen, die glycosidische Bindungen spalten, modifizieren oder bilden. Die CAZy-Datenbank umfasst 133 Glycosyl-Hydrolase-Familien<sup>[18, 20]</sup> (Glycosidasen und Transglycosidasen), 96 Glyco-

sytransferase-Familien,<sup>[21]</sup> 23 Familien von Polysaccharid-Lyasen<sup>[22]</sup> und 16 Familien von Kohlenhydrat-Esterasen. Jüngst wurden darüber hinaus Redoxenzyme, die in Verbindung mit CAZymes wirken, als „Hilfsaktivitäten“ aufgenommen.<sup>[23]</sup> Um die Familien zuordnen zu können, wurden ihnen Nummern gegeben, beispielhaft enthält die Glycosyl-Hydrolase-Familie-1-Enzyme, die eine TIM-Fass-Faltung aufweisen. Diese Familien bilden 14 verschiedene Clans, die Strukturähnlichkeiten gemein haben. Momentan sind in der Datenbank CAZyme Informationen von 2931 Bakterien-, 167 Archaea-, 76 Eukaryoten- und 255 Viren-Genomen enthalten.

CAZy-Daten können entweder durch Recherchen von sequenzbasierten Familien oder durch Genomrecherche der Kohlenhydrat-aktiven Enzyme genutzt werden. Die neuen Genome werden umgehend eingepflegt, sobald sie in den täglichen Veröffentlichungen von GenBank erschienen sind. Die Leitlinie der CAZy-Datenbank ist, alle Kohlenhydrat-aktiven Enzyme abzudecken und sie über Organismen und Subklassen der Glykowissenschaften zu klassifizieren.

Ein typisches Cellulasesystem umfasst drei Hauptaktivitäten: Endketten-spaltende Cellobiohydrolasen (CBH), Zwischenketten-spaltende Endoglucanasen (EG) und  $\beta$ -Glucosidasen (BGLs), die lösliche kurzkettige Glucooligosaccharide zu Glucose hydrolysieren. EGs agieren hauptsächlich an amorphen Strukturen der Cellulose. Verschiedene CBHs wirken möglicherweise bei amorphen und kristallinen Teilen der Cellulose. Während EGs neue Kettenenden erzeugen, hydrolysieren CBHs weiter und produzieren hauptsächlich Cellobiose (zwei Glucoseeinheiten), welches durch BGLs hydrolysiert wird und Glucose liefert. Die unterschiedlichen Enzymsysteme und das mannigfaltige Zusammenspiel von Kohlenhydrat-bindenden Modulen laufen sicherlich komplexer ab, als in Abschnitt 3.5 diskutiert wird.

#### 3.2. Vorkommen der CBM

Im Allgemeinen sind Glycosid-Hydrolasen für den Abbau von unlöslichen Polysacchariden ineffiziente Enzyme, da das Protein Schwierigkeiten hat, das Substrat in einer für die Katalyse geeigneten Position zu erreichen. Um diesen Einschränkungen entgegenzuwirken, sind Glycosid-Hydrolasen oft in modularer Weise organisiert. So beinhalten diese Systeme Hydrolasen als katalytische Module, die mit einem oder mehreren Kohlenhydrat-bindenden Modulen (CBMs) verknüpft sind. Diese CBMs sind der nichtkatalytische Abschnitt vieler auf Polysaccharide ausgerichteter Enzyme wie Cellulasen und Hemicellulasen, die an Zellwandpolymere binden. Aber wie funktionieren sie genau? Neue Kenntnisse legen nahe, dass CBMs das Eindringen des Enzyms in die Cellulosesubstrate fördern. Gilbert et al. haben dazu wichtige Fragen in einem exzellenten Artikel aufgeworfen: Welche sind die Kohlenhydratmotive, die von CBMs erkannt werden, und welche ihrer Strukturmerkmale treiben die Erkennung dieser Motive voran?<sup>[24]</sup>

Die CAZy-Datenbank gruppiert CBMs aufgrund ihrer ähnlichen Proteinsequenzen in 67 Familien,<sup>[25]</sup> und 54 dieser Familien sind bis jetzt strukturell vertreten. Die CBM-

Module sind weiter unterteilt in die Typen A, B und C. Diese Klassifizierung wurde eingeführt, um CBMs aufgrund ihrer Bindungsspezifität zu definieren, wobei TypA-CBMs die Oberfläche von kristallinen Polysacchariden binden. TypB-CBMs erkennen interne Kohlenhydratketten (Endo-Typ), und bei TypC-CBMs handelt es sich um solche Module, die die Enden von Glycanen binden (Exo-Typ).

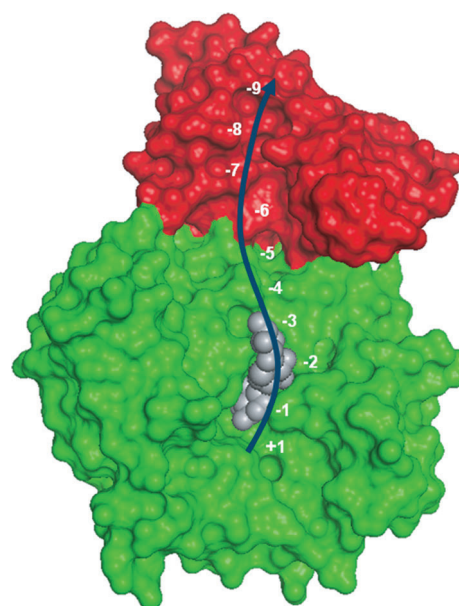
### 3.3. Zusammenspiel von CBM und Glycosid-Hydrolasen und Linkern

Es gibt verschiedene Mechanismen, die zur Bindung zwischen Kohlenhydraten und Proteinen, vertreten durch CBMs, Enzymen und Linker, beitragen. Ein typischer Mechanismus zwischen TypA-CBM63 von der  $\beta$ -1,4-(Exo)Glucanase Cex aus *Cellulomonas fimi* und unlöslicher bakterieller mikrokristalliner Cellulose ist die entropiegetriebene Expulsion von Wassermolekülen der hydrophoben Oberflächen der Cellulose und des Proteins.<sup>[26]</sup>

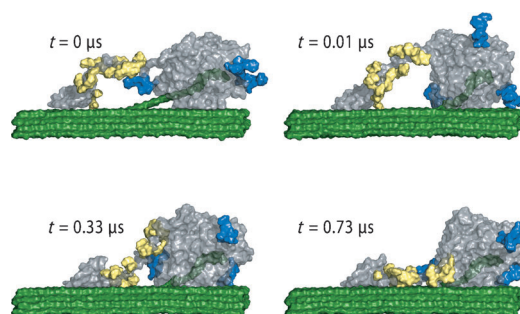
In weiteren Mechanismen wurde für die Kohlenhydraterkennung ein Zusammenwirken von CBM und der Hydrolase beobachtet. Xyn10B von *Clostridium thermocellum* ist ein typisches modular aufgebautes Enzym, welches ein N-terminales CBM der Familie 22 (CBM22-1), eine katalytische Domäne der Glycosid-Hydrolase-Familie 10 (GH10), ein zweites CBM22 (CBM22-2), eine Dockerin-Sequenz und eine C-terminale katalytische Kohlenhydrat-Esterase-Domäne der Familie 1 (CE1) enthält. Reste der Helix H4 des GH10-Moduls stellen die wesentlichen Kontakte her, indem sie in die kleine Mulde des CBM22-1-Moduls passen.<sup>[27]</sup> Die Orientierung von CBM22-1 ist so, dass das Substrat leicht gebunden und anschließend in prozessiver Weise dem aktiven Zentrum zugeführt werden kann (Abbildung 2).<sup>[27]</sup> Viele Enzyme, die Lignocellulose abbauen, sind multimodular mit CBMs und katalytischen Domänen über flexible glycosylierte Linker verbunden. Von diesen Linkern dachte man lange Zeit, dass sie einfach als Bindeglied zwischen den Strukturdomänen dienen. In jüngster Zeit wurde jedoch nachgewiesen, dass der Linker die Bindung über das CBM hinaus um eine Größenordnung verstärkt und eine dynamische Bindungsfunktion zum Substrat aufweist und demnach voraussichtlich ein wichtiger Akteur der Enzymaktivität ist (Abbildung 3).<sup>[28]</sup> MD-Simulationen vor und nach der Bindung des Linkers suggerieren gleichermaßen, dass der gebundene Linker die Enzymfunktion wegen der signifikanten Dämpfung der Enzyimbewegung beeinflussen könnte.

### 3.4. Multienzymkomplexe

Cellulosome sind Multienzymkomplexe, die Anfang der 1980er Jahre entdeckt wurden.<sup>[29]</sup> Die Cellulosome sind von cellulolytischen Mikroorganismen als Nanomaschinen für den effizienten Abbau von Cellulose und Hemicellulose entwickelt worden.<sup>[30]</sup> Die „Nanomaschinen“ sind aus zwei komplementären Strukturmodulen zusammengesetzt, die an zwei separierten und wechselwirkenden Untereinheitstypen lokalisiert sind. Das Cohäsin-Modul auf dem Scaffoldin



**Abbildung 2.** Struktur des vermeintlichen Xylan-Bindungskanals. Das CtCBM22-1-GH10-Monomer ist als Oberfläche dargestellt, um hervorzuheben, dass die CBM22-1- und GH10-Module (rot bzw. grün) eng verbunden sind. Die vermeintliche Ligandenbindungsfurche des CBM22-1-Moduls ist mit der katalytischen Tasche von GH 10 zur Bildung eines langen durchgehenden Kanals (Pfeil) abgestimmt, der mutmaßlich Xylanketten mit wenigstens 10 Xyloseeinheiten beherbergen kann. In der Kristallstruktur (PDB-Code: 2w5f) wird der Xylotriase-Teil in den Untereinheiten –1 bis –3 beobachtet.<sup>[27]</sup>



**Abbildung 3.** Moleküldynamik(MD)-Simulationen der Familie-6- und Familie-7-Cellobiohydrolasen aus *Trichoderma reesei* (TrCel6A und TrCel7A), gebunden an Cellulose. Die Vorhersage der MD-Simulationen wurde experimentell überprüft durch Bestimmung der Bindungsaffinität der Cel7A-CBM und des nativ glycosylierten Cel7A-CBM-Linkers. Auf kristalliner Cellulose steigert der glycosylierte Linker die Bindungsaffinität um eine Größenordnung. Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass glycosylierte Linker in Kohlenhydrat-aktiven Enzymen, die eigentlich ungeordnete Proteine in Lösung sind, die dynamische Bindung während des enzymatischen Abbaus der Pflanzenzellwand unterstützen.<sup>[28]</sup>

bindet ein Dockerin-Modul auf jeder enzymatischen Untereinheit.<sup>[31]</sup> Mit diesem Prinzip arbeiten viele cellulolytische Untereinheiten wie Endoglucanasen, Cellobiohydrolasen, Xylanasen und andere Enzyme zusammen, um heterogene, unlösliche Cellulosesubstrate gemeinsam abzubauen. Die Bindung des Cellulosoms an sein Substrat wird durch ein



Scaffoldin-gestütztes Cellulose-bindendes Modul (CBM) vermittelt. Über die Herstellung künstlicher Cellulosome zur Effizienzsteigerung des enzymatischen Zuckerabbaus wurde berichtet.<sup>[32]</sup> In einem chemischen Ansatz wurde ein Multi-cellulase-Konjugat auf einer Doppelstrang-DNA assembliert, und das resultierende DNA-(Endoglucanase)<sub>n</sub>-Konjugat wies eine einzigartige hydrolytische Aktivität gegen kristalline Cellulose (Avicel) auf, die vom Cellulase/DNA-Verhältnis dieses künstlichen Cellulosomes abhing (Abbildung 4).<sup>[33]</sup>

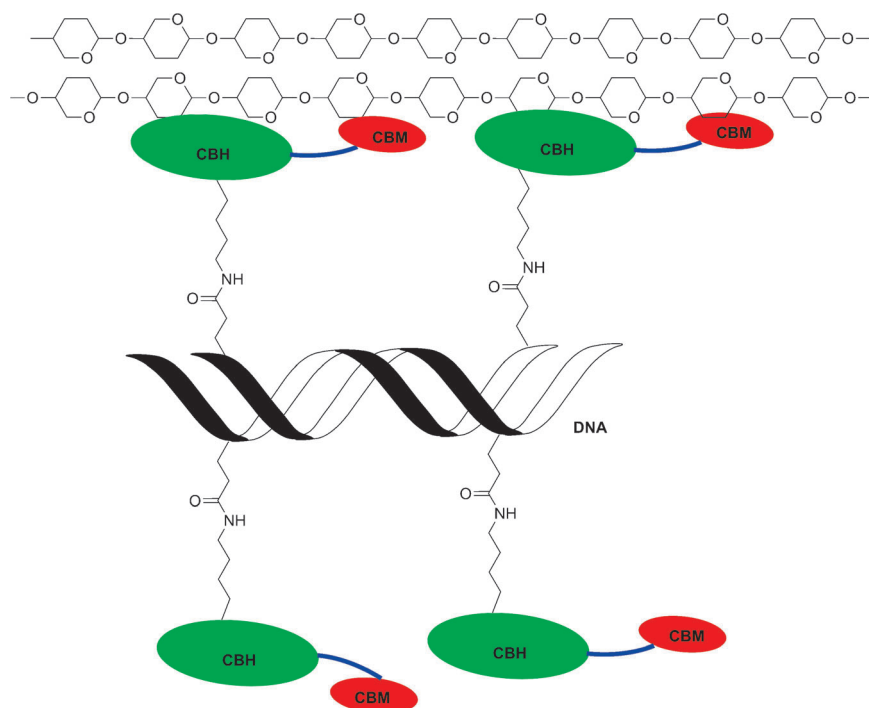


Abbildung 4. DNA-(EG)<sub>n</sub>-Konjugate zur Steigerung des celluloseischen Zuckerabbaus.

### 3.5. Reaktionsschritte, Synergie und Kinetik

Die Kinetik der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose ist hochkomplex, und es ist schwierig, rationale kinetische Modelle zu formulieren, die auf mechanistischen Reaktionsschritten basieren. Dies ist durch mehrere Aspekte bedingt, die sich aus dem Substrat- und Enzymkomplex herleiten, wobei letzterer erforderlich ist für die synergistische und somit effiziente Hydrolyse.<sup>[3,34]</sup> Das Substrat ist aus verschiedenen Sichtweisen und auf mehreren strukturellen Ebenen heterogen:

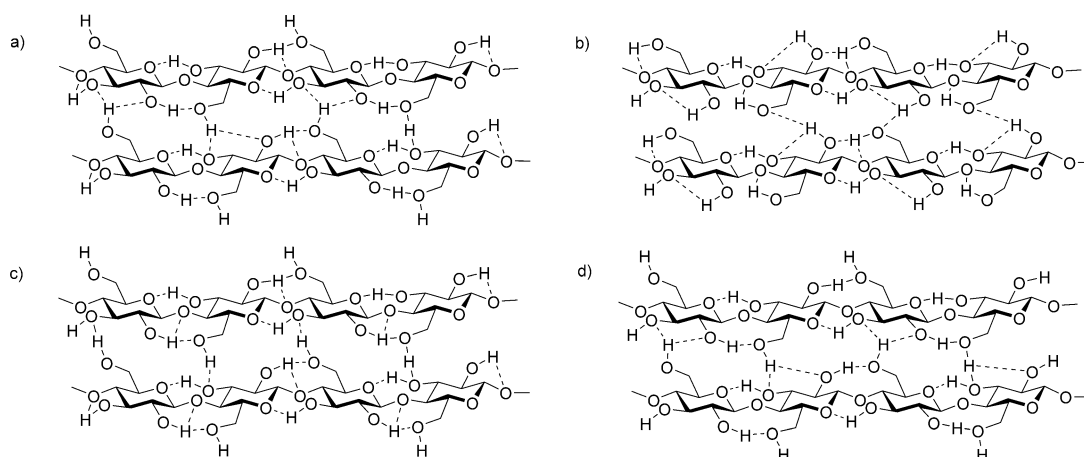
Die planaren Hexoseringe unterschiedlicher Polysaccharidketten sind in einer Ebene angeordnet und durch Stapelwechselwirkungen mit anderen Lagen der Celluloseketten verbunden, was eine enge Anordnung bedingt und einen hohen Organisationsgrad zwischen einzelnen Celluloseketten begünstigt sowie die Bildung eines stabilen intra- und intermolekularen Wasserstoffbrückennetzwerks zur Folge hat.<sup>[35]</sup> Dies führt zu dicht gepackten und hochorganisierten („kristallinen“) Regionen der Cellulose.<sup>[36]</sup> Die Cellulosekomponente schließt sowohl amorphe als auch kristalline Regionen ein, die ihrerseits unterschiedliche Größe und Zugänglichkeit

aufweisen und somit mit sehr unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten abgebaut werden. Diese Faktoren unterscheiden sich je nach Herkunft des Substrats. Darüber hinaus verändern sich die Strukturen und ihre relevanten Parameter, wie die Anzahl zugänglicher Bindungsstellen, die Kettenlänge und der Kristallisationsgrad, mit fortschreitendem Abbau.<sup>[3,34a]</sup> In der technischen Anwendung ist das Substrat nicht nur aus Cellulose zusammengesetzt, sondern auch aus weiteren Komponenten, wie unterschiedlichen Hemicellulosen, insbesondere Arabinoxylanen verschiedener Struktur, die die Cellulose schützen und die Zugänglichkeit behindern können, was besonders durch Lignin bedingt ist (Schema 3).

Relevante Faktoren für die Hydrolyse sind: 1) Zugänglichkeit, 2) Oberfläche, 3) Kristallinität, 4) Polymerisationsgrad, 5) Lignin- und Hemicellulose-Gehalt, 6) Veränderungen der Parameter während des Abbaus und 7) Vorbehandlung.<sup>[37]</sup> Zu berücksichtigen sind darüber hinaus Adsorption und Desorption sowie unproduktive Bindungen verschiedener Enzymaktivitäten an unterschiedlichen, heterogenen Substratstellen.<sup>[34b,38]</sup> Darüber hinaus kann Diffusion eine Rolle spielen.<sup>[39]</sup> Einzelschritte der Enzymhydrolyse sind: Adsorption an der (heterogenen) Substratoberfläche; laterale Diffusion auf der Oberfläche; Komplexbildung; katalytischer Schritt; Dekomplexierung; Desorption.<sup>[34b]</sup>

Ein typisches Cellulasesystem umfasst drei Hauptaktivitäten: Cellobiohydrolasen (CBH), die vom Kettenende her spalten, in der Kette spaltende Endoglucanase (EG) und  $\beta$ -Glucosidasen (BGL), die lösliche kurzkettige Oligosaccharide zu Glucose hydrolysieren. Die Cellobiohydrolasen zeigen darüber hinaus vorzugsweise hydrolytische Aktivität für die Cellulosekette vom reduzierenden Ende her (CBH I) oder vom nichtreduzierenden Ende her (CBH II). Die drei vorherrschenden hydrolytischen Enzyme wirken synergistisch.<sup>[3,34]</sup>

Aktuelle Untersuchungen mit modernen Methoden, wie Proteinstrukturanalyse,<sup>[40]</sup> In-situ-Rasterkraftmikroskopie (AFM),<sup>[34a,41]</sup> PALM mit zweidimensionaler interner Reflexionsfluoreszenz (TIRF-PALM), Cohäsin-Dockerin-Wechselwirkungen<sup>[30]</sup> und differenzielle kinetische Analyse,<sup>[34b]</sup> zeigen die Details der komplexen Wechselwirkung der Enzyme mit dem Substrat.<sup>[3]</sup> So ermöglicht In-situ-Bilderfassung (z.B. mit AFM) den Einblick in dynamische Vorgänge der enzymatischen Reaktionsschritte und des Celluloseabbaus bis zur meso- und nanomorphologischen Ebene und sogar bis zur Ebene einzelner Enzymmoleküle. Auf diese Weise wird ein Einblick in die Cellulaseaktivität auf der Celluloseoberfläche möglich, und es lassen sich quantitative Informationen zur Dynamik auf der Oberfläche, zur Identifizierung von Hindernissen sowie zu geschwindigkeitsbe-



**Schema 3.** H-Brücken-Anordnungen in Cellulose I $\alpha$  und I $\beta$  nach Sturcova et al.<sup>[35]</sup> Oben: die beiden alternativen H-Brücken-Netzwerke in Cellulose I $\alpha$ . Unten: das dominierende H-Brücken-Netzwerke in Cellulose I $\beta$ . Links: in den Ketten am Ursprung der Elementarzelle des Kristalls. Rechts: Ketten im Zentrum der Elementarzelle.

stimmenden Schritte erhalten. Die in verschiedenen Studien angewendeten Methoden zur Visualisierung haben entscheidend unsere Kenntnisse erweitert und ermöglichten es, ein verfeinertes Modell des enzymatischen Celluloseabbaus zu entwickeln.<sup>[34a]</sup>

Die Adsorption verschiedener Cellulasen wird vermittelt durch Cellulose bindende Module (CBM), von denen zwei Kategorien, gebunden an cellulolytische Enzyme, identifiziert wurden (einerseits spezifisch für kristalline, andererseits für amorphe Regionen). Die für kristalline Regionen spezifische CBMs binden bevorzugt an Graten, die typisch sind für lineare Regionen mit parallel laufenden Glucanketten. TrCBH I (Cellobiohydrolase I von *Trichoderma reesei*) bindet vorzugsweise an der hydrophoben Seiten von kristallinen Cellulose-Mikrofibrillen.<sup>[42]</sup> Die Bindestellen für CBH I auf kristalliner Cellulose sind rar wegen der dichten Packung der Ketten und der Lage der Kettenenden in unzugänglichen Bereichen im Kristall. Die für amorphe Regionen spezifischen CBM binden eher gleichmäßig verteilt an der Oberfläche, indem sie fest an herausgehobene Glucanketten anhaften.<sup>[34b]</sup> Endoglucanasen (EG) bevorzugen amorphe Regionen.<sup>[3,34a]</sup> CBMs können vermutlich auch an nichthydrolytischer Zersetzung der Substrate beteiligt sein (Amorphogenese).<sup>[43]</sup> Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass weitere nichthydrolytische Proteine die Amorphogenese unterstützen.<sup>[44]</sup>

Die Diffusion der Enzyme in Hohlräume (Löcher) des festen Substrats wurde von Luterbacher et al.<sup>[38]</sup> untersucht und modelliert, dies wird hier aber aus zwei Gründen nicht behandelt: Der Effekt hängt von der Partikelgröße ab, die durch Vorbehandlung in eine geeignete Größe eingestellt werden kann, und die Reaktionsgeschwindigkeiten fallen drastisch ab nach dem Start der Reaktion, sodass der Einfluss der Diffusion abnimmt.

In ihren Untersuchungen von *Trichoderma-reesei*-TrCBH II mit Cellulosekristallen (*Valonia*) beobachteten Chanzy und Henrissat,<sup>[45]</sup> dass das Enzym von einem bestimmten Ende her, dem nichtreduzierenden Ende des ausgedehnten Kristalls, arbeitet, sodass dieses Ende des Kristalls

geschärft wird. Dieser Effekt lässt vermuten, dass der Abbau der kristallinen Cellulose schichtweise vom leicht zugänglichen äußeren Ende der Celluloseketten am Kristallende erfolgt. Dagegen beginnt der Abbau durch TrCBH I vom reduzierenden Ende her.<sup>[46]</sup> Weitere Hinweise legen nahe, dass TrCBH I entlang der Mikrofibrille<sup>[42b]</sup> gleitet, und Igarashi et al.<sup>[41]</sup> konnten sogar die Geschwindigkeit von TrCBH I mit  $3.5 \text{ nm s}^{-1}$  bestimmen.

### 3.5.1. Synergien

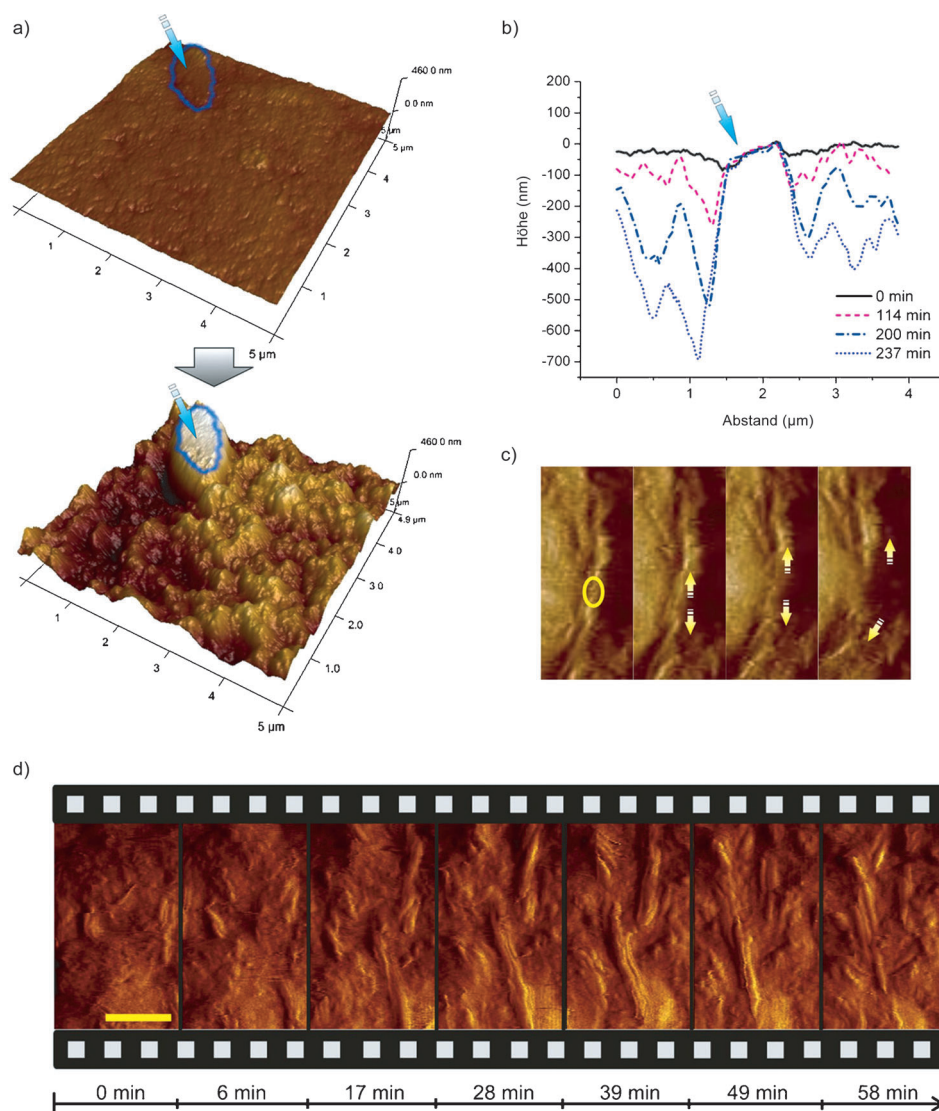
Der Cellulasekomplex mit verschiedenen Funktionen und Aktivitäten arbeitet synergistisch (und muss es, um effizient zu sein). Kooperativität und Synergie werden nicht vollständig verstanden.<sup>[3]</sup> Synergie bedeutet, dass die Hydrolysegeschwindigkeit der drei wichtigsten Enzymaktivitäten signifikant höher ist, im Sinne des Celluloseabbaus, und die Summe der Geschwindigkeiten der einzelnen Enzyme übersteigt.<sup>[3,34,47]</sup> Synergistische Effekte der Kombination von Endo- und Exo-Enzymen wurden schon früh mit jedem der CBH-Enzyme beobachtet.<sup>[45,48]</sup> Endo- und Exo-Synergie wird allgemein erklärt mit der Schaffung neuer Kettenenden durch CBH-Angriffe statistisch schneidender EGs.<sup>[49]</sup> Im Einzelnen machen EG und CBH II die Celluloseoberfläche zugänglich für CBH I durch Abbau amorph-ungeordneter Oberflächenbereiche und exponieren auf diese Weise die zuvor eingebetteten kristallin-geordneten Nanofibrillen der Cellulose. Anschließend werden diese Fibrillen effizient durch CBH I abgebaut, wodurch neue amorphe Regionen exponiert werden. Daraus wurde geschlossen, dass die Synergie zwischen den Cellulasen morphologieabhängig und bedingt ist durch die Kooperativität dieser Enzyme.<sup>[34a]</sup>

Biochemische Studien ergaben, dass der synergistische Abbau des polymorphen Substrats durch das komplette Cellulasesystem zu 90 % Umsatz führte; die Geschwindigkeit der Zuckerfreisetzung wurde infolge der Synergie von EG und CBH II vierfach beschleunigt, und darüber hinaus wurde nach Zugabe von CBH I eine sechsfache Erhöhung der Hydrolysegeschwindigkeit beobachtet. Die Kooperativität zwi-



schen dem Endo-Exo-System (EG und CBH II), das die Cellulose vorbereitet oder modifiziert, und einer Exocellulase (CBH I, mit deutlicher Präferenz für höher geordnete Bereiche) ist also essenziell, und diese morphologieabhängige Synergie stellt damit die primäre Synergie dar.<sup>[34a]</sup>

In einer hervorragenden Publikation über AFM-Studien analysierte die Gruppe um Nidetzky,<sup>[34a]</sup> unter Nutzung des kompletten Cellulasesystems von *T. reesei*, den vertikalen Abbau von polymorpher Cellulose, indem sie viele Stellen auf der Oberfläche hinsichtlich der zeitlichen Veränderungen verfolgten und große Kristallite als Bezug nutzten. Das Substrat war gemischt amorph-kristalline Cellulose bestehend aus Kristalliten und kleinen kristallinen Fibrillen. Die Masse des amorphen Materials wurde zuerst abgebaut, die großen Kristallite dagegen extrem langsam. Die Analyse führte zu dem Schluss, dass Cellulasen das amorphe Material, das die Kristalle umgibt, zuerst abbauen, und anschließend die Fibrillen, was wiederum amorphes Material freilegt. Fibrillen werden auf unterschiedliche Weise abgebaut (Abbildung 5), vor allem beginnend von den Seitenwänden, aber auch durch Abbau von den Enden her, und durch die Bildung von Defekten in der Fibrillenmitte (Abbildung 5c,d). Sobald ein neuer Defekt entstanden war (Abbildung 5c, Kreis im linken Bildteil), verlief der Abbau schnell von den beiden neuen Enden her (Abbildung 5c, Pfeile). Es konnten bemerkenswert unterschiedliche Abbaugeschwindigkeiten identifiziert werden: Sobald sie frei liegen, werden kleine kristalline Fibrillen signifikant schneller abgebaut ( $(3.8 \pm 0.2) \text{ nm min}^{-1}$ ) als die übrige amorphe Matrix ( $(0.7 \pm 0.2) \text{ nm min}^{-1}$ ). Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt stark ab von Kristallgröße und -form sowie von der Zugänglichkeit der Bindungsstellen am Kristall.<sup>[34a]</sup>



**Abbildung 5.** In-situ-Untersuchung des synergistischen Abbaus polymorpher Cellulose durch das komplette Cellulasesystem von *T. reesei*. a) Substrat-Oberfläche zu Beginn ( $t=0$  min) und nach Inkubation ( $t=237$  min) mit dem kompletten Cellulasesystem. Ein typischer großer Kristallit, der als Marker genutzt wurde für die Änderung der Höhe, ist markiert. Das Substrat darum wird abgebaut, während der Kristallit selbst im Wesentlichen unverändert bleibt. b) Profile der Sektionen, die in (a) gezeigt werden, geben die Volumenänderung beim Abbau mit der Zeit an. Relativ zu dem Marker wurde das Substrat darum bis zu 700 nm in 237 min abgebaut. c) In-situ-Beobachtung eines Defekts (Kreis) der in eine Fibrille eingebracht wurde. Danach wird die Fibrille angegriffen und abgebaut von beiden neuen Enden her, die durch den Defekt erzeugt wurden (Pfeile). d) Schnappschüsse zeigen den anfänglichen Abbau amorpher Regionen (17 min). Zuvor verdeckte kristalline Fibrillen treten hervor (28 min) und werden schnell in prozessiver Weise abgebaut, beginnend an ihren Enden sowie an zuvor eingebrachten Defekten (49 min). Maßstab 100 nm.<sup>[34a]</sup>

### 3.5.2. Reaktionskinetik

Die Kinetik stellt Schlüsselinformationen für mechanistische Details einer Reaktion zur Verfügung, ebenso für die Reaktionstechnik, das Reaktordesign und die Maßstabsvergrößerung. Für den Celluloseabbau kann jedoch keine einfache, mechanistisch abgeleitete Kinetik formuliert werden aufgrund der komplexen Substrate, mit Hemicellulose- und Ligninkomponenten, der verschiedenen Vorbehandlungsmethoden, einer Reihe komplexer Ereignisse und Reaktions-

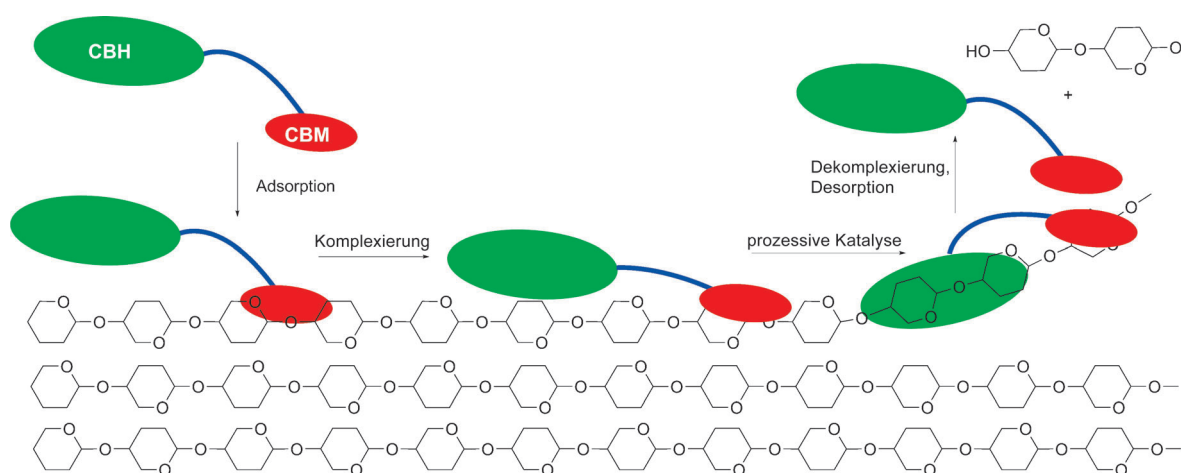
schritte. Und daher steht bis heute kein rationales Modell zur Verfügung, das alle Effekte und Befunde einbezieht.<sup>[50]</sup> Ein Beitrag von Bansal et al.<sup>[51]</sup> gibt eine Übersicht über publizierte Konzepte und Modelle zu Cellulasekinetiken. Daher wird hier nur eine kurze Zusammenfassung gegeben. Ein mathematisches Modell – basierend auf experimentellen Daten – sollte die wichtigsten Enzymaktivitäten einbeziehen (Endo-spaltende Aktivitäten EG; Exo-spaltende CBH, BGL), um eine rationale Basis zu ergeben für das optimale Design von Enzymmischungen, die hinsichtlich der Struktur des Substrats und der Vorbehandlungsmethode (auch Xylanasen, Arbanasen, Galactanasen usw. sind gegebenenfalls einzubeziehen) unterschiedlich sein werden.

Es wurde gezeigt, dass Endoglucanasen die Aktivität der Cellobiohydrolasen bedeutend erhöhen, nicht nur durch die Erzeugung freier Kettenenden, sondern auch durch Änderungen der Substratoberfläche in der Art, dass die prozessive Aktionslänge des Enzyms vergrößert wird. Mögliche, zu diskutierende Reaktionsschritte sind (Abbildung 6; mit Bezug zu unter anderem Lit. [41,47,52]): 1) Eine Cellobiohydrolase adsorbiert an die kristalline Region einer Celluloseoberfläche mittels ihrer CBM-Domäne. 2) Das Enzym diffundiert entlang der Oberfläche und bildet Komplexe mit einem Cellulose-Kettenende mit seiner katalytischen Domäne. 3) Es katalysiert einen einleitenden hydrolytischen Schritt, indem es Glucose, Cellobiose oder Cellotriose bildet (G1, G2 oder G3). 4) Es katalysiert nachfolgende hydrolytische Schritte, indem es nur noch G2 bildet, während es prozessiv entlang der Kette gleitet. 5) Es löst sich von der Cellulosekette ab (dekomplexiert). 6) Es bildet erneut einen reaktiven Komplex mit einer Cellulosekette oder desorbiert von der Oberfläche. Mit Endoglucanasen erfolgen ähnliche Schritte, es wird aber angenommen, dass sie in nichtprozessiven, statistischen Schritten amorphe oder gering kristalline Regionen mit einzelnen exponierten Ketten angreifen.

Fox et al.<sup>[53]</sup> analysierten quantitativ Einzelschritte eines Modellsystems (Hydrolyse bakterieller mikrokristalliner Cellulose, BMCC) einerseits durch eine Cellobiohydrolase allein und andererseits in Gegenwart einer Endoglucanase, wobei sie Differentialgleichungen verwendeten. Die Analyse

ergab, dass die Geschwindigkeit der durch *Trichoderma-longibrachiatum*-Cellobiohydrolase I (TlCel7A) katalysierten Hydrolyse kristalliner Cellulose begrenzt ist durch die Enzymkomplexbildung mit Glucanketten, was äquivalent ist zu der Geschwindigkeit der Bildung der Anfangsprodukte („initial-cut products“, G1, G2, G3). Diese Geschwindigkeit wird erhöht in Gegenwart von Endoglucanasen.<sup>[53]</sup> Die Ergebnisse der Studie und vorausgehende Arbeiten zeigten, dass die TlCel7A-Cellobiohydrolase eine unidirektionale prozessive Katalyse auf der hydrophoben Oberfläche des Kristalls ausführt,<sup>[41,42b]</sup> und dass die Komplexbildung der Cellobiohydrolase langsam erfolgt relativ zu anderen kinetischen Schritten und somit geschwindigkeitsbegrenzend ist (Abbildung 5).<sup>[53]</sup> Die Abschätzung der prozessiven Schrittlänge verschiedener Enzymmischungen basierte auf den Verhältnissen der Konzentrationen von prozessiv gebildeten Produkten („processive-cut products“) zu denen des Anfangsschritts („initial-cut products“) für ein prozessives Enzym, wobei sich Werte im Bereich von 10 bis 20 Einzelschritten ergaben. Diese Werte sind überraschenderweise um zwei Größenordnungen niedriger als Abschätzungen der intrinsischen Prozessivschrittlänge der *Trichoderma* Cel7A-Enzyme auf dem gleichen Substrat – ein Widerspruch, der unaufgelöst bleibt.<sup>[53]</sup> Die Autoren schließen daraus, dass die Morphologie der Oberfläche die Prozessivität begrenzt, und dass prozessive Cellobiohydrolasen offenbar durch physikalische Hindernisse oder andere, die Dekomplexierung begünstigende Faktoren, gehemmt werden – in Übereinstimmung mit vorangehenden Arbeiten, die zeigten, dass die prozessive Schrittlänge von der Natur des Substrats abhängt.<sup>[52]</sup>

Fortgeschrittene Modelle des Mechanismus ausgewählter Schritte wurden von den Gruppen um Clark und Blanch<sup>[54]</sup> entwickelt, die Modellsysteme verwendeten (mikrokristalline Cellulose, wobei das feste Cellulosesubstrat als Ansammlung sphärischer Partikel, bzw. als BMCC, repräsentiert war), sowie mit Einzelaktivitäten und mit Mischungen von Endo- und Exocellulasen. Sie schließen Produktinhibition ein, thermische Inaktivierung und Oberflächenheterogenitäten des Substrats. Allerdings unterscheiden sie nicht amorphe



**Abbildung 6.** Allgemeine Reaktionsschritte von Cellobiohydrolasen bei der Hydrolyse unlöslicher Cellulose. Reaktionsschritte von Endoglucanasen dürften ähnlich sein, sie erfolgen jedoch nicht in prozessiven katalytischen Sequenzen.<sup>[53]</sup>

und kristalline Anteile. Sie berücksichtigen weder komplexere Substrate noch  $\beta$ -Glucosidase-Aktivitäten, sie geben dennoch einen detaillierten Einblick in einzelne Reaktionsschritte. Der Artikel gibt einen kritischen Überblick vorangehender kinetischer Modelle, deren Brauchbarkeit durch weitere vereinfachende Annahmen erheblich begrenzt war.

Die für einzelne Enzyme erhaltenen Ergebnisse (*T. reesei* Endoglucanase 2, EG 2, und Cellobiohydrolase 1, CBH I) und Systeme mit beiden Enzymen wurden verglichen mit Literaturdaten. Das Modell war empfindlich bezüglich der für Cellulasen zugänglichen Oberfläche; die experimentell beobachtete Synergie zwischen EG 2 und CBH I wurde nur bei hinreichend großer Celluloseoberfläche vorausgesagt, und die Bedeutung der Trennung von Adsorptions- und Komplexierungsschritt wurde durch das Modell aufgezeigt; die individuelle Kettenlänge und der zeitliche Verlauf bezüglich der Celluloseoberfläche (Schrumpfen) wurden ebenfalls berücksichtigt. Adsorption und Desorption der Cellulasen wurden erfasst durch Gleichgewichte von Bindungsstellen und Enzymen, die Konzentrationen von Celluloseoberflächen-Bindungsstellen und Enzymen in Lösung ergeben. Gleichgewichte und Differenzialgleichungen für die Enzyme (einschließlich Lösungs-, Adsorptions- und Inhibitionsprozessen – hier nicht gezeigt) sowie die Oberflächenkonzentration fester Celluloseketten (mit einer Länge  $i > 6$ ) wurden abgeleitet [Gleichung (1)]. Eine Differenzialgleichung für die Bildung von Cellobiose ist mit Gleichung (2)<sup>[\*]</sup> gegeben.<sup>[54a]</sup> Kinetische Parameter wurden der Literatur entnommen.

$$\frac{d[C'_i]}{dt} = \frac{k_{\text{cat-EG-cel}}}{k_{\text{M-EG-cel}}} [E'_{\text{EG-ads}}] \theta_{\text{EG}} \left( 2 \sum_{j=i+1}^{\infty} [C'_j] - (i-1)[C'_i] \right) + \frac{k_{\text{cat-CBH-cel}}}{k_{\text{M-CBH-cel}}} [E'_{\text{CBH-ads}}] \theta_{\text{CBH}} ([C'_{i+2}] - [C'_i]) \quad (1)$$

$$\frac{d[C_2]}{dt} = \left( 2 \frac{k_{\text{cat-EG-cel}}}{k_{\text{M-EG-cel}}} [E'_{\text{EG-ads}}] \theta_{\text{EG}} \sum_{i=7}^{\infty} [C'_i] + \frac{k_{\text{cat-CBH-cel}}}{k_{\text{M-CBH-cel}}} [E'_{\text{CBH-ads}}] \theta_{\text{CBH}} \sum_{i=7}^{\infty} [C'_i] \right) \frac{A_{\text{cel}}}{V_{\text{liq}}} \quad (2)$$

Mit erheblicher Verstärkung der Inhibierung durch Cellobiose und der thermischen Inaktivierung konnte das Modell den Abfall der Hydrolysegeschwindigkeit wiedergeben, der aus den experimentellen Daten hervorgeht. Starke Inhibierung durch Cellobiose war dazu erforderlich:  $K_i = 0.01$  mM für EG2 und  $K_i = 0.093$  mM für CBH I. Die Einbeziehung kurzer Halbwertszeiten bei der thermischen Inaktivierung ermöglicht es, mit dem Modell quantitative Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zu erzielen, einschließlich der Synergie von EG 2 und CBH I. Die Halbwertszeiten waren allerdings um bis zu einer Größenordnung kleiner als die für das *T. reesei*-Cellulasegemisch bekannten. Zusätzliche Mechanismen, die die Enzymaktivität limitieren, müssen daher untersucht werden.<sup>[54a]</sup> (Siehe auch Lit. [53] für zusätzliche experimentelle Daten.)

Die Inhibierung der Cellobiohydrolase-Enzyme durch Glucose und Cellobiose ist bekannt. In einer neueren Studie berechneten Bu et al.<sup>[55]</sup> die freien Bindungsenergien für Cellobiose an die katalytische Domäne von Cel7A bei *T.*

*reesei*. Für die Anwendung bei technischen Cellulosesubstraten bleiben experimentelle Untersuchungen essenziell, bezüglich (vorbehandelter) Substrate und ihrer Konzentration, unterschiedlicher Enzymmischungen und deren Konzentration, der Reaktionszeit, des pH-Wertes und der Temperatur, um optimale Ergebnisse zu erzielen hinsichtlich minimiertem Enzymeinsatz, hohem Umsatz und Ausbeute, und hoher Endkonzentration.<sup>[2a]</sup> Zum Beispiel zeigten Experimente mit Celluclast 1.5 aus *T. reesei* (Novozymes) die Eignung minimierter Enzymmischungen für vorbehandelte Lignocellulose-Biomasse, die anders zusammengesetzt war als die ursprüngliche Enzymmischung, wobei statistisch variierte Kombinationen der vier Hauptaktivitäten (zwei CBHs und zwei EGs) eingesetzt wurden.<sup>[56]</sup> Zahlreiche empirische Modelle sind publiziert worden, die es ermöglichen, unterschiedliche beobachtete Effekte quantitativ zu erfassen. South et al. formulierten die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante als Funktion des Umsatzes mit Gleichung (3).<sup>[57]</sup>

$$k(x) = k(1-x)^n + c \quad (3)$$

Dabei ist  $k$  die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Hydrolyse,  $x$  der Umsatz,  $k(x)$  die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante beim Umsatz  $x$ ,  $n$  der Exponent der abnehmenden Geschwindigkeitskonstante und  $c$  eine Konstante. Die Parameter  $n$  und  $c$  wurden abgeschätzt durch Anpassung von  $k(x)$  an den Umsatz ( $x$ ). Diese Gleichung wurde später benutzt, um SSF („simultaneous saccharification and fermentation“) mit hintereinander, als Stufenprozess angeordneten Reaktoren und intermediärer Zugabe von Enzymen und Substrat zu modellieren.<sup>[58]</sup> Adsorptionsgleichungen, z. B. die Langmuir-Isotherme, sind in Hydrolysemodelle integriert worden, wobei der Umsatz und vier verschiedene Cellulosesubstrate berücksichtigt wurden.<sup>[47,51]</sup>

Ein weiteres empirisches Modell für einen kommerziellen Cellulasekomplex (Cellubrix, Novozymes) und ein Modellsubstrat (Avicel) einerseits, und vorbehandeltes Weizenstroh andererseits wurde von Drissen et al.<sup>[59]</sup> entwickelt. Das mathematische Modell berücksichtigte verschiedene Phänomene, wie die Adsorption der Enzyme am Substrat, die Substratheterogenität, einschließlich des Substratumsatzes (bezeichnet als „substrate recalcitrance“), die Inhibierung durch Glucose, die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von der Temperatur (mit der Aktivierungsenergie  $E_a = 29.8$  kJ mol<sup>-1</sup>) und die thermische Inaktivierung der Enzyme (unter Annahme einer Reaktion erster Ordnung,  $E_a = 148$  kJ mol<sup>-1</sup>).

[\*] Anmerkung zu Gleichung (1):  $E'$  bedeutet unkomplexiertes adsorbiertes Enzym, und  $\theta$  ist die Fraktion freier Bindungsstellen auf der Oberfläche, die für CBH oder EG verfügbar ist. Subskripte: ads für adsorbiertes Enzym; cel für feste Cellulose;  $i, j$  für die Länge der Cellulosekette. Anmerkung zu Gleichung (2): Diese Gleichung ist vereinfacht, sie soll das Prinzip des kinetischen Ansatzes zeigen; sie enthält nicht Terme für lösliche Zwischenprodukte mit 3 bis 6 Glucoseeinheiten, für die niedrige Konzentrationen angenommen werden; für die vollständigen Gleichungen sollte der Leser die Originalpublikation heranziehen.<sup>[54a]</sup>



#### 4. Aspekte der Reaktionstechnik, Pilot- und Demonstrationsanlagen

Die Prozess- und Reaktionstechnik müssen Reaktorkonzepte entwickeln, die die erforderliche Verweilzeit sowohl für hohen Umsatz als auch für hohe Produktkonzentration gewährleisten. Besonders wichtig ist es, die Produkthemmung zu minimieren, sodass geringere Enzymmengen erforderlich sind. Die Prozessschritte Vorbehandlung, Hydrolyse und Fermentation müssen als Gesamtprozess betrachtet werden, um die Ethanolausbeute zu maximieren und die Prozesskosten niedrig zu halten. Um die Enzymkosten zu minimieren, haben Genencor und Novozymes, beginnend im Jahr 2000, mithilfe beträchtlicher Mittel des US-amerikanischen Department of Energy (DOE) ein größeres Forschungs- und Entwicklungsprogramm erfolgreich durchgeführt und die Kosten für die Herstellung von Cellulasen von mehr als 1.3 \$ auf weniger als 5.3 Cent pro L gesenkt. Die enzymatische Hydrolyse kann entweder getrennt von der Fermentation durchgeführt werden (SHF, „separate hydrolysis and fermentation“) oder in Kombination mit der Fermentation (SSF, „simultaneous saccharification and fermentation“). SSF vermeidet den hauptsächlichen Nachteil getrennter Hydrolyse, verursacht durch Produktinhibierung der Enzyme durch die gebildeten Mono- und Disaccharide. Das Prozessdesign erfordert Kompromisse hinsichtlich Reaktionstemperatur und pH-Wert; die Hydrolyse durch Enzyme aus *T. reesei* verläuft optimal bei pH 5 und 50°C, aber die Einstellung auf Fermentationsbedingungen bei pH 5.5–7 und 30–40°C ist erforderlich.<sup>[60]</sup> In einer Modellrechnung durch Galbe und Zacchi aus dem Jahr 2007 ergab sich eine Gesamt-Ethanolausbeute von 296 L je Tonne trockenes Substrat, einschließlich Ethanolverlusten im Prozess, und unter Berücksichtigung des Zuckeranteils, der für das Wachstum der Hefe erforderlich ist.<sup>[60d]</sup> Das entspricht 69 % des theoretischen Werts auf der Basis des Hexosan-Anteils im Rohmaterial.

Neue Entwicklungen begünstigen jedoch den SHF-Prozess aus mehreren Gründen: Ein neuer Enzymcocktail (Cellic CTec 2, Novozymes) ergibt um 16–17 % höhere Gesamtausbeuten an Ethanol, wenn er separat in der Hydrolyse eingesetzt wird, mit optimaler (höherer) Temperatur, mit höherer  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität, die die Hemmung durch Cellobiose reduziert, und mit einer weiteren Aktivität, einer lytischen Polysaccharid-Monooxygenase (LPMO), die Sauerstoff erfordert.<sup>[61]</sup> Die Untersuchungen wurden mit Weizenstroh durchgeführt, das einer hydrothermalen Vorbehandlung unterworfen wurde (bei 195°C mit einer Verweilzeit von 18.5 min, gefolgt von einem Waschschrift). Das Verfahren wurde bei sehr hohem Trockensubstanzgehalt durchgeführt (20 und 30 % TS), welcher als wesentlich erachtet wurde, um die Bioethanolherstellung in wirtschaftlicher Hinsicht sinnvoll durchzuführen. Darüber hinaus wurde in einem weiteren Ansatz von Experimenten bei 30 % TS das Tensid PEG3000 zugesetzt, um mögliche positive Effekte auf die Endausbeute bei industriell relevanten Bedingungen zu untersuchen; dabei wird angenommen, dass dadurch eine nichtproduktive Enzymadsorption an Lignin verhindert wird. Beim SHF-Verfahren war die Temperatur für die Hydrolyse 50°C über 72 Stunden, die der Fermentation 34°C. Um die Durchmi-

schung zu verbessern, die bei konventioneller Reaktionsführung mit sehr hohem Trockenmassegehalt ineffizient ist, wurde ein System entsprechend dem von Drehrohren (oder „Roller Bottles“) angewendet. Es wurden hohe Glucosekonzentrationen erzielt (maximal 150 g kg<sup>-1</sup>). Die besten Ergebnisse sind in den Tabellen I und II von Lit. [61] zusammengefasst. Diese waren mit der neuen Enzymmischung (Dosierung 22.8 mg g<sup>-1</sup> Cellulose; Cellic CTec 2, Novozymes): Anwendung von SHF: 88.8 % Ethanolausbeute (bezogen auf Cellulose), Hydrolyse bei 50°C, 72 h, 30 % TS, Zugabe von PEG (0.4 %; Ersparnis von 30 % Enzym), Fermentation bei 34°C, 96 h. Anwendung von SSF: 86.3 % Ethanolausbeute, gleiche Enzymdosierung, Reaktion bei 34°C, 168 h, 20 % TS.

Eine Reihe von Pilotversuchen, Demonstrations- und/oder kommerziellen Anlagen wurde in den letzten Jahren angekündigt; allerdings arbeiteten nur wenige in relevantem Maßstab, z.B. bei POET (USA), der Iogen Corporation (Kanada), Renmatrix, Inbicon in Dänemark, Abengoa in Spanien (siehe auch <http://www.poet.com>).<sup>[60b,61]</sup> Neue „Start-up“-Anlagen, meist in den USA, wurden bezüglich Fertigstellung in den Jahren 2012 oder 2013 erwartet, so bei Poet DSM Advanced Biofuels, KiOR, Beta Renewables and ZeaChem, wobei z.B. Mais- oder Weizenstroh als Rohmaterial genutzt werden; GraalBio in Brasilien will Zuckerrohrbagasse verwenden.<sup>[62]</sup>

Einen Überblick über 11 größere Projekte mit Jahreskapazitäten bis 100 000 m<sup>3</sup> hat McCoy im Jahr 2012 gegeben.<sup>[63]</sup> Die Iogen Corporation betreibt die erste Demonstrationsanlage in Ottawa (Kanada) seit 2004, sie nutzt eine Kombination von thermischen, chemischen und biochemischen Techniken, um Biomasse, Weizen-, Hafer- und Gerstenstroh in Ethanol umzusetzen. Die Vorbehandlung erfolgt mit einem modifizierten Dampfexplosions-Prozess. Für die Hydrolyse entwickelte Iogen ein Mehrstufenverfahren mit anschließender Fermentation. Effiziente Cellulasesysteme werden intern mittels *T. reesei* produziert. Die Fermentation erfolgt mit Mikroorganismen, die sowohl C<sub>6</sub>- als auch C<sub>5</sub>-Zucker in Ethanol umwandeln. Die Ausbeute beträgt 340 L je Tonne Weizenstroh. Das Design eines großen Prozesses schließt die effiziente Integration von Wärmeenergie, Wasserkreisläufen und Nebenproduktnutzung ein, um die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses zu gewährleisten.<sup>[64]</sup> Eine Demonstrationsanlage, die Stroh und Enzyme von Danisco Genecor (jetzt DuPont), Novozymes und DSM verwendet, wird in Kalundborg (Dänemark) betrieben; sie produziert 5400 m<sup>3</sup> pro Jahr Ethanol, Ligninpellets und Melasse als Nebenprodukte.<sup>[65]</sup> Die Anlage von Chemtex in Italien, ebenso die kommerzielle Bioraffinerie von Beta Renewables in Crescentino, mit einer Kapazität von 75 000 m<sup>3</sup> pro Jahr arbeiten beide mit Weizenstroh und Schilfrohr, *Arundo donax*, wobei sie Enzyme von Novozymes nutzen. Beta Renewables gibt einen Preis für Zucker aus Biomasse von 22 Cent je kg an, im Vergleich zu 40–44 Cent je kg für Zucker aus Mais, und einen Preis für Ethanol von 65 Cent je L.<sup>[62a]</sup> BASF (D) wird mit Renmatrix (USA) bei der Maßstabsvergrößerung eines Prozesses zusammenarbeiten, um Zucker aus z.B. Holz oder Stroh zu produzieren, wobei Wasser bei hoher Temperatur und Druck zur Vorbehandlung eingesetzt wird und anschließend mittels

Fermentation Zwischenprodukte wie 1,4-Butandiol und Bernsteinsäure hergestellt werden.<sup>[66]</sup>

Clariant entwickelte den Sunliquid-Prozess, bei dem keine zusätzliche fossile Energie benötigt wird, zur Synthese von Ethanol aus lignocellulotischen Pflanzenmaterial. Eine Pilotanlage für diesen Prozess mit einer jährlichen Kapazität von 1000 Tonnen Ethanol wurde 2012 in Betrieb genommen.<sup>[67]</sup>

Die Pflanzengenetik könnte neue Perspektiven eröffnen, um Lignocellulosen leichter zu hydrolysieren. Ein Ansatz besteht darin, den Gehalt und die Struktur von Lignin zu verändern. Dies wurde kürzlich für Mutanten von *Arabidopsis thaliana* bezüglich eines Enzyms im zentralen Lignin-Biosyntheseweg gezeigt, die weniger Lignin einlagern als Wildtyp-Pflanzen.<sup>[68]</sup> Im Zusammenhang mit dieser Veränderung erhöhte sich der Umsatz von Cellulose zu Glucose in den Mutanten vierfach gegenüber dem Wildtyp bei Hydrolyse ohne Vorbehandlung.

## 5. Identifizierung neuer CAZymes

Die klassische Vorgehensweise zur Identifizierung neuer Enzyme basiert auf dem Screening beispielsweise von Bodenproben, ungewöhnlichen Habitaten oder Industriearealen, durch Anreicherungskulturen, in Stammsammlungen oder in pflanzlichen und tierischen Geweben. Dieses allgemeine Konzept wurde auch zur Entdeckung neuer CAZymes genutzt. Allerdings wird bei dieser Methode der größte Teil der natürlichen Biodiversität nicht abgedeckt, da nur ein geringer Anteil der Mikroben erfolgreich im Labor kultiviert werden kann. Wilson hat in einem exzellenten Übersichtsartikel darauf hingewiesen, dass zwei große Probleme unser Verständnis zum Abbau von Celluloseproben begrenzen: „die riesige Diversität der Organismen in den meisten Cellulose-abbauenden Umgebungen und das Unvermögen diese zu kultivieren.“<sup>[69]</sup> In Abhängigkeit vom Habitat wird geschätzt, dass < 1 % der Mikroorganismen einer Umweltprobe unter normalen Laborbedingungen kultiviert werden können.<sup>[70]</sup> Gründe hierfür sind die Unkenntnis geeigneter Kultivierungsbedingungen und niedrige Wachstumsraten, oder das Wachstum einer Mikrobe ist abhängig von anderen Spezies, die Nährstoffe liefern. Der Metagenomansatz überwindet diese Einschränkungen durch Umgehung des Kultivierungsschrittes. Hierfür wird die gesamte genomische DNA einer Probe extrahiert, fragmentiert und kloniert, um die entsprechenden Metagenombibliotheken zu erhalten.<sup>[71]</sup> Diese Bibliotheken können dann entweder auf die gewünschte Aktivität durchmustert werden (mit einem funktionsbasierten Assay), oder in einem sequenzbasierten Ansatz werden die Gene nach Sequenzierung der gesamten DNA durch Homologievergleiche mit bekannten Enzymen identifiziert. Aktuelle Übersichten geben einen Überblick über mit beiden Methoden identifizierte Enzyme, einschließlich CAZymes.<sup>[72]</sup> Diese Übersichtsartikel decken auch neue Studien zur Entdeckung neuer Glycosidhydrolasen aus Ökosystemen wie Boden, Seen, heißen Quellen, Pansen, Kaninchen- oder Insekteneingeweiden ab.

In einer herausragenden Forschungsleistung wurde das Mikrobiom des menschlichen Verdauungstrakts über den Metagenomansatz untersucht, um neue CAZymes zu entdecken.<sup>[73]</sup> Der Grund zur Erkundung dieser mikrobiellen Gemeinschaft im menschlichen Verdauungstrakt war, dass die Ballaststoffe hauptsächlich aus komplexen Zellwandpolysacchariden und Ligninen bestehen. Aufgrund der breiten strukturellen Diversität dieser Ballaststoffe nahmen die Autoren an, dass Bakterien im menschlichen Darm – von denen nur 20 % mit herkömmlichen mikrobiologischen Methoden kultiviert werden konnten – eine breite Palette an CAZymes produzieren müssen. In früheren Arbeiten war diese Biodiversität bereits über funktionelle und strukturelle Genomanalyse beschränkt auf kultivierbare Bakterien untersucht worden.<sup>[74]</sup>

Tasse et al. stellten zunächst eine Metagenombibliothek her ( $5.4 \times 10^9$  Basenpaare metagenomischer DNA, kloniert und exprimiert in *E. coli*) und durchmusterten diese anschließend mit einem funktionsbasierten Plattentest auf  $\beta$ -Glucan, Xylan, Galactan, Pektin und Amyloseabbau für insgesamt 704 000 Klone. 310 Klone wurden dann in einem Sekundärscreening zur Ermittlung der Enzymspezifitäten gegenüber 15 Polysacchariden untersucht und die Enzymstabilität bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen ermittelt. Aktive Klone wurden pyrosequenziert, gefolgt von der Annotation der Gene und einer taxonomischen Zuordnung. Dieser Arbeiten führten zur Entdeckung von 18 CAZy-Genclustern bestehend aus 73 CAZy-Genen aus 35 Familien und 86 CAZy-Modulen. Wesentlich ist, dass viele der neu gefundenen Gene keine hohe Sequenzhomologie zu bekannten Proteinen aufwiesen, was wiederum bestätigt, dass diese Strategie die Auffindung komplett neuer Enzyme ermöglicht. In einer jüngeren Veröffentlichung erweiterte die gleiche Arbeitsgruppe das Konzept auf zwei Metagenombibliotheken aus der Darmschleimhaut und Fäkalmikrobiota mit besonderem Fokus auf den Abbau probiotischer Kohlenhydrate wie Inulin und Fructooligosacchariden.<sup>[75]</sup> Erneut wurden eine große Zahl neuer Kohlenhydrat-hydrolysierender Enzyme aus verschiedenen CAZyme-Familien sowie Transporter identifiziert. Zusätzlich zu Agarplattentests und Standardanalysemethoden wurde auch ein NMR-basiertes Verfahren für das Hochdurchsatzscreening von CAZymes entwickelt, das eine quantitative Identifizierung der Reaktionsprodukte ermöglichte und zusätzlich Strukturinformationen lieferte.<sup>[76]</sup> Die Methode wurde ausgehend von der Expression der Genbibliothek gefolgt von der direkten Analyse des nicht aufbereiteten Reaktionsmediums automatisiert, um die Strukturen der Kohlenhydrate zu ermitteln. So konnte eine Bibliothek von 4032 CAZymes mit einer Rate von 480 Enzymvarianten pro Tag analysiert werden, von denen 303 Enzyme genauer charakterisiert wurden.

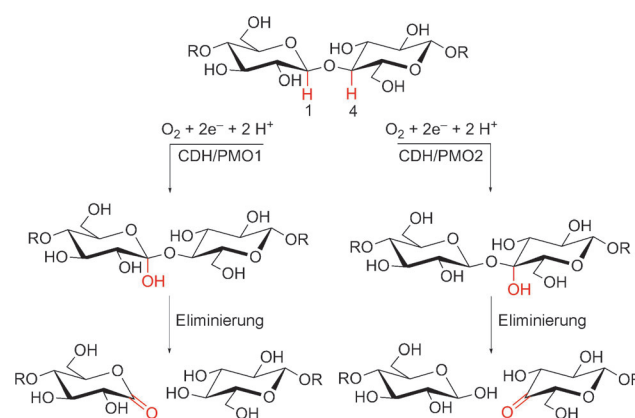
In einer anderen herausragenden Veröffentlichung wurde der Metagenomansatz genutzt, um Cellulose-abbauende Enzyme im Rinderpansen mit Rutenhirse (*Panicum virgatum*) als Zielsubstrat zu finden.<sup>[77]</sup> Die Autoren sequenzierten und annotierten 268 Gigabasen der DNA von Mikroben aus dem Pansen. Dies führte zur Identifizierung von 27 755 Genen, die für putative Kohlenhydrat-aktive Enzyme kodieren. Von 90 exprimierten Kandidaten konnten 57 % als aktiv

gegenüber einem Satz von zehn Cellulosesubstraten bestätigt werden. Ein wesentlicher Aspekt dieser Studie ist die Erkenntnis, dass die erschöpfende Sequenzierung und der Vergleich der Gensequenzen mit den Einträgen in der CAZyme-Datenbank ergab, dass nur 1 % der 2716 Sequenzen (kodierend für  $\beta$ -(1,4)-Endoglucanasen,  $\beta$ -Glucosidasen oder Cellobiohydrolasen) hohe Ähnlichkeit zu irgendwelchen CAZy-Datenbankeinträgen hatten. In einer aktuellen Arbeit wurde ein Sauerstoff-tolerantes mikrobielles Konsortium analysiert, das Lignocellulose aus landwirtschaftlichen Reststoffen und industriellem Pülpeabfall abbauen kann.<sup>[78]</sup> Die Autoren berichteten über eine stabile Gemeinschaft von *Clostridium*-, *Acetanaerobacterium*- und *Ureibacillus*-Spezies mit CMCase-, Xylanase- und  $\beta$ -Glucanase-Aktivitäten. Die anschließende „Shotgun“-Pyrosequenzierung einer Metagenombibliothek identifizierte eine Vielzahl von CAZymes aus 26 Familien. Diese Beispiele zeigen deutlich, dass der größte Teil der CAZymes mit herkömmlichen Methoden nicht gefunden werden konnte und dass nur der Metagenomansatz kombiniert mit umfangreicher Sequenzierung ihre Entdeckung ermöglichte.

Eine nahezu unerschlossene Quelle potenzieller CAZymes sind Archaea.<sup>[79]</sup> In einem Beispiel wurde *Desulfurococcus fermentans* als hyperthermophiler Organismus identifiziert, der in der Lage war, auf kristalliner Cellulose bei 81 °C zu wachsen. In einer aktuelleren Arbeit<sup>[80]</sup> beschreiben Graham et al. drei hyperthermophile Archaea, die aus einer kontinentalen geothermalen Quelle stammen und auf kristalliner Cellulose bei 90 °C wuchsen. Interessanterweise scheiterten Versuche, die Spezies voneinander zu trennen. Es wurde argumentiert, dass ein einzelnes isoliertes hyperthermophiles Archaeobakterium nicht in der Lage ist, die verschiedenen für den komplexen Abbau von Lignocellulosen notwendigen Enzyme zu produzieren, da die jeweiligen Genome nur eine begrenzte Größe haben. Eine nachfolgende Metagenomanalyse des Konsortiums identifizierte eine 90 kDa große Multidomänen-Endoglucanase mit ungewöhnlichen strukturellen Eigenschaften. Das Enzym hat erstaunliche Charakteristika wie eine optimale Aktivität bei 109 °C und eine Halbwertszeit von 5 h bei 100 °C, und es war sehr stabil in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten, starker Tenside und hoher Salzkonzentrationen.

Erst kürzlich rückte die Bedeutung oxidativer Enzyme für den Abbau von (Ligno)Cellulose in den Vordergrund, und viele bekannte Enzyme wurden zusammen mit neu entdeckten Aktivitäten als „auxiliary enzymes“ (Hilfsenzyme) in der CAZy-Datenbank reklassifiziert.<sup>[23,81]</sup> Diese Unterfamilie enthält nun sehr gut untersuchte Enzyme wie Laccasen, Mangan- oder Lignin-Peroxidasen – alles Mehrfachkupfer-oxidasen, die bekanntermaßen für den oxidativen Abbau von Lignin essenziell sind. Andere „auxiliary enzymes“ sind Cellobiose-Dehydrogenasen, Pyranose-Oxidasen und Galactose-Oxidasen. Cellulasen, die bislang als GH61-Enzyme klassifiziert worden waren, konnten kürzlich als Kupfer-abhängige (lytische) Polysaccharid-Monooxygenasen (LPMO) eingeordnet werden, die den Abbau von Cellulose im Zusammenspiel mit klassischen Cellulasen verstärken (für aktuelle Übersichten siehe Lit. [82] und darin zitierte Arbeiten). Diese aus Pilzen wie *Neurospora crassa* stammenden PMO

katalysieren die oxidative Spaltung von Cellulose mit Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure, Gallat oder reduziertem Glutathion. Besonders wichtig ist, dass PMO direkt kristalline Mikrofibrillen-Cellulose angreifen. Quinlan et al. fanden ein Typ-II-Kupferzentrum, das für die beobachtete GH61-Aktivität notwendig ist.<sup>[83]</sup> Marletta und Mitarbeiter identifizierten als Erste die Oxidationsprodukte am nichtreduzierenden Ende als 4-Ketoaldosen und konnten bestätigen, dass keine C6-Oxidation erfolgte. Basierend auf Isotopenmarkierungen postulierten sie einen Mechanismus – abhängig davon ob Typ-I- oder Typ-II-PMO (PMO1 bzw. PMO2) verwendet wurde – bei dem der Sauerstoffeinbau an der C1- oder C4-Position stattfindet, gefolgt von einer Eliminierung zu Ketoaldosen (Schema 4).



**Schema 4.** Postulierter Reaktionsweg für die oxidative Spaltung von Cellulose durch PMO1 oder PMO2.<sup>[84]</sup>

Erst kürzlich wurde über eine weitere Familie (AA11) dieser Hilfsenzyme berichtet,<sup>[85]</sup> wodurch die Zahl der LPMOs mit Aktivität gegenüber Cellulose (AA9, zuvor GH61) oder Chitin (AA10, zuvor CBM33) vergrößert wurde. Für die AA11-Enzyme aus *Aspergillus oryzae* konnte gezeigt werden, dass diese oxidative chitinolytische Aktivität aufweisen und zu Aldonsäure-Oligosacchariden führen. Biochemische Studien ergaben, dass die strukturellen und spektroskopischen Eigenschaften dieser AA11-Enzyme zwischen denen der AA9- und AA10-Familien liegen.<sup>[82b]</sup>

Wie zuvor beschrieben, wurden CBM33 reklassifiziert und sind auch Kupfer-abhängige LPMO. In einer bahnbrechenden Arbeit wurde für CBP21 erstmals gezeigt, dass es tatsächlich ein oxidatives Enzym ist, dass die Spaltung von kristallinem Chitin, beschleunigt durch Ascorbinsäure, zum oxidierten Zucker 2-(Acetylamin)-2-desoxy-D-gluconsäure katalysiert.<sup>[86]</sup> Chauvigne-Hines et al. entwickelten einen aktivitätsbasierten Test (ABPP) auf der Basis einer Alkinmarkierung, um Proteinprofile durch direkte Markierung des cellulösen Sekretoms von *C. thermocellum* zu erstellen.<sup>[87]</sup> Die gegenüber ABP als selektiv gefundenen Glycosidhydrolasen (GH) wurden anschließend durch Massenspektrometrie verifiziert.



**Tabelle 1:** Ausgewählte aktuelle Beispiele zum Protein-Engineering von CAZymes.

Enzymfamilie	Organismus	Mutations- methode	Assay/ Substrat	Verbesserte Eigenschaft	Bemerkungen	Lit.
<i>Endoglucanase (Endo-β-1,4-glucanase), EC 3.2.1.4</i>						
GH5/Cel5A	<i>Bacillus subtilis</i>	epPCR/DNA- „Shuffling“	Kongorot Fär- bung/DNS/ CMC <sup>[a]</sup>	Verbesserte Aktivität (bis zu 2,7-fach) gegenüber CMC <sup>[b]</sup>	etwas verbesserte pH-Toleranz und Thermostabilität; bis zu 12 Mutationen, meist außer- halb konservierter Regionen	[96]
GH5/Cel5A	<i>Clostridium phyto- fermentans</i>	epPCR	Kongorot-Fär- bung/CMC	etwas verbesserte Halbwerts- zeit für CMC, amorphe Cellu- lose und Avicel	Oberflächendisplay eines Fu- sionsproteins; Expression mit/ohne CBM oder His-Mar- kierung; erhebliche Variation der Eigenschaften der Mutan- ten beeinflusst durch diese Konstrukte	[93]
GH5/CBM3	<i>Bacillus amylo- liquefaciens</i>	Fehlerbehaftete Vervielfältigung am rollenden Ring	DNS/CMC	Erhöhte Aktivität (bis 8-fach) gegenüber CMC	Sechs Mutationen gefunden, aber nur E289V relevant, da diese in der katalytischen Domäne der Cellulase lokali- siert ist	[97]
Cel8A	<i>Clostridium thermocellum</i>	epPCR und Kon- sens-Mutationen	PASC/CMC	Erhöhte Thermostabilität mit 14-fach erhöhter Halbwerts- zeit bei 85 °C	Die Konsensstrategie identi- fizierte eine G283P-Mutation, die mit einer früheren 3-fach- Mutante kombiniert wurde	[98]
EGII	<i>Trichoderma reesei</i>		Kongorot-Fär- bung/Avicel/ CMC	Erhöhte Cellulaseaktivität und verbesserte Bindung des CBM	Auf zwei Reste fokussierte CBM-Bibliothek, die über Zell- oberflächendisplay in Hefe er- zeugt wurde. Dies ergab 1.5- fach erhöhte Bindungsaffinität und 1.3-fach erhöhte hydroly- tische Aktivität	[99]
CMCase	<i>Bacillus subtilis</i>	„Shuffling“	Kongorot-Fär- bung/CMC, HPLC	Varianten mit 2- bis 5-fach höherer Aktivität gegenüber CMC	Bakterielles Oberflächendis- play zum Screening der Bi- bliothek; bis zu 8 Mutationen, meist in der katalytischen Domäne	[100]
<i>Cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91</i>						
GH6/Cel6A/ CBH II	Drei homologe Enzyme z. B. aus <i>Humicola insolens</i>	SCHEMA-Rekom- binierung von 8 Bereichen	PASC/Avicel	Erhöhte Thermostabilität bei 63 °C; Varianten waren bei 7– 15 °C höheren Temperaturen aktiv als der Wildtyp	15 Varianten mit bis zu 63 Mutationen wurden detailliert untersucht, auch Mutanten mit verbessertem pH-Profil; eine spätere Arbeit zeigte, dass nur eine Punktmutation hierfür verantwortlich war	[101]
GH6/Cel6A	Beste Variante einer früheren Studie <sup>[101]</sup>	epPCR/Rekombi- nierung	Avicel	Halbwertszeit von 280 min bei 75 °C, $T_{50}$ von 80 °C (15– 20 °C > als Wildtyp)	Kristallstrukturen der Mutan- ten ermittelt	[102]
GH6/CBH II	<i>Phanerochaete chy- sosporium</i>	Konsensmethode	PASC	Etwas verbesserte Thermo- stabilität bei 50 °C für 72 h	IVTT zur Enzymherstellung. Die beste Variante enthielt 15 Mutationen, die zu einer ver- besserten $\Delta T_m$ um ca. 5 °C führte	[103]
GH7/CBH I/ Cel7B	<i>Melanocarpus albomyces</i>	Punktmutationen/ Fusion mit CBM	MUL/Avicel	Thermoaktivität und -stabili- tät verbessert Fusion mit CBM ergab 7-fach erhöhte Aktivität gegenüber Avicel	Zusätzliche Disulfidbrücke nahe dem N-Terminus und Einfachmutation führte zu verbessertem $\Delta T_m$ um 4 °C	[104]
GH7/CBH I/ Cel7A	<i>Talaromyces emersonii</i>	Disulfidbrücken- Engineering	MUL/Avicel	Thermoaktivität und -stabili- tät verbessert	Fünf einzelne S-S-Varianten untersucht. Eine 3-fach-Mu- tante hatte um 9 °C verbesserte $\Delta T_m$ und Aktivität bei 80 °C	[105]

**Tabelle 1:** (Fortsetzung)

Enzymfamilie	Organismus	Mutations- methode	Assay/ Substrat	Verbesserte Eigenschaft	Bemerkungen	Lit.
GH7/CBH I/ Cel7A	Fünf homologe Enzyme, z. B. aus <i>Talaromyces emersonii</i>	SCHEMA-Rekom- binierung von 8 Bereichen	MUL/feste Cellulose	Thermostabilität. Chimären aktiv bei 70 °C (Wildtyp: 65 °C)	16 Chimären funktional expri- miert, im Durchschnitt 37 Mutationen pro Chimäre	[106]
GH7/CBH I/ Cel7A	Chimäre abgeleitet aus <i>Talaromyces emersonii</i>	Rationales Design mittels FoldX/ Konsens-Methode	MUL/feste Cellulose	Thermostabilität. 10 °C er- höhte Stabilität auf 65 °C, 50 % erhöhte Freisetzung von Zuckern aus CMC	Computerbasierte Analyse sagte 43 Mutanten vorher, 9 wurden untersucht, die 8 besten kombiniert; effektive Mutationen sind auf Protein- oberfläche	[107]
GH8/Cel7A	11 Ausgangs- enzyme, z. B. aus <i>Aspergillus</i> sp.	Rekombinierung	MUL/Avicel	Thermostabilität und -aktivi- tät. 86 % der 469 Chimären waren aktiv, 51 hatten höhere Stabilität. Durchschnittlich 4– 5 Mutationen pro Chimäre	„Biased clique shuffling“ wurde als gegenüber Stan- dardmethoden überlegen an- gesehen. Zusätzlich wurde eine 100-fach bessere Expres- sion in <i>Saccharomyces cerevi- siae</i> erzielt, da eine Hypergly- cosylierung vermieden wurde	[108]
<i>Verschiedene Enzyme</i>						
GH11/Xylanase	Nicht berichtet, Metagenomquelle	GSSM und Re- kombinierung	Xylan aus Hafer	Von 76 °C auf 101 °C signifi- kant verbesserte Thermosta- bilität	Mutationen meist in der N- terminalen Region. Die 3D- Struktur gab keine Hinweise auf die Gründe für die verbes- serte Stabilität/Aktivität, da eher subtile Veränderungen vorlagen	[109]
GH70/Reuteran- sucrase	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Rationales Design	Wachstumsassay	Allosyltransferase-Aktivität	Modellierung sagte die Ak- zeptanz neuer Donormoleküle vorher	[110]
Cel48	Rekombinierung von drei Genen aus <i>Clostridium</i> sp.	SCHEMA-Rekom- binierung	Avicel	Große Variationen in Tempe- raturprofil, Stabilität, Aktivität gefunden	Mutanten enthielten bis zu 106 Mutationen im Vergleich zu den Wildtypenzymen. 60 neue Cel48 Varianten charakterisiert	[111]

[a] DNS = Dinitrosalicylsäure. CMC = Carboxymethylcellulose. CBM = Cellulose-Bindedomäne. MUL = 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-lactosid. PSAC = mit Phosphorsäure gequollene Cellulose. IVTT = In-vitro-Transkription-Translation. GSSM = „gene-site saturation mutagenesis“.

## 6. Protein-Engineering von CAZymes

Protein-Engineering ist mittlerweile eine etablierte Technologie, um die Eigenschaften von Enzymen zu verändern; generelle Strategien und zahlreiche erfolgreiche Beispiele sind sehr gut dokumentiert.<sup>[88]</sup> Die zwei wesentlichen Prinzipien basieren auf rationalem Proteindesign oder gerichteter (molekularer) Evolution. Ist die 3D-Struktur oder ein angemessenes Homologiemodell verfügbar, ist das rationale Proteindesign die Methode der Wahl, um Art und Positionen für Mutationen von Aminosäuren vorherzusagen, die anschließend durch positionsgerichtete Mutagenese in das proteinkodierende Gen eingeführt werden. Nachdem die Variante durch rekombinante Expression hergestellt wurde, kann das Enzym aufgereinigt und bezüglich der gewünschten Eigenschaften charakterisiert werden. In Abwesenheit einer Proteinstruktur oder ausreichender Informationen, um das Protein-Engineering zu planen, ist die gerichtete Evolution die Methode der Wahl. Hierbei werden Mutationen zufällig (z.B. durch fehlerbehaftete Polymerasekettenreaktion („error-prone PCR“))<sup>[89]</sup> eingefügt, oder homologe Gene werden rekombiniert (z.B. durch DNA-„Shuffling“).<sup>[90]</sup> Die

größte Herausforderung in der gerichteten Evolution ist die Verfügbarkeit geeigneter Methoden für das Hochdurchsatz-Screening, um schnell und zuverlässig gewünschte Varianten in einer riesigen durch Zufallsmutagenese erzeugten Mutantenbibliothek zu identifizieren.

Protein-Engineering wurde bereits erfolgreich für CAZymes mit dem ursprünglichen Ziel den Katalysemechanismus aufzuklären<sup>[91]</sup> eingesetzt, und in aktuellen Forschungsarbeiten wurden deren Eigenschaften verbessert.<sup>[91,92]</sup> Die Veränderung dieser Enzyme ist eine große Herausforderung, weil die enzymatische Hydrolyse sehr komplex ist, heterogene Substrate vorliegen und verschiedene weitere Komponenten für die Aktivität notwendig sind. Die gerichtete Evolution wurde genutzt, um Varianten mit gesteigerter Aktivität gegenüber löslichen Substraten, verbesserter Thermostabilität, verändertem pH-Optimum oder verbesserter Expression zu erzeugen. Erhöhte Thermoaktivität (> 50 °C) ist ein wichtiges Ziel, da dies zu reduzierter (mikrobieller) Kontamination und Viskosität sowie erhöhter hydrolytischer Aktivität führt. Eine verbesserte Stabilität führt auch zu reduzierten Enzymkosten. Einen Überblick ausgewählter Beispiele gibt Tabelle 1.

Noch 2010 stellten Liu et al. fest, dass „die Entwicklung von Hochdurchsatztests für Cellulasen auf festen Cellulose-substraten dringend notwendig ist“.<sup>[93]</sup> In den meisten Beispielen wurden Varianten zunächst entweder in einem Agarplattentest oder in Mikrotiterplatten mit löslichen Chromophoren wie 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-lactosid oder Phosphorsäure-gequollener Cellulose in Kombination mit einem Farbstoff durchmustert, um aktive von inaktiven Klonen zu unterscheiden. Erst in einem nachfolgenden zweiten Test wurden die echten Cellulosesubstrate wie Avicel verwendet, um wirklich verbesserte Varianten zu identifizieren. Eine weitere Herausforderung ist, dass die meisten CAZymes sich nur mäßig in für gerichtete Evolution üblichen Wirten (z.B. *E. coli*, *S. cerevisiae*) exprimieren lassen. Als Konsequenz werden die besten Mutanten aufgrund schlechter Expression häufig übersehen oder Varianten, die verbesserte Eigenschaften aufweisen, versagen in späteren Studien, wenn industrielle Produktionsstämme für eine Maßstabsvergrößerung eingesetzt werden. Insbesondere CBH-1-Cellobiohydrolasen haben sich als sehr schwierig für das Engineering erwiesen, was teilweise mit dem niedrigen Expressionsniveau in heterologen Wirten, aber vor allem mit ihrer komplexen Struktur begründet wurde. CBH-1-Enzyme enthalten üblicherweise 8–10 Disulfidbrücken und mindestens drei Glykosylierungsstellen. In den meisten Arbeiten zur gerichteten Evolution wurden entweder fehlerbehaftete PCR oder „Shuffling“ verwendet, und dies führte meist nur zu moderaten Verbesserungen (Tabelle 1). Die Gruppe von Arnold war durch den Einsatz des SCHEMA-Algorithmus erfolgreicher, um das Design der Mutanten zu planen. Diese strukturbasierte Rekombinierungsmethode funktioniert auch ohne Hochdurchsatz-Screeningmethoden und identifiziert Bereiche, die für die Erstellung von Enzymchimären geeignet sind, selbst bei Sequenzhomologien unter 30%.<sup>[94]</sup>

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Gewinnung günstiger fermentierbarer Zucker aus Biomasse ist nicht nur für die Ethanolproduktion wichtig, sondern auch für eine Vielzahl anderer fermentativer Prozesse in der Großchemie, weil die Produktion von Ethanol in jüngster Zeit ökonomisch mit Alternativen auf der Grundlage der Schiefergasnutzung konkurrieren muss.<sup>[95]</sup> Neueste Errungenschaften wie die Oxygenase sind Beispiele für eine Entwicklung, die aktuell viele Aspekte der klassischen Mechanismen kritisch hinterfragt und irgendwie das Konzept, das wir für den enzymatischen Abbau von Cellulose kannten, redigiert. Verschiedene Cellulasen und Oxygenasen ermöglichen den Abbau einer breiteren Auswahl an Oberflächen. Die resultierenden Monosaccharide und Oligosaccharide können wieder von genetisch veränderten Enzymen zu neuen maßgeschneiderten Produkten zusammengefügt werden. Die Bioraffinerie der Zukunft könnte ebenfalls die Nutzung von Lignin und Hemicellulose für die Produktion von Groß- und Feinchemikalien in Betracht ziehen, falls es gelingt, das Repertoire der Natur um neue Enzymaktivitäten zu bereichern. In diesem Zusammenhang wird die Implementierung von Vorbehandlung, Biokatalysatordesign und Verfahrenstechnik

neue Wege für Synthese von Kraftstoffen und Chemikalien ebnet.

J.S. wird durch einen DuPont Young Professor Award unterstützt.

Eingegangen am 15. November 2013

Online veröffentlicht am 18. August 2014

- [1] L. Caspeta, J. Nielsen, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 789–793.
- [2] a) S. Merino, J. Cherry, *Biofuels*, Bd. 108 (Hrsg.: L. Olsson), Springer, Berlin/Heidelberg, **2007**, S. 95–120; b) E. Gnansounou, A. Dauriat, *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4980–4991.
- [3] a) P. Bubner, H. Plank, B. Nidetzky, *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 1529–1549; b) A. J. Ragauskas, G. T. Beckham, M. J. Biddy, R. Chandra, F. Chen, M. F. Davis, B. H. Davison, R. A. Dixon, P. Gilna, M. Keller, P. Langan, A. K. Naskar, J. N. Saddler, T. J. Tschaplinski, G. A. Tuskan, C. E. Wyman, *Science* **2014**, DOI: 10.1126/science.1246843; c) X. Meng, A. J. Ragauskas, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *27*, 150–158.
- [4] J. Tolan, B. Foody, *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*, Bd. 65 (Hrsg.: G. T. Tsao, A. P. Brainard, H. R. Bungay, N. J. Cao, P. Cen, Z. Chen, J. Du, B. Foody, C. S. Gong, P. Hall, N. W. Y. Ho, D. C. Irwin, P. Iyer, T. W. Jeffries, C. M. Ladisch, M. R. Ladisch, Y. Y. Lee, N. S. Mosier, H. M. Mühlemann, M. Sedlak, N. Q. Shi, J. S. Tolan, R. W. Torget, D. B. Wilson, L. Xia), Springer, Berlin/Heidelberg, **1999**, S. 41–67.
- [5] a) H. Chanzy, B. Henrissat, *Carbohydr. Polym.* **1983**, *3*, 161–173; b) B. Henrissat, H. Driguez, C. Viet, M. Schulein, *Nat. Biotechnol.* **1985**, *3*, 722–726.
- [6] a) M. R. Ladisch, K. Dyck, *Science* **1979**, *205*, 898–900; b) M. R. Ladisch, B. E. Dale, G. T. Tsao, *Biotechnol. Bioeng.* **1983**, *25*, 1–2.
- [7] T. K. Ghose, *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 257–268.
- [8] a) „Cellulases“: K. Buchholz, P. Rapp, F. Zadrazil in *Methods of Enzymatic Analysis*, Bd. 3. (Hrsg.: H. U. Bergmeyer), Verlag Chemie, Weinheim, **1984**, Kap. 4, S. 178–188; b) K. Buchholz, J. Puls, B. Gödelmann, H. V. Dietrichs, *Process Biochem.* **1981**, *16*, 37–43.
- [9] International\_Energy\_Agency, *Key World Energy Statistics 2012* **2012**. <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/kwes.pdf>
- [10] H. Kopetz, *Nature* **2013**, *494*, 29–31.
- [11] M. Sette, R. Wechselberger, C. Crestini, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9529–9535.
- [12] a) P. Alvira, E. Tomas-Pejo, M. Ballesteros, M. J. Negro, *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4851–4861; b) A. T. W. M. Hendriks, G. Zeeman, *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 10–18.
- [13] a) G. Brodeur, E. Yau, K. Badal, J. Collier, K. B. Ramachandran, S. Ramakrishnan, *Enzyme Res.* **2011**, 787532; b) U. Holopainen-Mantila, K. Marjamaa, Z. Merali, A. Kasper, P. de Bot, A.-S. Jääskeläinen, K. Waldron, K. Kruus, T. Tamminen, *Bioresour. Technol.* **2013**, *138*, 156–162; c) S.-Y. Leu, J. Y. Zhu, *Bioenerg. Res.* **2013**, *6*, 405–415; d) B. C. Saha, T. Yoshida, M. A. Cotta, K. Sonomoto, *Ind. Crops Prod.* **2013**, *44*, 367–372; e) M. A. Lima, G. B. Lavorente, H. K. da Silva, J. Bragatto, C. A. Rezende, O. D. Bernardinelli, E. R. Deazevedo, L. D. Gomez, S. J. McQueen-Mason, C. A. Labate, I. Polikarpov, *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*, 75; f) R. Ibbett, S. Gaddipati, S. Hill, G. Tucker, *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*, 33; g) H. Li, Y. Pu, R. Kumar, A. J. Ragauskas, C. E. Wyman, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 485–492; h) B. Yang, C. E. Wyman, *Biofuels Bioprod. Biorefin.* **2008**, *2*, 26–40; i) C. Zetzl, K. Gairola, C. Kirsch, L. Perez-Cantu, I. Smirnova, *Chem. Ing. Tech.* **2012**, *84*, 27–35.



- [14] B. Madsen, E. K. Gamstedt, *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2013**, 14.
- [15] X. Zhao, K. Cheng, D. Liu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 82, 815–827.
- [16] J. Viell, A. Harwardt, J. Seiler, W. Marquardt, *Bioresour. Technol.* **2013**, 150, 89–97.
- [17] T. vom Stein, P. M. Grande, H. Kayser, F. Sibilla, W. Leitner, P. Domínguez de María, *Green Chem.* **2011**, 13, 1772–1777.
- [18] B. Henrissat, *Biochem. J.* **1991**, 280, 309–316.
- [19] B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, B. Henrissat, *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, D233–238.
- [20] a) B. Henrissat, A. Bairoch, *Biochem. J.* **1993**, 293, 781–788; b) B. Henrissat, A. Bairoch, *Biochem. J.* **1996**, 316, 695–696; c) G. Davies, B. Henrissat, *Structure* **1995**, 3, 853–859; d) B. Henrissat, G. Davies, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 637–644.
- [21] a) J. A. Campbell, G. J. Davies, V. Bulone, B. Henrissat, *Biochem. J.* **1997**, 326, 929–939; b) P. M. Coutinho, E. Deleury, G. J. Davies, B. Henrissat, *J. Mol. Biol.* **2003**, 328, 307–317.
- [22] V. Lombard, T. Bernard, C. Rancurel, H. Brumer, P. M. Coutinho, B. Henrissat, *Biochem. J.* **2010**, 432, 437–444.
- [23] A. Levasseur, E. Drula, V. Lombard, P. M. Coutinho, B. Henrissat, *Biotechnol. Biofuels* **2013**, 6, 41.
- [24] H. J. Gilbert, J. P. Knox, A. B. Boraston, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, 23, 669–677.
- [25] A. B. Boraston, D. N. Bolam, H. J. Gilbert, G. J. Davies, *Biochem. J.* **2004**, 382, 769–781.
- [26] A. L. Creagh, E. Ong, E. Jervis, D. G. Kilburn, C. A. Haynes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 12229–12234.
- [27] S. Najmudin, B. A. Pinheiro, J. A. Prates, H. J. Gilbert, M. J. Romao, C. M. Fontes, *J. Struct. Biol.* **2010**, 172, 353–362.
- [28] C. M. Payne, M. G. Resch, L. Chen, M. F. Crowley, M. E. Himmel, L. E. Taylor III, M. Sandgren, J. Stahlberg, I. Stals, Z. Tan, G. T. Beckham, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 14646–14651.
- [29] a) E. A. Bayer, R. Kenig, R. Lamed, *J. Bacteriol.* **1983**, 156, 818–827; b) R. Lamed, E. Setter, E. A. Bayer, *J. Bacteriol.* **1983**, 156, 828–836.
- [30] C. M. G. A. Fontes, H. J. Gilbert, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79, 655–681.
- [31] a) A. L. Carvalho, F. M. Dias, J. A. Prates, T. Nagy, H. J. Gilbert, G. J. Davies, L. M. Ferreira, M. J. Romao, C. M. Fontes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 13809–13814; b) S. W. Stahl, M. A. Nash, D. B. Fried, M. Slutzki, Y. Barak, E. A. Bayer, H. E. Gaub, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 20431–20436; c) A. L. Carvalho, F. M. Dias, T. Nagy, J. A. Prates, M. R. Proctor, N. Smith, E. A. Bayer, G. J. Davies, L. M. Ferreira, M. J. Romao, C. M. Fontes, H. J. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 3089–3094.
- [32] G. Gefen, M. Anbar, E. Morag, R. Lamed, E. A. Bayer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 10298–10303.
- [33] Y. Mori, S. Ozasa, M. Kitaoka, S. Noda, T. Tanaka, H. Ichinose, N. Kamiya, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 6971–6973.
- [34] a) T. Ganner, P. Bubner, M. Eibinger, C. Mayrhofer, H. Plank, B. Nidetzky, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 43215–43222; b) J. M. Fox, P. Jess, R. B. Jambusaria, G. M. Moo, J. Liphardt, D. S. Clark, H. W. Blanch, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 356–361.
- [35] A. Sturcová, I. His, D. C. Apperley, J. Sugiyama, M. C. Jarvis, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1333–1339.
- [36] Y. Habibi, L. A. Lucia, O. J. Rojas, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 3479–3500.
- [37] Y. H. Zhang, L. R. Lynd, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, 88, 797–824.
- [38] J. S. Luterbacher, L. P. Walker, J. M. Moran-Mirabal, *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, 110, 108–117.
- [39] J. S. Luterbacher, J.-Y. Parlange, L. P. Walker, *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, 110, 127–136.
- [40] J. L. Bras, A. Cartmell, A. L. Carvalho, G. Verze, E. A. Bayer, Y. Vazana, M. A. Correia, J. A. Prates, S. Ratnaparkhe, A. B. Boraston, M. J. Romao, C. M. Fontes, H. J. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 5237–5242.
- [41] K. Igarashi, A. Koivula, M. Wada, S. Kimura, M. Penttilä, M. Samejima, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 36186–36190.
- [42] a) H. Chanzy, B. Henrissat, R. Vuong, *FEBS Lett.* **1984**, 172, 193–197; b) Y. S. Liu, J. O. Baker, Y. Zeng, M. E. Himmel, T. Haas, S. Y. Ding, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 11195–11201.
- [43] V. Arantes, J. N. Saddler, *Biotechnol. Biofuels* **2010**, 3, 4.
- [44] a) G. Jäger, M. Girfoglio, F. Dollo, R. Rinaldi, H. Bongard, U. Commandeur, R. Fischer, A. C. Spiess, J. Büchs, *Biotechnol. Biofuels* **2011**, 4, 33; b) H. J. Lee, S. Lee, H. J. Ko, K. H. Kim, I. G. Choi, *Mol. Cells* **2010**, 29, 379–385; c) R. E. Quiroz-Castaneda, C. Martínez-Anaya, L. I. Cuervo-Soto, L. Segovia, J. L. Folch-Mallol, *Microb. Cell Fact.* **2011**, 10, 8; d) M. Saloheimo, M. Paloheimo, S. Hakola, J. Pere, B. Swanson, E. Nyyssönen, A. Bhatia, M. Ward, M. Penttilä, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 4202–4211.
- [45] H. Chanzy, B. Henrissat, *FEBS Lett.* **1985**, 184, 285–288.
- [46] B. K. Barr, Y. L. Hsieh, B. Ganem, D. B. Wilson, *Biochemistry* **1996**, 35, 586–592.
- [47] B. Nidetzky, W. Steiner, M. Hayn, M. Claeysens, *Biochem. J.* **1994**, 298, 705–710.
- [48] A. R. White, R. M. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 1047–1051.
- [49] a) J. Jalak, M. Kurasin, H. Teugjas, P. Valjamae, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 28802–28815; b) L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. van Zyl, I. S. Pretorius, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, 66, 506–577.
- [50] E. Vlasenko, M. Schüle, J. Cherry, F. Xu, *Bioresour. Technol.* **2010**, 101, 2405–2411.
- [51] P. Bansal, M. Hall, M. J. Realff, J. H. Lee, A. S. Bommarius, *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27, 833–848.
- [52] M. Kurasin, P. Valjamae, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 169–177.
- [53] J. M. Fox, S. E. Levine, D. S. Clark, H. W. Blanch, *Biochemistry* **2012**, 51, 442–452.
- [54] a) S. E. Levine, J. M. Fox, H. W. Blanch, D. S. Clark, *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, 107, 37–51; b) S. E. Levine, J. M. Fox, D. S. Clark, H. W. Blanch, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 108, 2561–2570.
- [55] L. Bu, M. R. Nimlos, M. R. Shirts, J. Stahlberg, M. E. Himmel, M. F. Crowley, G. T. Beckham, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 24807–24813.
- [56] a) L. Rosgaard, S. Pedersen, J. Langston, D. Akerhielm, J. R. Cherry, A. S. Meyer, *Biotechnol. Prog.* **2007**, 23, 1270–1276; b) A. S. Meyer, L. Rosgaard, H. R. Sørensen, *J. Cereal Sci.* **2009**, 50, 337–344.
- [57] C. R. South, D. A. L. Hogsett, L. R. Lynd, *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, 17, 797–803.
- [58] a) X. Shao, L. Lynd, C. Wyman, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, 102, 66–72; b) X. Shao, L. Lynd, C. Wyman, A. Bakker, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, 102, 59–65.
- [59] R. E. T. Drissen, R. H. W. Maas, M. J. E. C. Van Der Maarel, M. A. Kabel, H. A. Schols, J. Tramper, H. H. Beentink, *Biocatal. Biotransform.* **2007**, 25, 419–429.
- [60] a) S. T. Merino, J. Cherry, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2007**, 108, 95–120; b) S. Brethauer, C. E. Wyman, *Bioresour. Technol.* **2010**, 101, 4862–4874; c) M. Galbe, P. Sassner, A. Wingren, G. Zacchi, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2007**, 108, 303–327; d) M. Galbe, G. Zacchi, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2007**, 108, 41–65.
- [61] D. Cannella, H. Jørgensen, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, 111, 59–68.
- [62] a) M. M. Bomgardner, *Chem. Eng. News* **2013**, 91(4), 20–22; b) M. M. Bomgardner, *Chem. Eng. News* **2012**, 90(5), 11; c) M. M. Bomgardner, *Chem. Eng. News* **2012**, 90(24), 18–21.
- [63] M. McCoy, *Chem. Eng. News* **2012**, 90(41), 22–25.
- [64] *Nature* **2010**, 463, 592.
- [65] *Chem. Eng. News* **2012**, 90(24), 17.

- [66] M. M. Bomgardner, *Chem. Eng. News* **2013**, 91(51), 9.
- [67] M. Rarbach, Y. Soltl, *Chimia* **2013**, 67, 732–734.
- [68] R. Vanholme, I. Cesarino, K. Rataj, Y. Xiao, L. Sundin, G. Goeminne, H. Kim, J. Cross, K. Morreel, P. Araujo, L. Welsh, J. Haustaete, C. McClellan, B. Vanholme, J. Ralph, G. G. Simpson, C. Halpin, W. Boerjan, *Science* **2013**, 341, 1103–1106.
- [69] D. B. Wilson, *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, 14, 259–263.
- [70] a) R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, *Microbiol. Rev.* **1995**, 59, 143–169; b) P. Hugenholtz, B. M. Goebel, N. R. Pace, *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 4765–4774; c) N. R. Pace, *Science* **1997**, 276, 734–740; d) J. T. Staley, A. Konopka, *Annu. Rev. Microbiol.* **1985**, 39, 321–346.
- [71] a) W. R. Streit, R. Daniel, *Metagenomics*, Springer Protocols, Berlin, **2010**; b) P. Lorenz, J. Eck, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 510–516.
- [72] a) L. Fernández-Arrojo, M.-E. Guazzaroni, N. López-Cortés, A. Beloqui, M. Ferrer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, 21, 725–733; b) T. Uchiyama, K. Miyazaki, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, 20, 616–622; c) M. Ferrer, A. Beloqui, K. N. Timmis, P. N. Golyshin, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 16, 109–123; d) L. L. Li, S. R. McCorkle, S. Monchy, S. Taghavi, D. van der Lelie, *Biotechnol. Biofuels* **2009**, 2, 10; e) C. Simon, R. Daniel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 85, 265–276; f) I. André, G. Potocki-Véronèse, S. Barbe, C. Moulis, M. Remaud-Siméon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19, 17–24.
- [73] L. Tasse, J. Bercovici, S. Pizzut-Serin, P. Robe, J. Tap, C. Klopp, B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, B. Henrissat, M. Leclerc, J. Doré, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, G. Potocki-Veronese, *Genome Res.* **2010**, 20, 1605–1612.
- [74] a) H. J. Flint, E. A. Bayer, M. T. Rincon, R. Lamed, B. A. White, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, 6, 121–131; b) C. A. Lozupone, M. Hamady, B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, B. Henrissat, J. I. Gordon, R. Knight, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 15076–15081.
- [75] D. A. Cecchini, E. Laville, S. Laguerre, P. Robe, M. Leclerc, J. Doré, B. Henrissat, M. Remaud-Siméon, P. Monsan, G. Potocki-Véronèse, *PLoS One* **2013**, 8, e72766.
- [76] R. Irague, S. Massou, C. Moulis, O. Saurel, A. Milon, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, J. C. Portais, G. Potocki-Veronese, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 1202–1206.
- [77] M. Hess, A. Sczyrba, R. Egan, T. W. Kim, H. Chokhawala, G. Schroth, S. Luo, D. S. Clark, F. Chen, T. Zhang, R. I. Mackie, L. A. Pennacchio, S. G. Tringe, A. Visel, T. Woyke, Z. Wang, E. M. Rubin, *Science* **2011**, 331, 463–467.
- [78] S. Wongwilaiwalin, T. Laothanachareon, W. Mhuanong, S. Tangphatsornruang, L. Eurwilaichitr, Y. Igarashi, V. Champreda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 8941–8954.
- [79] a) S. E. Blumer-Schuette, I. Kataeva, J. Westpheling, M. W. Adams, R. M. Kelly, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, 19, 210–217; b) A. Labourel, M. Jam, A. Jeudy, J. H. Hehemann, M. Czjzek, G. Michel, *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 2027–2042.
- [80] J. E. Graham, M. E. Clark, D. C. Nadler, S. Huffer, H. A. Chokhawala, S. E. Rowland, H. W. Blanch, D. S. Clark, F. T. Robb, *Nat. Commun.* **2011**, 2, 375.
- [81] a) V. G. Eijsink, G. Vaaje-Kolstad, K. M. Varum, S. J. Horn, *Trends Biotechnol.* **2008**, 26, 228–235; b) S. J. Horn, G. Vaaje-Kolstad, B. Westereng, V. G. Eijsink, *Biotechnol. Biofuels* **2012**, 5, 45.
- [82] a) K. Neufeld, J. Pietruszka, *ChemCatChem* **2012**, 4, 1239–1240; b) S. Fushinobu, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 88–89.
- [83] R. J. Quinlan, M. D. Sweeney, L. Lo Leggio, H. Otten, J. C. Poulsen, K. S. Johansen, K. B. Krogh, C. I. Jorgensen, M. Tovborg, A. Anthonsen, T. Tryfona, C. P. Walter, P. Dupree, F. Xu, G. J. Davies, P. H. Walton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 15079–15084.
- [84] a) C. M. Phillips, W. T. Beeson, J. H. Cate, M. A. Marletta, *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6, 1399–1406; b) W. T. Beeson, C. M. Phillips, J. H. Cate, M. A. Marletta, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 890–892; c) X. Li, W. T. Beeson, C. M. Phillips, M. A. Marletta, J. H. Cate, *Structure* **2012**, 20, 1051–1061.
- [85] G. R. Hemsworth, B. Henrissat, G. J. Davies, P. H. Walton, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 122–126.
- [86] G. Vaaje-Kolstad, B. Westereng, S. J. Horn, Z. Liu, H. Zhai, M. Sorlie, V. G. Eijsink, *Science* **2010**, 330, 219–222.
- [87] L. M. Chauvigné-Hines, L. N. Anderson, H. M. Weaver, J. N. Brown, P. K. Koech, C. D. Nicora, B. A. Hofstad, R. D. Smith, M. J. Wilkins, S. J. Callister, A. T. Wright, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 20521–20532.
- [88] a) T. Davids, M. Schmidt, D. Böttcher, U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, 215–220; b) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, 485, 185–194; c) N. J. Turner, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 567–573; d) R. J. Kazlauskas, U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 526–529; e) S. Lutz, U. T. Bornscheuer, *Protein Engineering Handbook*, Bd. 1 und 2, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**; f) S. Lutz, U. T. Bornscheuer, *Protein Engineering Handbook*, Bd. 3, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**; g) F. H. Arnold, G. Georgiou, *Methods Mol. Biol.*, Bd. 231, Humana, Totawa, **2003**; h) M. W. Peters, P. Meinhold, A. Glieder, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13442–13450.
- [89] R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Appl.* **1992**, 2, 28–33.
- [90] W. P. C. Stemmer, *Nature* **1994**, 370, 389–391.
- [91] M. Schülein, *Biochim. Biophys. Acta Struct. Mol. Enzymol.* **2000**, 1543, 239–252.
- [92] A. Rentmeister, *Chem. Ing. Tech.* **2013**, 85, 818–825.
- [93] W. J. Liu, X. Z. Zhang, Z. M. Zhang, Y. H. P. Zhang, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 76, 4914–4917.
- [94] M. M. Meyer, L. Hochrein, F. H. Arnold, *Prot. Eng. Des. Select.* **2006**, 19, 563–570.
- [95] P. C. Bruijninx, B. M. Weckhuysen, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 12198–12206; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 11980–11987.
- [96] L. Lin, X. Meng, P. F. Liu, Y. Z. Hong, G. B. Wu, X. L. Huang, C. C. Li, J. L. Dong, L. Xiaoy, Z. Liu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 82, 671–679.
- [97] V. H. Vu, K. Kim, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 22, 607–613.
- [98] M. Anbar, O. Gul, R. Lamed, U. O. Sezerman, E. A. Bayer, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, 78, 3458–3464.
- [99] T. Fukuda, T. Ishikawa, M. Ogawa, S. Shiraga, M. Kato, S. I. Suye, M. Ueda, *Biotechnol. Prog.* **2006**, 22, 933–938.
- [100] Y. S. Kim, H. C. Jung, J. G. Pan, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 788–793.
- [101] a) P. Heinzelman, C. D. Snow, M. A. Smith, X. L. Yu, A. Kannan, K. Boulware, A. Villalobos, S. Govindarajan, J. Minshull, F. H. Arnold, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 26229–26233; b) P. Heinzelman, C. D. Snow, I. Wu, C. Nguyen, A. Villalobos, S. Govindarajan, J. Minshull, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 5610–5615.
- [102] I. Wu, F. H. Arnold, *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, 110, 1874–1883.
- [103] Y. Ito, A. Ikeuchi, C. Imamura, *Prot. Eng. Des. Sel.* **2013**, 26, 73–79.
- [104] S. P. Voutilainen, H. Boer, M. Alapuranen, J. Janis, J. Vehmanpera, A. Koivula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 83, 261–272.
- [105] S. P. Voutilainen, P. G. Murray, M. G. Tuohy, A. Koivula, *Prot. Eng. Des. Sel.* **2010**, 23, 69–79.
- [106] P. Heinzelman, R. Komor, A. Kanaan, P. Romero, X. L. Yu, S. Mohler, C. Snow, F. Arnold, *Prot. Eng. Des. Sel.* **2010**, 23, 871–880.
- [107] R. S. Komor, P. A. Romero, C. B. Xie, F. H. Arnold, *Prot. Eng. Des. Sel.* **2012**, 25, 827–833.
- [108] C. M. Dana, P. Saija, S. M. Kal, M. B. Bryan, H. W. Blanch, D. S. Clark, *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, 109, 2710–2719.

- [109] C. Dumon, A. Varvak, M. A. Wall, J. E. Flint, R. J. Lewis, J. H. Lakey, C. Morland, P. Luginbühl, S. Healey, T. Todaro, G. DeSantis, M. Sun, L. Parra-Gessert, X. Tan, D. P. Weiner, H. J. Gilbert, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 22557–22564.
- [110] M. Timm, J. Gorl, M. Kraus, S. Kralj, H. Hellmuth, R. Beine, K. Buchholz, L. Dijkhuizen, J. Seibel, *ChemBioChem* **2013**, 14, 2423–2426.
- [111] M. A. Smith, A. Rentmeister, C. D. Snow, T. Wu, M. F. Farrow, F. Mingardon, F. H. Arnold, *FEBS J.* **2012**, 279, 4453–4465.
-