

Gentechnisch veränderte *Escherichia coli*-Zellen zur biokatalytischen Herstellung enantiomerenreiner Aminosäuren und sekundärer Alkohole.

Anne Menzel

**Gentechnisch veränderte *Escherichia coli*-
Zellen zur biokatalytischen Herstellung
enantiomerenreiner Aminosäuren und
sekundärer Alkohole**

D 93

Dissertation Universität Stuttgart, Institut für Industrielle Genetik, 2006.
Institut der Industriellen Genetik, Allmandring 31, 70569 Stuttgart, Germany

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart zur Erlangung
der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Ab-
handlung

vorgelegt von Anne Menzel aus Radebeul, Deutschland.

Hauptberichter: Prof. Dr. Ralf Mattes
Mitberichter: Prof. Dr. Christoph Syldatk

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Mai 2006

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese
Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN 3-9870745-6-4

© 2006 Verlag Dr. Stephan
Alle Rechte vorbehalten

Druck und Bindung: SOWA – Druck auf Wunsch

www.sowadruk.pl

**Gentechnisch veränderte *Escherichia coli*-Zellen zur
biokatalytischen Herstellung enantiomerenreiner
Aminosäuren und sekundärer Alkohole**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Anne Menzel

aus Radebeul

Hauptberichter:

Prof. Ralf Mattes

Mitberichter:

Prof. Christoph Syldatk

Tag der mündlichen Prüfung:

02. Mai 2006

Institut für Industrielle Genetik
der Universität Stuttgart

2006

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. R. Mattes danke ich für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes und für die Korrektur dieser Arbeit.

Prof. Dr. C. Syldatk danke ich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Dr. Josef Altenbuchner danke ich ganz besonders für die intensive wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die zahlreichen Diskussionen, Ratschläge und Anregungen, die diese Arbeit so umfangreich gemacht haben.

Dr. Harald Gröger danke ich ebenfalls für die Bereitstellung des Themas, für viele wertvolle wissenschaftliche Diskussionen und für die Möglichkeit zur Durchführung von Experimenten bei Degussa.

Meinen Kolleginnen und Exkolleginnen aus Labor 1 danke ich für die gute Zusammenarbeit, das abwechslungsreiche Arbeitsklima sowie die vielen fachlichen und nichtfachlichen Gespräche, welche die Arbeit immer spannend gestalteten.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus dem IIG, auch den Ehemaligen, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei Computer- und arbeitstechnischen Fragestellungen sowie für viele wertvolle Tipps und aufmunternde Gespräche.

Achim Hauck aus dem IBVT danke ich für die Einweisung und Hilfe bei Hochzell-dichtefermentationen sowie Dr. Martin Siemann für die Erlaubnis, die Fermentationen durchführen zu können.

Lutz Völker danke ich für seine Liebe, die unendliche Geduld, viel Verständnis und seine uneingeschränkte moralische Unterstützung für diese Arbeit sowie dafür, dass er mir jeden Tag die Kraft gibt, die ich für diese Arbeit gebraucht habe.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen und Einheiten	11
1 Zusammenfassung	15
1.1 Summary	15
1.2 Kurzfassung.....	16
2 Einleitung	19
2.1 Herstellung von natürlichen und synthetischen organischen Verbindungen	19
2.1.1 Anforderungen an Mikroorganismen und Enzyme für Biokatalysen	20
2.1.2 Arten von Biotransformationen.....	21
2.1.3 Industrielle Prozesse mit Biokatalysatoren	23
2.1.3.1 Herstellung von organischen Säuren, Antibiotika und Lipiden	23
2.1.3.2 Bedeutung der Enantiomerenreinheit.....	29
2.1.3.3 Herstellung enantiomerenreiner Substanzen mit chemischen Verfahren.	30
2.1.3.4 Herstellung von Aminosäuren mit Mikroorganismen und Aminosäuredehydrogenasen.....	31
2.1.4 Alkoholdehydrogenasen für Biotransformationen	35
2.1.5 Biotransformationen mit Enzymen und rekombinanten Mikroorganismen mit Kofaktorregenerierung	38
2.1.6 Arten der Kofaktorregenerierung und kofaktorregenerierende Enzyme.....	41
2.2 Neue Aminosäure- und Alkoholdehydrogenasen	47
2.2.1 Screeningverfahren.....	47
2.2.1.1 Klassisches (aktivitätsbasiertes) Screening	47
2.2.1.2 Genetisches Screening	48
2.3 Zielsetzung	50
2.3.1 Design von Ganzzellkatalysatoren für reduktive Aminierungen und Reduktionen von α -Ketosäuren	50
2.3.2 Suche nach neuen Alkoholdehydrogenasen in <i>S. coelicolor</i> A3(2)	50
3 Materialien und Methoden	53
3.1 Materialien	53
3.1.1 Enzyme und Kofaktoren.....	53
3.1.2 Feinchemikalien	53
3.1.3 Sonstige Chemikalien	53
3.1.4 Nicht selbständig hergestellte Plasmide	53

3.1.5	Verwendete Kits	54
3.1.6	Verwendete Medien	55
3.1.7	Antibiotika und andere Zusätze	56
3.1.8	Puffer, Lösungen und Testlösungen	57
3.1.9	Bakterienstämme	59
3.2	Methoden	59
3.2.1	Stammhaltung von <i>E. coli</i> und <i>Pseudomonas</i> sp.	59
3.2.2	Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>Pseudomonas</i> sp.	60
3.2.3	Induktion der Genexpression mit L-Rhamnose, L-Arabinose und D-Mannitol	60
3.2.4	Zugabe von Metallionen	60
3.2.5	Molekulargenetische Methoden	61
3.2.5.1	Plasmidisolierung mit QIAprep®Spin Miniprep Kit	61
3.2.5.2	Plasmidisolierung nach Lee und Rasheed (1990, modifiziert).....	61
3.2.5.3	Hergestellte Plasmide	62
3.2.5.4	Agarosegelelektrophorese	63
3.2.5.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	64
3.2.5.6	Verwendete Oligonukleotide	64
3.2.5.7	Genamplifikation mit PCR.....	65
3.2.5.8	Reinigung von PCR-Fragmenten.....	67
3.2.5.9	Restriktionsverdau	67
3.2.5.10	Isopropanolfällung	67
3.2.5.11	Behandlung mit Alkalischer Phosphatase.....	68
3.2.5.12	Behandlung mit Klenow-Polymerase	68
3.2.5.13	Ligation	68
3.2.6	Plasmidübertragungen	69
3.2.6.1	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmiden.....	69
3.2.6.2	Kreuzung von <i>E. coli</i> und <i>P. putida</i> KT2440	69
3.2.7	Proteinanalytik	70
3.2.7.1	Zellernte bei Genexpressionsuntersuchungen	70
3.2.7.2	Zellaufschluss und Herstellung von Zellrohextrakt	70
3.2.7.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	70
3.2.7.4	Proteinbestimmung	72
3.2.7.5	Aktivitätstests	72
3.2.7.6	Reinigung von Proteinen über IMAC (immobilized metal affinity chromatography).....	73
3.2.7.7	Affinitätsreinigung mit Strep-Tag (nach IBA-Protokoll)	74
3.2.8	Herstellung von L- <i>tert</i> -Leucin aus Trimethylpyruvat	75

3.2.9	Herstellung von p-Chlorphenylethanol	76
3.2.10	HPLC-Analytik („high pressure liquid chromatography“).....	76
3.2.11	Hochzelldichtefermentation (nach Wilms et al., 2001)	78
4	Ergebnisse.....	81
4.1	Konstruktion von Ganzzellkatalysatoren.....	81
4.1.1	Herstellung der Vektoren mit Formiatdehydrogenase-Genen.....	81
4.1.2	Herstellung der Vektoren mit dem Gen <i>ldh</i>	83
4.1.3	Expression der Gene <i>fdhCB</i> und <i>fdhMV</i>	85
4.1.4	Expression von <i>fdh1</i> aus <i>M. extorquens</i> AM1.....	89
4.1.5	Expression von <i>ldh</i>	98
4.1.6	Expression von <i>sfcA</i>	100
4.1.7	Koexpression von Genen für die L- <i>tert</i> -Leucin-Synthese	101
4.1.7.1	Koexpression von <i>fdhCB</i> und <i>ldh</i> in <i>E. coli</i> -Stämmen in Schüttelkulturen.....	102
4.1.7.2	Koexpression von <i>sfcA</i> und <i>ldh</i> in <i>E. coli</i> -Stämmen als Schüttelkultur...	105
4.1.8	Katalyseparameter für die Herstellung von L- <i>tert</i> -Leucin	106
4.1.8.1	Bestimmung von pH- und Temperatur-Optimum für die TMP-Umsetzung.....	106
4.1.8.2	Hochzelldichtefermentation des FDH-CB/LDH-Ganzzellkatalysators	109
4.1.9	Optimierung der reduktiven Aminierung von TMP zu L- <i>tert</i> -Leucin	110
4.1.9.1	Erhöhung der Substratkonzentration.....	110
4.1.9.2	Erhöhung des TMP-Umsatzes durch NAD ⁺ -Zugabe	111
4.1.9.3	Erhöhung des TMP-Umsatzes durch Substrat-Zudosierung.....	113
4.1.9.4	Recycling des LDH/FDH-CB-Ganzzellkatalysators	115
4.2	Herstellung von sekundären Alkoholen	117
4.2.1	Klonierung von <i>adhRE</i> und <i>adhRE</i> -Derivaten.....	117
4.2.2	Klonierung der Gene <i>adhAP(A)</i> und <i>adhAP(G)</i>	119
4.2.3	Expression von <i>adhRE</i> und <i>adhRE</i> -Derivaten	120
4.2.4	Expression von <i>adhAP(A)</i> und <i>adhAP(G)</i>	125
4.2.5	Koexpression von <i>fdhCB</i> , <i>fdhMV</i> und <i>sfcA</i> mit <i>adhRE(co)</i> bzw. <i>adhAP(A)</i>	127
4.2.6	Hochzelldichtefermentation des Ganzzellkatalysators <i>E. coli</i> BW3110 pAM3.25/pNO11 nach Wilms et al. (2001)	129
4.2.7	Stabilitätsuntersuchungen zum Plasmid pNO11	132
4.2.8	Stabilität Enzyme ADH-RE, FDH-CB, FDH-MV und Malic Enzyme gegenüber p-Chloracetophenon und p-Chlorphenylethanol.....	133

4.2.9	Reaktionsoptimierung.....	138
4.2.9.1	Zugabe von NAD ⁺ zum Reaktionsansatz und Erhöhung des Reaktionsvolumens	138
4.2.9.2	Optimierung von Zellmenge und NAD ⁺ -Konzentration zur Umsetzung von p-Chloracetophenon mit Ganzzellkatalysatoren	141
4.2.10	Umsetzung von p-Chloracetophenon mit dem Ganzzellkatalysator <i>E. coli</i> BW3110 pAM3.25 / pAM121.4	145
4.2.11	Umsetzung von p-Chloracetophenon mit dem Ganzzellkatalysator <i>E. coli</i> BW3110 pHWG640.12 / pNO9	146
4.3	ADHF1 aus <i>P. fluorescens</i> DSM 50106 - Expression, Aufreinigung und Enzymstabilität.....	149
4.3.1	Expressionsvektoren mit <i>adhF1</i>	149
4.3.2	Expression von <i>adhF1</i> in <i>E. coli</i> JM109 pJOE4016.7 und anderen <i>E. coli</i> - Stämmen	151
4.3.3	Expression von <i>adhF1</i> in <i>E. coli</i> JM109 mit unterschiedlichen Expressionsvektoren	154
4.3.4	Substrate von ADHF1 und Aktivitätsoptima	156
4.3.5	Aufreinigung und Lagerstabilität von ADHF1	159
4.4	Genetisches Screening nach Alkoholdehydrogenasen.....	162
4.4.1	Expression von ADHs aus <i>S. coelicolor</i> A3(2)	162
5	Diskussion und Ausblick.....	167
5.1	FDH als kofaktorregenerierendes Enzym	167
5.2	Malic Enzyme als kofaktorregenerierendes Enzym	169
5.3	Zugabe vom Kofaktor NAD ⁺ zur Biokatalyse.....	171
5.4	Kontrolle und Regulation des pH-Wertes.....	172
5.5	Der Ganzzellkatalysator LDH/FDH-CB	173
5.6	Die Ganzzellkatalysatoren ADH-RE/FDH-CB und ADH-RE/FDH-MV	174
5.7	Freie Zellen als Biokatalysatoren	176
5.8	Charakterisierung von ADHF1	178
5.9	Genetisches Screening nach Alkoholdehydrogenasen.....	179
6	Literaturverzeichnis	181
7	Anhang	191
	Lebenslauf.....	207

ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

Nomenklatur

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
ADH	Alkoholdehydrogenase
<i>adhAP</i> /ADH-AP	Alkoholdehydrogenase aus <i>Arthrobacter paraffineus</i>
<i>adhF1</i> /ADHF1	Alkoholdehydrogenase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50106
<i>adhRE</i> /ADH-RE	Alkoholdehydrogenase aus <i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 43297
amp/bla/Ap ^R	Ampicillin/Gen für β -Lactamase/Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cam/ <i>cat</i> /Cm ^R	Chloramphenicol/-acetyltransferase/-Resistenz
C-Quelle	Kohlenstoff-Quelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FAD(H ₂)	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
<i>fdhCB</i> /FDH-CB	Formiatdehydrogenase aus <i>Candida boidinii</i>
<i>fdh1AB</i> /FDH-ME1	Formiatdehydrogenase 1 aus <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1

<i>fdhMV</i> /FDH-MV	Formiatdehydrogenase aus <i>Mycobacterium vaccae</i> N10
<i>fmo</i> /FMO	Flavin bindende Monooxygenase aus <i>P. fluorescens</i> DSM 50106
G	Guanin
eGFP	green fluorescent protein
HexOH	Hexanol
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kan/Km ^R	Kanamycin/Kanamycin-Resistenz
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
<i>ldh</i> /LDH	Leucindehydrogenase
<i>ldhA</i> /LdhA	Lactatdehydrogenase aus <i>E. coli</i>
<i>sfcA</i> /ME	Malic Enzyme
lt.	laut
MeOH	Methanol
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NaPP	Natriumphosphatpuffer
N. lt. P.	Nomenklatur laut Publikation
N-Quelle	Stickstoff-Quelle
p-CAP	p-Chloracetophenon
p-CPE	p-Chlorphenylethanol
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
<i>tert</i> -	tertiär
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMP	Trimethylpyruvat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TSS	Transformation and Storage Solution
UV	ultraviolet
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-indolyl- β -D-galactopyranosid

Formelzeichen und Einheiten

Formelzeichen/ Einheit	Bedeutung
a	Jahr
h	Stunde
min	Minute
s	Sekunde
cm	Zentimeter
mm	Millimeter
μm	Mikrometer
m^2	Quadratmeter
m^3	Kubikmeter
l	Liter
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
kg	Kilogramm
g	Gramm
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
mol	Mol
mmol	Millimol
μmol	Mikromol
M	molar
mM	millimolar
U	Units bzw. Enzymeinheiten
(k)Da	(Kilo)Dalton

1 Zusammenfassung

1.1 Summary

Enantiomerically pure compounds play an important role in pharmaceutical industries for producing and licensing new drugs. Especially biocatalysts are suitable for synthesizing optically active compounds due to their high enantio- and regioselectivity compared with chemical catalysts. As part of the BMBF project “Nachhaltige Herstellung von enantiomerenreinen Alkoholen und Aminosäuren mit Biokatalysatoren” recombinant *Escherichia coli* strains were created for producing optically active amino acids and alcohols from α -keto acids and ketones. Additional genes were provided for the regeneration of the cofactor nicotinamide adenine dinucleotide (NADH).

At the beginning emphasis was on the amplification, cloning and coexpression of the various genes. For the synthesis of amino acids by reductive amination of α -keto acids the gene *ldh* of *Bacillus cereus* leucine dehydrogenase (LDH) was chosen. For synthesizing secondary alcohols genes of three different alcohol dehydrogenases (ADHs) were available: *adhRE* (gene of *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297 ADH), *adhAP* (gene of *Arthrobacter paraffineus* ADH) and *adhF1* (gene of *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 ADH). Additionally *adhRE* was available both as wildtype gene and as synthetic codon optimized gene with a codon usage adapted to that of the *E. coli* host strain. The recombinant genes were inserted in expression vectors under the control of the *E. coli* rhamnose promoter (Stumpp et al., 2000). On the same or a compatible vector genes of formate dehydrogenases (*fdhCB*, *fdhMV* and *fdh1*) and a malic enzyme (*sfcA*) were coexpressed for the regeneration of NADH. The designed whole cell catalysts were used to analyse and optimize the production of L-*tert*-leucine from trimethyl pyruvate and the synthesis of the secondary alcohol p-chlorophenylethanol from p-chloroacetophenone as model compounds for amino acids and secondary alcohols. Suitable strains were fermented in high cell density fermentations as described by Wilms et al. (2001). Upscaling of the production of L-*tert*-leucine from laboratory scale to pilot scale is in progress at Degussa project house biocatalysis.

During the search for new ADH genes in genome data bases it was noticed that actinomycetes, in particular mycobacterial and streptomycetes encode many genes with high sequence identity with ADHs (about 50 homologous genes per genome). Seven of 11 ADH related genes of the genome of *Streptomyces coelicolor* were

amplified with polymerase chain reaction (PCR) and cloned in *E. coli*. From five genes soluble proteins were produced as detected by SDS-Page.

1.2 Kurzfassung

Die Verwendung enantiomerenreiner Substanzen spielt heute vor allem in der Zulassung neuer Medikamente eine entscheidende Rolle. Besonders geeignet für die Synthese sind Biokatalysen aufgrund ihrer im Gegensatz zu chemischen Katalysen meist hohen Enantio- und Regioselektivität. Im Rahmen des BMBF-Projektes „Nachhaltige Herstellung von enantiomerenreinen Alkoholen und Aminosäuren mit Biokatalysatoren“ wurden rekombinante *Escherichia coli*-Stämme zur Herstellung von optisch aktiven Aminosäuren und Alkoholen aus α -Ketosäuren und Ketonen konstruiert. Diese als Ganzzellkatalysatoren verwendeten Bakterien verfügen gleichzeitig über ein zweites Enzym zu Regeneration des für die Reaktion benötigten Kofaktors Nikotinamidadenindinukleotid (NADH).

Zunächst stand die Amplifikation, Klonierung und Expression der beteiligten Gene im Vordergrund. Für die Herstellung der Aminosäuren durch reduktive Aminierung von α -Ketosäuren wurde das Gen *ldh* der Leucindehydrogenase (LDH) aus *Bacillus cereus* ausgewählt. Für die Herstellung sekundärer Alkohole durch Reduktion von Ketonen standen Gene verschiedener Alkoholdehydrogenasen (ADHs) zur Verfügung. Dies waren *adhRE* (Gen für ADH aus *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297), *adhAP* (Gen für ADH aus *Arthrobacter paraffineus*) und *adhF1* (Gen für ADH aus *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106). Von *adhRE* wurde sowohl das Wildtypgen als auch ein synthetisches Codon-optimiertes Gen verwendet, welches an die Codon Usage von *E. coli* angepasst wurde. Die Insertion der Gene erfolgte jeweils in einen Expressionsvektor unter die Kontrolle des Rhamnosepromotors aus *E. coli* (Stumpff et al., 2000). Für die Kofaktorregenerierung standen Gene von Formiatdehydrogenasen (*fdhCB*, *fdhMV* und *fdh1*) und einem Malic Enzyme (*sfcA*) zur Verfügung, die ebenfalls in Expressionsvektoren mit Rhamnosepromotor inseriert wurden. Die Expression der Gene für die Ketoreduktion bzw. reduktive Aminierung wurde sowohl einzeln als auch in Koexpression mit einem kofaktorregenerierenden Enzym untersucht. Mit den entwickelten Ganzzellkatalysatoren wurden Untersuchungen zur Produktion der Aminosäure L-*tert*-Leucin und des sekundären Alkohols p-Chlorphenylethanol durchgeführt und die verschiedenen Ganzzellkatalysatoren hinsichtlich ihrer Umsetzungsergebnisse analysiert. Mit geeigneten Stämmen wurden schließlich Hochzeldichtefermentationen nach Wilms et al. (2001) durchgeführt. Die Produktionen von L-*tert*-Leucin und p-Chlorphenylethanol wurden für den Labormaßstab optimiert und die L-*tert*-Leucin-Synthese bereits auf den Pilotmaßstab übertragen (bei Degussa *project house biocatalysis*).

Bei Genbankrecherchen zur Suche nach neuen ADHs fiel auf, dass Actinomyceten, das heißt Mycobakterien und Streptomyceten, besonders reich an Genen sind, die hohe Sequenzidentität mit ADHs haben (ca. 50 homologe Gene pro Stamm). Daher wurde eine Reihe von diesen Genen aus dem Genom von *Streptomyces coelicolor* über PCR amplifiziert und in *E. coli* exprimiert. Von elf gewählten Genen konnten sieben amplifiziert und kloniert werden. Bei fünf von diesen konnten lösliche Proteine produziert werden, die in SDS-Page deutlich sichtbar waren.

2 Einleitung

2.1 Herstellung von natürlichen und synthetischen organischen Verbindungen

Die Synthese organischer Verbindungen ist ein wichtiger Bestandteil unseres Lebens. Sie ist zum einen in jedem Organismus als Teil des Stoffwechsels von zentraler Bedeutung und trägt andererseits beispielsweise zu unserem heutigen Stand der Industrialisierung, der Krankheitsbekämpfung und Nahrungsmittelvielfalt bei. Natürliche und nicht natürlich vorkommende organische Verbindungen können auf chemischen oder biologischem Weg hergestellt werden, wobei bei letzterem entweder ganze Zellen oder gereinigte Enzyme zur Synthese eingesetzt werden können.

Die chemische Industrie hatte ihren größten Aufschwung mit Beginn der Industrialisierung Anfang des 19. Jahrhunderts, als das Nutzen fossiler Brennstoffe, hauptsächlich Erdöl, als Energiequelle und Ausgangsstoff für viele unnatürliche Materialien wie Kunststoffe entdeckt wurde. Z. B. wurden in der Textilindustrie natürliche Rohstoffe wie Flachs oder Baumwolle durch wesentlich billigere Polymere wie Nylon ersetzt (Willke und Vorlop, 2004). Während der Zeit wurde immer wieder nach neuen Rohstoffen für chemische Synthesen gesucht, da sich fossile Brennstoffe als nicht erneuerbar herausstellten. Heutzutage werden daher auch biologisch leicht generierbare Stoffe wie Stärke, Zucker und Molasse, die aus landwirtschaftlicher Überproduktion oder als Abfall entstehen, als Rohstoffe genutzt, aber immer noch zu einem kleinen Anteil im Vergleich zu den fossilen Brennstoffen. Das Einbringen biologischer Rohstoffe in einen chemischen Prozess hat meist auch einen biologischen Teilschritt zur Folge, der mittels Mikroorganismen oder Enzymen durchgeführt wird. Wichtige biologische Materialien für industrielle Chemikalien sind z. B. Ölpflanzen (Bereitstellung von Ölen, Fetten, Glycerolen, Cellulose), stärkehaltige Pflanzen (Bereitstellung von Kohlenhydraten, Inulin, Stärke, Cellulose) oder Biomasse, Fette und Öle (Willke und Vorlop, 2004), die Abfallprodukte aus der landwirtschaftlichen Industrie sind.

Im Allgemeinen wird bei chemischen Synthesen ein Produkt aus einem Rohstoff über mehrere Synthese-, Trennungs-, Konzentrations- und Aufreinigungsschritte hergestellt. Die Vielzahl an Schritten bedeuten meist einen großen energetischen Aufwand, einen hohen Anteil an Nebenprodukten durch zum Teil unreine Ausgangsstoffe, eine geringe Produktausbeute und auch die Nutzung spezieller Lösungsmittel oder Katalysatoren für die jeweiligen Reaktionen. Die chemischen Katalysen benötigen meist hohe Temperaturen, hohe Drücke und oft auch organische Lösungsmittel.

Die Optimierung einer chemischen Katalyse ist langwierig und teuer. Um den Wirkungsgrad eines Prozesses zu erhöhen und die Umwelt vor schädlichen Emissionen (Abgase, Liquide) zu schützen, werden nicht umgesetzte Rohstoffe und Nebenprodukte daher auch anderen Synthesen bereitgestellt. Aufgrund der vielen Nachteile und technischen Aufwendungen chemischer Katalysen ist ein Ersetzen durch biotechnologische Methoden basierend auf erneuerbaren Rohstoffen sehr interessant.

Biotechnologische Prozesse oder Biotransformationen können in die klassischen Prozesse, die schon einige Jahrtausende alt sind (z. B. Bier- und Brotherstellung), und moderne Prozesse gegliedert werden, wobei bei den modernen Prozessen wiederum eingeteilt werden kann in solche, die chemische Prozesse ersetzen oder mit diesen kombiniert werden können und solche, die keine chemischen Prozesse als Grundlage haben. Zur Zeit gibt es nur wenige Produkte, die biotechnologisch in großen Mengen hergestellt werden. Dazu gehören Ethanol (12,6 Mio. t/a), Zitronensäure (750.000 t/a), einzelne Aminosäuren mit mehreren 100.000 t/a, organische Säuren (Fruchtsäuren, Essigsäure, Milchsäure) mit mehreren 10.000 t/a sowie Vitamine (B₂ und B₁₂) und Antibiotika mit mehreren 1.000 t/a (Willke und Vorlop, 2004).

Biologische Synthesen haben den großen Vorteil, dass aufgrund der Selektivität der beteiligten Mikroorganismen oder Enzyme kaum Nebenreaktionen und als Nebenprodukte oft nur Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Wasser auftreten. Wenn andere Nebenprodukte auftreten, sind diese meist auch biologisch abbaubar. Potentielle Anwendungen für biotechnologische Stoffumwandlungen ergeben sich in vielen Bereichen wie Polymer-, Brennstoff-, Lösungsmittel- und Baustoffindustrie, Papierindustrie, Textilindustrie, Pharmazie, Medizin und Lebensmittel- und Futteradditivindustrie (Willke und Vorlop, 2004).

2.1.1 Anforderungen an Mikroorganismen und Enzyme für Biokatalysen

Mikroorganismen und Enzyme, die für industrielle Biokatalysen eingesetzt werden, müssen bestimmte Eigenschaften besitzen und Anforderungen erfüllen, die sie dafür geeignet machen. Mikroorganismen müssen unter moderaten Bedingungen hohe Wachstumsraten besitzen, um viel Biokatalysator bzw. viel Biomasse erzeugen zu können. Die Substrate für das Biomassewachstum sollten billig sein und beispielsweise aus Abfällen anderer Produktionen (Stärke, Zucker, Öle, Fette) bestehen. Die Stämme sollten zudem nicht anfällig gegenüber leichten Schwankungen der physikalischen Kulturbedingungen sein, genetisch stabil sein, das heißt, eine geringe Mutationsrate besitzen, und im Einsatz als Biokatalysator keine unerwünschten Nebenreaktionen durchführen, welche die Produktausbeute beeinflussen. Darüber hinaus sollten die Umsatzraten des Substrates zum gewünschten Produkt hoch sein. Als Mög-

lichkeiten, um Mikroorganismen gezielt für die gewünschte Biokatalyse zu optimieren, werden vor allem Genmutationen in Stoffwechselwegen, z. B. Ausschalten von Nebenreaktionen, oder *Genetic Engineering*, dem Einbringen neuer, zum Teil optimierter Gene, genutzt.

Werden nur Enzyme als Biokatalysatoren eingesetzt, sollte deren Herstellung in großen Mengen und kostengünstig durchzuführen sein. Da Enzyme vor ihrem Einsatz meist von der Biomasse mit einem Zellaufschlussverfahren abgetrennt werden müssen, sollte auch die Aufreinigung möglichst einfach ablaufen. Die Enzyme sollten wie beim Einsatz von Biomasse hohe Umsatzraten des jeweiligen Substrates erreichen, ein breites Substratspektrum akzeptieren und eine hohe Stereo- und Regioselektivität haben, um möglichst reines Produkt zu synthetisieren. Enzyme für industrielle Anwendungen sollten zudem auch in nichtwässrigen Lösungsmitteln stabil sein, da viele Substrate nur in Lösungsmitteln für Stoffumwandlungen zugänglich gemacht werden können. Weiterhin sollten die verwendeten Enzyme Biotransformationen möglichst ohne Zugabe von Additiven wie beispielsweise Kofaktoren (NAD(H), NADP(H)) oder giftigen Metallionen (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) durchführen können, um Produktionskosten zu sparen und die Produktaufarbeitung zu erleichtern.

2.1.2 Arten von Biotransformationen

Stoffumwandlungen mit biologischen Katalysatoren können wie folgt gegliedert werden. Es gibt Stoffumwandlungen mit:

- ganzen Zellen mit geeigneten Stoffwechselwegen (frei oder immobilisiert)
- ganzen Zellen mit rekombinant exprimierten Genen (frei oder immobilisiert)
- aufgereinigten Enzymen (frei, verkapselt oder immobilisiert).

Biotransformationen mit aufgereinigten Enzymen haben gegenüber ganzen Zellen den Vorteil, dass unerwünschte Nebenreaktionen wie Abbau, Glykosylierung oder Methylierung des erzeugten Endproduktes ausgeschlossen werden können. Nachteil der gereinigten Enzyme ist ihre Aufreinigung, die mit hohen Kosten verbunden sein kann.

Enzyme für Biokatalysen können frei oder an einem Trägermaterial immobilisiert eingesetzt werden. Die Immobilisierung kann kovalent (EUPERGIT[®], Boller et al., 2002) oder durch einfache Adsorption (Silicagele, modifizierte Dextrane) erfolgen, die Enzyme können mit dem Trägermaterial quervernetzt oder verkapselt sein oder in Mikrokapseln vorliegen. Bewährt haben sich bei enzymatischen Biokatalysen vor allem immobilisierte Enzyme in Enzymmembranreaktoren und verkapselte Enzyme, da diese im Gegensatz zu freien Enzymen nach der Reaktion im Reaktor zurückgehalten und wieder eingesetzt werden können. Sie sind damit geeignet für kontinu-

ierliche und wiederholte Batchverfahren. Werden freie Enzyme in kontinuierlichen Prozessen genutzt, werden sie durch den Einsatz von Membranen im Reaktor zurückgehalten und nach Abschluss des Prozesses nicht mehr regeneriert.

Mehr als die Hälfte aller industriellen (enzymatischen) Biotransformationen werden mit hydrolytischen Enzymen durchgeführt (Proteasen, Esterasen, Lipasen). Sie sind in großen Mengen herstellbar, stabil in organischen Lösungsmitteln und benötigen keine Kofaktoren. Rund 30 % aller Biotransformationen werden mit Dehydrogenasen und Oxygenasen durchgeführt, wobei diese auf teure Kofaktoren wie NAD(H) oder NADP(H) angewiesen sind. Oxygenase-Reaktionen werden industriell auch mit ganzen Zellen durchgeführt. Etwa 20 % aller Biotransformationen werden schließlich durch Enzyme wie Lyasen, Transferasen und Isomerasen umgesetzt. In Tabelle 1 sind einige wichtige industrielle Enzyme und ihre Verwendung zusammengestellt.

Tabelle 1: Beispiele für industriell genutzte Enzyme (aus R. Schmid: Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik, 2002 und aus Biotechnological Innovations in Chemical Synthesis, 1997).

Enzym	Katalysierte Reaktion	Beispiele
Esterase	Spaltung von Esterbindungen zur Herstellung von Säuren und Alkoholen	Pectin-Methyl-Esterase aus <i>Aspergillus</i> sp.
Lipase	Spaltung von Fetten in Glycerin und Fettsäuren	Lipase aus <i>Candida</i> sp.
Protease	hydrolytische Spaltung von Proteinen	Trypsin, Pepsin, Chymosin
Lyase	Spaltung von C-C-Bindungen	Isocitrat-Lyase, Pectin-Lyase
Transferase	Transfer von funktionellen Gruppen	Glukokinase, Aminotransferase
Isomerase	Herstellung von Strukturisomeren	Glucoseisomerase aus <i>Streptomyces</i> sp. oder <i>Bacillus</i> sp.
Cellulasen, Hemicellulasen, Amylasen	Abbau von Cellulose, Polyosen und Stärke zur Herstellung von Glucose, Xylose, Fructose, Maltose, Dextrinen	Cellulase, α -Amylase, β -Amylase, Glucoamylase (aus <i>Trichoderma reesii</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.)

Ob freie oder immobilisierte Enzyme eingesetzt werden, ist abhängig von den Herstellungskosten des Enzyms. Ist es günstig und in großen Mengen herzustellen, lohnt sich eine Immobilisierung oft nicht und das Enzym wird nach dem Prozess verworfen. Bei hohen Herstellungskosten für das Enzym ist eine Immobilisierung oft sinnvoll, um die Einsatzzeit zu verlängern und die Prozesskosten niedrig zu halten. Weitere Punk-

te, die spezifisch für den Einsatz eines Enzyms in freier oder immobilisierter Form sind, betreffen Stabilität, Limitierung des Stofftransports, Aktivität, kinetische Konstanten und die Art des Substrates.

2.1.3 Industrielle Prozesse mit Biokatalysatoren

Ein wichtiger Bestandteil der modernen Biotechnologie sind durch gezielte genetische Veränderung hergestellte Mikroorganismen oder Enzyme, die in der Lage sind, ihre natürlichen Produkte und Derivate von diesen in wirtschaftlich interessanten Mengen herzustellen, die zum Beispiel großen therapeutischen Nutzen haben (Wachstumshormone, Interferone, Interleukine, Steroidhormone). Im Folgenden soll kurz auf einige beispielhafte industrielle Verfahren und Prozesse eingegangen werden, die mit Biokatalysatoren durchgeführt werden bzw. durchgeführt werden könnten. Dazu wird als erstes die Herstellung organischer Säuren, Antibiotika und Lipide betrachtet und anschließend auf die Herstellung von Aminosäuren mit einigen speziellen Beispielen eingegangen. Weitere Verfahren können z. B. in R. Schmid: Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik (2002) oder Biotechnological Innovations in Chemical Synthesis (diverse Autoren, 1997) nachgeschlagen werden.

Für industrielle Produktionen und als Produkte für die weiterführenden Industrien sind besonders Abfall- und Endprodukte aus dem zellulären Stoffwechsel interessant (z. B. Aminosäuren oder Stoffwechselintermediate in Form organischer Säuren). Diese Produkte müssen durch die Mikroorganismen in wirtschaftlich großen Mengen produziert werden, es muss eine gewisse Nachfrage für diese Produkte bestehen und natürlich müssen Produktion und Produktextraktion wirtschaftlich sein. Um organische Säuren und andere Produkte in und durch Mikroorganismen in großen Mengen herstellen zu können, müssen die Kulturbedingungen angepasst werden (Temperatur, pH-Wert, Medienzusammensetzung) und wenn nötig zur Unterbrechung von weiterführenden Stoffwechselwegen auch auf bestimmte Zusätze (Kofaktoren, Metalionen) verzichtet oder Substratanaloga zugegeben werden. Weitere Möglichkeiten sind Mutationen im Genom des Mikroorganismus, die dazu führen, dass nur ein bestimmter Stoffwechselweg genutzt wird, sowie das genetische Verändern des Mikroorganismus durch Einbringen rekombinanter Gene.

2.1.3.1 Herstellung von organischen Säuren, Antibiotika und Lipiden

Organische Säuren, Antibiotika und Lipide, zu denen Fettsäuren (gesättigt und ungesättigt), Triglyceride, Phospholipide, Glycolipide, aliphatische Alkohole, Wachse, Terpene und Sterole / Steroide gehören, bilden einen Großteil der industriellen Herstellung mit Mikroorganismen und Enzymen als Biokatalysatoren. Eine kurze Zusammenfassung

menfassung soll hier einen Überblick über aktuelle Verfahren zur Herstellung beispielhafter Vertreter der genannten organischen Verbindungen geben.

Organische Säuren sind dadurch charakterisiert, dass sie über mindestens eine Carboxylgruppe (-COOH) verfügen und der saure Charakter nicht durch Phosphat- oder Sulfatgruppen erreicht wird. Sie besitzen eine einfache chemische Struktur und sind entweder Endprodukte des zellulären Stoffwechsels oder zentrale Metabolite, die in kleinen konstanten Mengen im Stoffwechsel vorliegen. Von Cartledge (1997) werden die organischen Säuren in vier Untergruppen geteilt:

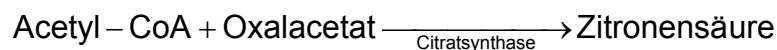
- Säuren, die keinen Ursprung aus Kohlenwasserstoffverbindungen haben, aber universell produziert werden (Aminosäuren und Fettsäuren)
- Säuren, die ständig hergestellt werden, wie Pyruvat und Säuren des Zitronensäurezyklus
- Säuren, die ihren Ursprung aus Kohlenwasserstoffverbindungen haben wie 6-Phosphogluconat, 1,3-Diphosphoglycerat
- Säuren, die Abfallprodukte im anaeroben Stoffwechsel darstellen wie Laktat, Acetat, Formiat, Succinat und Butyrat.

Tabelle 2: Industriell hergestellte organische Säuren mit ihren mikrobiellen Produzenten.

Organische Säure	Anwendung	Produzent (Mikroorganismus)
Zitronensäure	Getränke, Marmeladen, Gelees, Pharmazeutika, Kosmetika, Kunststoffindustrie, Detergenzien, Bekleidungsindustrie	<i>Aspergillus niger</i>
Äpfelsäure	Lebensmittelindustrie	<i>Lactobacillus brevis</i>
Fumarsäure	Kunststoffindustrie, Lebensmittelindustrie, Substrat für die Herstellung von Äpfelsäure	<i>Rhizopus delemar</i>
Itaconsäure	Kunststoffindustrie, Farbenindustrie	<i>Aspergillus terreus</i>
Gluconsäure, Gluconolacton	Lebensmittelindustrie, Reinigungsmittel, Zementzusatz, Pharmazeutika, Backmittelindustrie	<i>A. niger, Gluconobacter suboxidans</i>
Essigsäure	Lebensmittel- und Getränkeindustrie	<i>Acetobacter aceti</i>
Milchsäure	Lebensmittel- und Getränkeindustrie, Textilindustrie	Milchsäurebakterien

Die Herstellung der meisten organischen Säuren erfolgt über Fermentation. Die organischen Säuren werden während der Wachstumsphase des Organismus in geringen Mengen gebildet, und dann in der stationären Phase, in der auch Sekundärmetabolite gebildet werden, in großen Mengen angereichert. In Tabelle 2 sind einige industriell wichtige organische Säuren und ihr Produktionsstamm zusammengestellt. Zitronensäure ist dabei eine der wichtigsten organischen Säuren. Die Nutzung von Zitronensäure wurde schon vor 1900 mit einer Nachfrage von mehreren 10.000 t/a angegeben. Bis dahin wurde Zitronensäure aus dem Saft ausgepresster Zitrusfrüchte gewonnen, indem die Säure mit Kalzium ausgefällt wurde. Aufgrund des hohen Aufwandes waren die Preise entsprechend hoch. Im Jahre 1883 fand Wehmer heraus, dass ein Pilz der Gattung *Penicillium* Zitronensäure im flüssigen Medium anreichert. Er versuchte einen Prozess daraus zu entwickeln und traf auf zwei Probleme – eine sehr langsame Produktion über mehrere Wochen und Kontaminationen, die durch einen neutralen Prozess-pH-Wert auftraten.

Ein Durchbruch in der fermentativen Herstellung von Zitronensäure wurde erst zwischen 1916 und 1920 erreicht, als anstelle eines *Penicillium spp.* *Aspergillus niger* als mikrobieller Produzent entdeckt wurde. Er wächst unterhalb pH 3,5 und kann Zitronensäure in wenigen Tagen mit sehr hohen Säurekonzentrationen produzieren. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes gibt es auch weniger Probleme mit Kontaminationen. Die industriellen Fermentationen wurden zuerst 1919 in Belgien und 1927 in England aufgenommen. Als Substrate wurden zuckerhaltige Stoffe eingesetzt. Im Jahr 1981 lag die Weltproduktion bei etwa 300.000 t pro Jahr, 1997 wurden schon 700.000 t hergestellt. Auch heute wird als Produktionsstamm *A. niger* verwendet, wobei auch andere Stämme wie *Candida spp.* getestet wurden, die zwar auch andere Substrate wie n-Alkane zur Herstellung von Zitronensäure nutzen konnten, aber auch Nebenprodukte wie Isozitronensäure bildeten. Die Herstellung erfolgt vereinfacht über die im Folgenden dargestellte Reaktion.



Oxalacetat kommt zum einen aus dem Zitronensäurezyklus selbst und wird zum anderen aus Pyruvat gebildet, an das Pyruvatcarboxylase CO_2 addiert und dem Zitronensäurezyklus zuführt (Schmid, 2002).

Die Entdeckung von Antibiotika zur Behandlung von bakteriellen Infektionen brachte einen großen Fortschritt in der medizinischen Versorgung von Krankheiten. Das erste Antibiotikum, das als Therapeutikum eingesetzt wurde, war Penicillin, das 1928 durch A. Fleming entdeckt aber erst 1939 von H. Florey isoliert wurde. Der Produktionsstamm wurde *Penicillium chrysogenum* genannt. Die erste großtechnische Produktion von Penicillin G (Benzylpenicillin) fand 1943 statt. Bis 1951 wurde das erste modi-

fizierte Penicillin entwickelt, das säurestabil ist und damit auch oral verabreicht werden konnte – Penicillin V, das Phenoxymethylpenicillin. 1947 wurde von S. Waksman das Antibiotikum Streptomycin in *Streptomyces griseus* gefunden, das auch gegen gramnegative Bakterien wirksam war. Bis dato wurden eine Vielzahl weiterer natürlicher Antibiotika gefunden, die von Mikroorganismen produziert werden und für Mikroorganismen aber zum Teil auch für den Menschen toxisch sind. Zur Zeit erfolgt die industrielle Herstellung von etwa 200 Antibiotika, von denen die meisten halbsynthetisch sind und deren natürliche Grundstruktur biologisch oder chemisch variiert wird. Sie beeinflussen verschiedene Positionen im Stoffwechsel oder den Zellkörper direkt:

- Inhibierung oder Schädigung der Zellwand oder Zellwandsynthese (β -Lactam-Antibiotika: z.B. Penicilline, Cephalosporine, Vancomycin, Cycloserin)
- Inhibierung der Synthese oder des Stoffwechsels von Nukleinsäuren (z. B. Quinolone, Rifampicin)
- Inhibierung der Synthese oder Schädigung der Zytoplasmamembran (z. B. Polymyxine)
- Hemmung der Zellteilung durch Hemmung des C1-Stoffwechsels (z. B. Sulfonamide, Trimethoprim)
- Inhibierung der Proteinbiosynthese (z. B. Aminoglycoside, Tetracycline, Chloramphenicol, Erythromycin, Spectinomycin).

Als ausgewähltes Beispiel für die industrielle Herstellung von Antibiotika soll die Herstellung von Penicillinen und deren Derivaten gezeigt werden. Die Produktion erfolgt mittels Fermentation des Pilzes *P. chrysogenum*, der während der stationären Phase in Abhängigkeit des Produktionsstammes Penicillin G oder Penicillin V bildet und ausscheidet. Nach der Abtrennung der Biomasse wird die Substratlösung mit organischem Lösungsmittel versetzt und Penicillin nach mehreren Reinigungs- und Fällungsstufen als Kaliumrohsalz gewonnen. Ausgehend davon sind mehrere Schritte zur gezielten Produktsynthese möglich. Durch Spaltung des Penicillins mit einer spezifischen immobilisierten Acylase (Penicillin G-Acylase, z. B. aus *Kluyvera citrophila*) werden 6-Aminopenicillansäure und Phenyllessigsäure unter alkalischen Bedingungen hergestellt. 6-Aminopenicillansäure wird z. B. weiter zu Ampicillin (siehe Abbildung 1) oder Amoxicillin derivatisiert. Dieser Schritt wird von Acylase aus *Pseudomonas melanogenum* unter sauren Bedingungen (pH 5,5) und bei Bereitstellung von D,L-Phenylglycinmethylester katalysiert, die spezifisch für dieses Substrat ist, aber Penicillin G nicht spaltet. Penicillinacylase kann ebenfalls natürliche Cephalosporine spalten, was zur Bildung von 7-Aminodeacetylcephalosporinsäure führt, deren Derivate beispielsweise Cephalixin oder Cefadroxil sind.

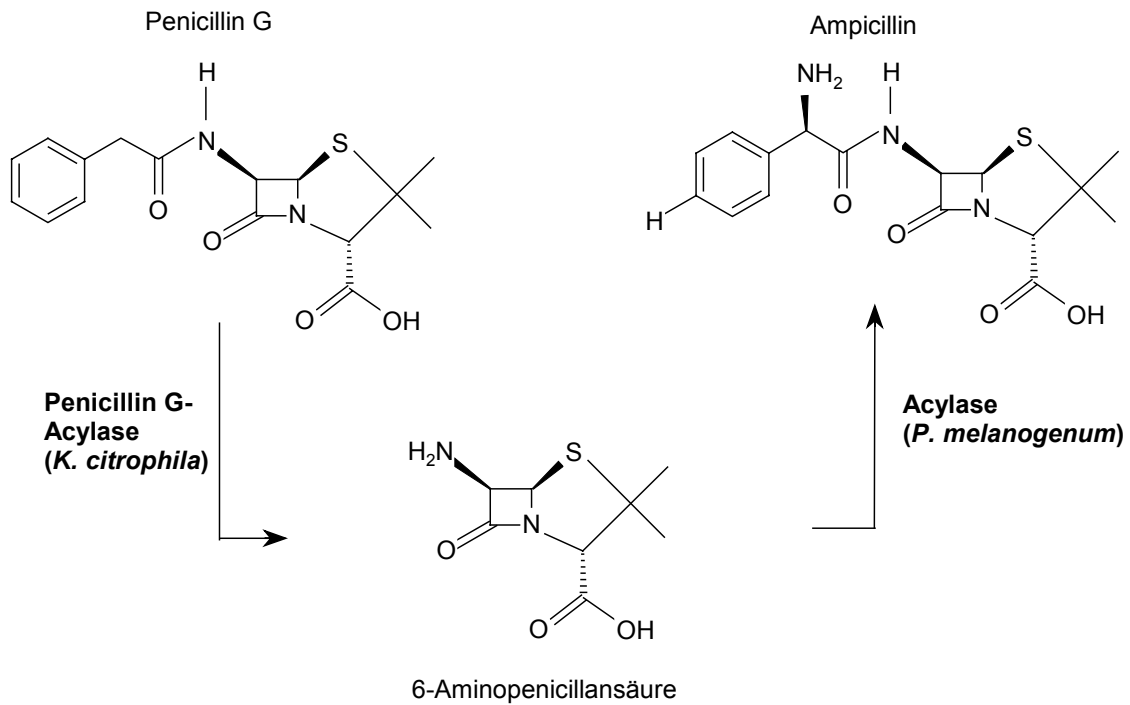


Abbildung 1: Ampicillinsynthese aus Penicillin G.

Die industrielle Herstellung von Lipiden ist von wirtschaftlich großer Bedeutung und umfasst jährlich mehrere 100 Millionen US-Dollar. Eine besondere Stellung nehmen dabei die Steroide und Sterole ein, da sie bedeutende Grundlagen für Hormone oder Verdauungsenzyme darstellen. Sie umfassen speziell Lipide mit 18, 19, 21 und 24 C-Atomen. Eine typische Sterol-Struktur ist in Abbildung 2 mit Nummerierung der einzelnen C-Atome gezeigt, an denen Hydroxylierungsreaktionen für die Herstellung weiterer Synthesestufen durchgeführt werden können.

Steroide und Steroidhormone haben einen großen therapeutischen Nutzen, der durch die verschiedenen biologischen Eigenschaften der Strukturvarianten noch verstärkt wird. Neben Steroiden zur Erhöhung bestimmter Stoffwechselfunktionen gibt es auch solche, die eine Verringerung der Immunantwort bewirken. Beispiele für Sterole sind Ergosterol und β -Sitosterol, für Steroidhormone Progesteron, Cortisol und für Steroide Testosteron und Estradiol. Letztere spielen in Fruchtbarkeits- und Verhütungsmitteln eine wichtige Rolle.

Im Gegensatz zu Sterolen kommen Steroide nicht in großen Mengen in der Natur vor, sondern werden von Organismen nur in geringen, dem Bedarf entsprechenden Mengen produziert. Allerdings ist der pharmazeutische Bedarf an Steroiden wesentlich höher. Es gibt fünf Möglichkeiten, um Steroide herzustellen, von denen vier aufgrund der geringen Ausbeute nicht geeignet sind (Tabelle 3). Hier kann gezeigt werden, dass die enzymatische Synthese am besten für die Herstellung von Steroiden aus Sterolen geeignet ist. Die enzymatische Modifikation der Sterole erfolgt

selektiv. Als erstes wird dazu die lange Seitenkette der Sterole an Position 17 (siehe Abbildung 2) abgebaut, was durch Mikroorganismen wie *Pseudomonas* sp., *Nocardia* sp. oder *Corynebacterium* sp. katalysiert wird, die diese Sterole als C-Quelle nutzen können. Allerdings wird außer der Seitenkette simultan auch die Ringstruktur mit abgebaut, sodass die Steroidherstellung durch Mutanten erfolgen muss oder modifizierte Ringstrukturen verwendet werden, die beispielsweise eine Hydroxylierung am C19-Atom besitzen und dazu führen, dass der weitere enzymatische Ringabbau unterbrochen wird. Auch der Einsatz bestimmter Enzyminhibitoren verhindert den Abbau der Ringstruktur: beispielsweise Chelatbildner oder Metallionen zur Substituierung von Fe^{2+} . Die Zugabe der Inhibitoren erfolgt in der stationären Wachstumsphase der Zellen zuerst und anschließend die Sterolzugabe. Als gentechnisch veränderter Produktionsstamm wird am häufigsten *Mycobacterium fortuitum* eingesetzt, der als Wildtypstamm viele Sterole abbauen kann. Bei verschiedenen Mutanten ist die Enzymkaskade für den Abbau an unterschiedlichen Stellen blockiert, sodass eine Vielzahl von Produkten hergestellt werden kann.

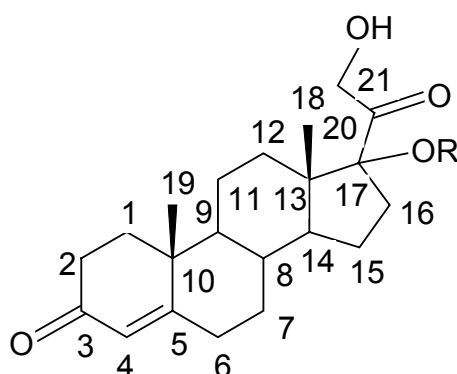


Abbildung 2: Typische Sterol-Struktur. R = variable Seitenkette.

Tabelle 3: Steroidherstellung – Möglichkeiten.

Art der Herstellung	Bemerkung
Extraktion aus Tieren	zu geringe Vorkommen (z. B. Vitamin D, Corticosteroide)
chemische Synthese	aufgrund vieler chiraler C-Atome würde das richtige Produkt nur einen geringen Anteil ausmachen
partielle chemische Synthese aus einer natürlichen Vorstufe	ebenfalls geringe Stereospezifität, nur begrenzt einsetzbar
Biosynthese	hohe Kosten für Fermentation, geringe Ausbeute
enzymatische Synthese aus einer natürlichen Vorstufe	durch Enzymspezifität sind Stereo- und Regioselektivität garantiert

Die Umwandlung von Sterolen zu Steroiden kann durch eine Vielzahl chemischer Reaktionen ablaufen (Oxidationen → z. B. Epoxidation, Alkoholoxidation; Reduktionen → z. B. Kettoreduktion, Sättigung, Isomerierung; Hydrolysen → z. B. Esterhydrolysen, Lactonhydrolysen; Konjugationen → z. B. Acylierungen). Die industriell wichtigsten sind nachfolgend zusammengefasst:

- Seitenkettenabbau von β -Sitosterol zu Androsta-4-en-3,17-dion und Androsta-1,4-dien-3,17-dion (Ausgangsstoffe für Östrogene und Gestagene und Corticosteroide, wobei für letzteres ein Seitenkettenaufbau am C17-Atom erfolgt)
- 11 β -Hydroxylierung von Cortexolon, das eine Synthesestufe von Hydrocortison ist, durch *Curvularia lunata*
- 11 α -Hydroxylierung von Progesteron zur Herstellung von 11 α -Hydroxyprogesteron mit *Rhizopus nigricans*
- 16 α -Hydroxylierung von Androsta-4-en-3,17-dion zur Herstellung von Fluocinolon mit *Streptomyces rosechromogenes* oder zellfreien Extrakten aus *A. niger* oder *Bacillus megaterium*

Neben den genannten Hydroxylierungen können an allen C-Atomen durch verschiedene Enzyme spezifisch α - oder β -Hydroxylierungen durchgeführt werden (Beispiele in Leach und Cartledge, 1997 - Biotransformation von Lipiden). Auf die Herstellung weiterer Lipide wie Fettsäuren und Fettsäurederivate (Lebensmittel- und Kosmetikindustrie), Terpenoide (L-Menthol, α -Terpineol) und Prostaglandine soll aufgrund des großen Umfangs an Literatur nicht weiter eingegangen werden.

2.1.3.2 Bedeutung der Enantiomerenreinheit

Aufgrund der Bedeutung von enantiomerenreinen Komponenten soll hier kurz auf die Notwendigkeit chiral identischer Verbindungen eingegangen werden. Enantiomere oder Stereoisomere sind Substanzen, die über eine gleiche Summenformel verfügen, aber sich in ihrer Struktur wie Bild und Spiegelbild zueinander verhalten und völlig andere biologische Eigenschaften haben können.

Enzyme synthetisieren im Allgemeinen enantiomerenreine Komponenten, da meist nur ein Isomer eines Stoffes für den Stoffwechsel benötigt wird, um als Ausgangssubstrat für das nächste enantiomerenreine Produkt zu fungieren. Das zweite Enantiomer kann im Stoffwechsel inaktiv sein oder sogar toxisch wirken. Für Medikamente ist die Reinheit von Enantiomeren – also das Vorhandensein homochiraler Substanzen – besonders wichtig, da falsche Isomere ungewünschte oder toxische Nebenreaktionen auslösen können. Daher sollte die Herstellung racemischer Gemische, wenn möglich, vermieden werden. Beispiele für die unterschiedlichen Eigenschaften von Enantiomeren einer biochemischen Verbindung sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Beispiele für Eigenschaften verschiedener Enantiomere einer organischen Verbindung.

Organische Verbindung	D-Enantiomer	L-Enantiomer
Limonen	Zitronengeschmack	Orangengeschmack
Karvon	Kümmel	Pfefferminze
Sukrose	süß, wird verstoffwechselt	süß, wird nicht verstoffwechselt
Penicillamin	antiarthritisch	toxisch
Asparagin	bitter	süß

2.1.3.3 Herstellung enantiomerenreiner Substanzen mit chemischen Verfahren

Auch chemische Verfahren befassen sich aufgrund des enormen wirtschaftlichen Potentials zunehmend mit der Herstellung enantiomerenreiner Komponenten. Erste Untersuchungen dazu lieferte beispielsweise schon Lewis Pasteur, als er 1835 Chinin verwendete, um racemische Säuren zu trennen. Chinin wurde ebenfalls verwendet, um Cyanhydrin aus Benzaldehyd zu katalysieren (um 1910). Nach Mander (1998) wird die chemische enantioselektive Synthese von optisch aktiven Verbindungen in zwei Gruppen geteilt:

- enantioselektive Synthese mit chiralen nichtracemischen Reagenzien
- enantioselektive Reaktionen mit chiralen nichtracemischen Katalysatoren.

Zur ersten Gruppe zählt zum Beispiel die Hydroborierung von Terpenen mit chiralen Boranen (Diboran, Boran-Dimethylsulfid), wobei hier *e.e.*-Werte (enantiomeric excess - Enantiomerenüberschuss) von bis zu 99 % in Abhängigkeit der Qualität des Borans erreicht werden können. Wichtige Produkte dieser Reaktionen sind beispielsweise Isopinocampheylboran und Dilongifolylboran. In die erste Gruppe zählen nach Mander (1998) auch die enantioselektive Reduktion von Ketonen durch Hydridübertragung. Hier wird als Katalysator z. B. BINAL-H (Binaphtyl-Derivat) eingesetzt, mit dem Enantiomerenüberschüsse zwischen 95 % bis 100 % bei einer Vielzahl von Ketonen zu ihren komplementären Alkoholen erzielt wurden. Xu et al. (2002) beschreiben die Herstellung enantiomerenreiner sekundärer Alkohole durch asymmetrische Reduktion von prochiralen Ketonen durch Boran. Als Katalysatoren werden Oxazaborolidine verwendet, die wie Enzyme das Keton und ein Hydrid binden und nach der Reaktion wieder freigeben. Es konnten 1-(4-Alkylphenyl)- und 1-(4-Alkoxyphenyl)-Alkohole durch Katalyse mit einem Oxazaborolidin-Derivat und Boran hergestellt werden (z. B. (*R*)-1-(4-Ethylphenyl)ethanol und (*R*)-1-(4-Pentoxyphenyl)-*n*-propanol). Die *e.e.*-Werte erreichten in Abhängigkeit der Katalysatormenge 69 % -

98 % bei Reaktionstemperaturen zwischen 0 °C und 5 °C. In die zweite Gruppe zählen die enantioselektive Epoxidierung von Allylalkoholen durch chirale Übergangsmetallkomplexe, enantioselektive Hydrierungen von Acrylsäurederivaten und Allylalkoholen durch Metallkomplexe, Cyclopropanierungen und die Katalyse durch chirale Basen und Lewis-Säuren. Die Bildung eines hohen Enantiomerenüberschusses von > 95 % wird dabei nur in bestimmten Fällen erreicht. Entscheidend sind dabei der optimale Katalysator, das Substrat selbst, die Zusammensetzung der Reaktionslösung und in vielen Fällen die Reaktionstemperatur, die mit bis zu -120 °C eine hohe Kühlleistung erfordert.

Noyori und Ohkuma (1999) beschreiben die stereoselektive Herstellung von Alkoholen aus ihren komplementären Ketoverbindungen, die neben einer C=O-Bindung auch C=C-Doppelbindungen aufweisen. Die Reaktionen laufen dabei in Isopropanol, das mit einer anorganischen Base (z. B. KOH) versetzt ist, ab. Als Katalysatoren werden $\text{RuCl}_2(\text{Phosphin})_2(1,2\text{-Diamin})$ -Komplexe verwendet. Die Selektivität der Reaktionen ist abhängig von molekularen und sterischen Eigenschaften der Liganden von Ru (Ruthenium) und den Reaktionsbedingungen. C=O-Bindungen werden bei koexistierenden C=C-Doppelbindungen bei Anwesenheit von 1,2-Diamin und der anorganischen Base bevorzugt gesättigt mit einem Verhältnis von 375.000 : 1. Beispielsweise konnten so Alkohole z. B. aus 1-Phenylethyl-Ketonen oder Alkenylketonen in hohen Ausbeuten (bis zu 100 %) und e.e.-Werten (80 % - 99 %) unter hohen Drücken (bis zu 8 MPa) hergestellt werden. Als nichtchiraler Alkohol wurde Cyclohexanol aus Cyclohexanon hergestellt. Die Reaktionsbedingungen waren dafür 60 °C, 2 h Reaktionszeit, 1 MPa und ein Überschuss von Cyclohexanon zum $\text{RuCl}_2(\text{Phosphin})_2(1,2\text{-Diamin})$ -Komplex von 100.000 : 1.

Herzon und Myers (2005) beschreiben die enantioselektive Synthese von Stephacidin B, einer für humane Tumorzellen wachstumshemmenden Verbindung, die aus Pilzen isoliert wurde. Stephacidin B ist ein Dimer aus Abrainvillamid, das von Heron und Myers (2005) in einem 11-stufigen Prozess aus einem Cyclohexanon-Derivat synthetisiert werden konnte (Ausbeuten zwischen den einzelnen Schritten zwischen 56 % und 98 %). Bei 23 °C erfolgte unter Vorhandensein von 22 mM Triethylamin und Acetonitril als Lösungsmittel die Dimerisierung zu Stephacidin B (95 % Ausbeute). Die Gesamtausbeute im beschriebenen Prozess liegt aufgrund der vielen Prozessstufen und sehr unterschiedlichen Ausbeuten allerdings nur bei 4 %.

2.1.3.4 Herstellung von Aminosäuren mit Mikroorganismen und Aminosäuredehydrogenasen

Aminosäuren spielen eine wichtige Rolle in der Stoffwechselphysiologie eines jeden Lebewesens, in der Biochemie und seit einigen Jahrzehnten auch in der industriellen Produktion (Leuchtenberger et al., 2005). Aus dem zellulären Metabolismus sind

Aminosäuredehydrogenasen bekannt, die für Herstellung oder Abbau der intrazellulären proteinogenen Aminosäuren zuständig sind. Dazu gehören beispielsweise L-Glutamat-Dehydrogenase (aus verschiedenen Bakterien, Pilzen, Hefen, Pflanzen und Tieren), L-Phenylalanin-Dehydrogenase (aus *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus*), Glutamin-Synthetase und L-Leucin-Dehydrogenase (aus *Bacillus*, *Clostridium*). Es wurden viele chemische und mikrobielle Prozesse entwickelt, in denen essentielle Aminosäuren hergestellt werden, die über die Nahrung aufgenommen werden müssen, weil sie vom Organismus selbst nicht synthetisiert werden wie L-Methionin, L-Phenylalanin oder L-Tryptophan. Einige Aminosäuren werden auch als Futtermitteladditive eingesetzt: D,L-Methionin, L-Lysin und L-Threonin. L-Glutamat wird als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie und L-Asparaginsäure (bzw. das daraus synthetisierte Dipeptid Aspartam) als Süßstoff eingesetzt. Proteinogene Aminosäuren finden auch Anwendung in der pharmazeutischen und Kosmetikindustrie als Bestandteil chiral aktiver Verbindungen. Für die Synthese von Proteinen werden ausschließlich L-Aminosäuren verwendet. Nichtproteinbildende D-Aminosäuren kommen in Naturstoffen vor und dienen als chirale Ausgangsstoffe in der Synthesechemie beispielsweise von halbsynthetischen Antibiotika. Die beiden D-Enantiomere von Alanin und Glutamat sind wichtige Bestandteile der bakteriellen Zellwand und werden aus ihren L-Enantiomeren durch Transaminierung oder Racemisierung gebildet (Ingeldew und Poole, 1984). Aminosäuren besitzen als spezielle organische Säuren eine Aminogruppe (NH_2 -), die meist am C_α -Atom positioniert ist, und eine Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$). Sie sind Ampholyte und können in Abhängigkeit des pH-Wertes und ihres isoelektrischen Punktes als Anion, Zwitterion oder Kation vorliegen. Bisher wurden über 100 Aminosäuren entdeckt. Nur 20 (21 mit Selenocystein) sind proteinogene Aminosäuren, also in die Struktur von Proteinen integriert. Die restlichen Aminosäuren sind Intermediate oder Bestandteile von Hormonen, Antibiotika oder anderen Sekundärmetaboliten. Für die Herstellung von Aminosäuren werden vier Verfahren aufgeführt (Schmid, 2002 und van Balken et al., 1997):

- chemische Synthese
- Extraktion aus natürlichen Materialien
- mikrobielle Herstellung mittels Fermentation
- Umwandlung chemischer Vorstufen im Enzym- oder Zellreaktor.

Zu den Aminosäuren, die durch Extraktion gewonnen werden, gehören L-Cystein, L-Cystin, L-Leucin, L-Asparagin, L-Arginin, L-Isoleucin und L-Tyrosin. Die Gewinnung erfolgt aus Pflanzenproteinen oder Schlachtabfällen durch saure Hydrolyse. Die Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Leucin werden anschließend durch Fällung und Alkoholextraktion isoliert. Die Reinigung der hydrophilen Aminosäuren erfolgt über Ionenaustauscher getrennt nach basischen, neutralen und sauren Aminosäuren und

anschließende Kristallisation. Durch chemische Synthese erfolgt die Bildung racemischer Gemische, das heißt, es werden beide Stereoisomere einer Aminosäure gebildet. Der Nachteil der chemischen Synthesen besteht nicht bei Enzym- oder Zellreaktoren. Hier wird ein chirales Zentrum am C α -Atom gebildet und nur ein Enantiomer nachfolgend produziert.

Die Herstellung von Aminosäuren mittels Fermentation wird mit Mikroorganismen durchgeführt, die Aminosäuren im Kulturmedium anreichern können. Im Stoffwechsel unterliegt die Aminosäuresynthese strengen Regulationen, sodass in der Zelle nur geringe Konzentrationen von Aminosäuren vorliegen. Eine Überproduktion der gewünschten Aminosäure kann erreicht werden durch optimierte Substrataufnahme, Unterbinden von Nebenreaktionen, Aufheben der Feedback-Regulation am ersten Enzym des Stoffwechselweges oder an Verzweigungsstellen, Stimulation der betreffenden Enzyme, Verhinderung der weiteren Verstoffwechslung und Stimulation der Sekretion der gewünschten Aminosäure. Am meisten dafür geeignet sind Mutanten von Produktionsstämmen, mit denen z. B. L-Aspartat, L-Glutaminsäure oder L-Lysin hergestellt werden. Die Mutanten sind meist auxotroph und selbst nicht mehr in der Lage, einige Stoffwechselprodukte herzustellen, die dann dem Nährmedium zugegeben werden müssen.

Die meisten natürlichen Aminosäuren werden durch Transaminierung (Übertragung der Aminogruppe) gebildet. Als Rezeptoren dienen im Intermediärstoffwechsel des Hexoseabbaus und Citratzyklus gebildete Verbindungen. Für industrielle Anwendungen sind neben den natürlichen L-Aminosäuren auch deren D-Enantiomere, sekundäre und tertiäre Aminosäuren mit einer großen strukturellen Vielfalt interessant. Unter diesem Blickpunkt sind die Aminosäuredehydrogenasen von Interesse, die neben ihren natürlichen Substraten auch artifizielle oder substituierte Substrate enantioselektiv durch reduktive Aminierung umsetzen (Bommarius, 1995, Hummel, 1999). Mittels enzymatischer Produktion können optisch reine D- und L-Aminosäuren aus racemischen Gemischen oder durch die reduktive Aminierung von α -Ketosäuren hergestellt werden. Das Enantiomer, das beim Einsatz racemischer Gemische nicht in eine Aminosäure transformiert wird, wird durch thermische oder pH-Änderung wieder in ein Racemat umgewandelt und erneut für die Aminosäureherstellung eingesetzt. Die dazu verwendeten Enzyme, ihre katalytischen Eigenschaften und beispielhafte Reaktionen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die Herstellung der Aminosäuren mit Enzymen kann dazu in drei Gruppen unterteilt werden (Leuchtenberger et al., 2005):

- enzymatische Produktion von proteinogenen (L-)Aminosäuren
- enzymatische Produktion von nichtproteinogenen (D-)Aminosäuren und
- enzymatische Produktion von Aminosäurederivaten.

Als Beispiel für die enzymatische Produktion von L-Aminosäuren soll die des L-Methionins genannt werden. Diese wird in Enzymmembranreaktoren mit Acylase aus *Aspergillus oryzae* durchgeführt. Auch L-Aspartat wird in Enzymmembranreaktoren durch Addition von Ammoniak an Fumarsäure durch das Enzym Aspartase hergestellt. Für die enzymatische Herstellung von D-Aminosäuren und nichtproteinogenen L-Aminosäuren werden, wie bereits erwähnt, als Ausgangsstoffe meist racemische Gemische eingesetzt. Die Reaktionen können mit D- oder L-spezifischen Acylasen (z. B. Produktion von Benzyloxycarbonyl-D-Prolin), mit einem System aus D- oder L-spezifischen Hydantoinasen und D- oder L-spezifischen Carbamoylasen (Herstellung von D- oder L-Aminosäuren; z. B. May et al., 2000), mit Amidasen oder kofaktorabhängigen Aminosäuredehydrogenasen (z. B. Herstellung von L-*tert*-Leucin) durchgeführt werden.

Tabelle 5: Enzyme zur Herstellung von Aminosäuren

Enzym	Syntheseweg	Beispiel
Amidase	Hydrolyse von D,L-Aminosäureamiden (Racematspaltung)	Amidase aus <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633 katalysiert Herstellung von L-Aminosäuren
Nitrilase	Biotransformation von α -Aminonitrilen	Herstellung von α -Aminosäuren aus Nitrilen direkt oder über Amidbildung
Hydantoinase/ Carbamoylase	Spaltung von racemischen Hydantoinen zu N-carbamoylierten Aminosäuren	Herstellung von L- oder D-Aminosäuren (gekoppelte Reaktion mit Carbamoylase), z. B. D-Hydantoinase aus <i>Bacillus brevis</i>
Aminoacylase	Hydrolyse racemischer N-Acylamino-säuren zu L-Aminosäuren	Acylase aus <i>Aspergillus oryzae</i> , Herstellung von L-Methionin, L-Valin, L-Phenylalanin durch Racematspaltung
Esterase	Hydrolyse (Racematspaltung) von D,L-Aminosäuremethyl- und -benzylestern	Serinprotease (Chymotrypsin) zur Herstellung von L-Aminosäuren und D-Aminosäureestern
Transaminase	Übertragung der Aminogruppe von einer Aminosäure auf eine α -Ketosäure	Aspartat-Aminotranferase (Übertragung des Ammoniumions von Aspartat auf α -Ketoglutarat)
Aminosäuredehydrogenase	Übertragung von Ammoniak auf eine α -Ketosäure	Leucindehydrogenase (LDH) aus <i>B. cereus</i> zur Herstellung von L-Leucin

Weitere technisch wichtige Enzyme sind Ammonialyasen und Aminotransferasen/Transaminasen. Ammonialyase aus *Rhodococcus glutinis* führt beispielsweise die Katalyse von L-Phenylalanin aus *trans*-Zimtsäure durch (siehe Abbildung 3). L-Aspartat- β -Decarboxylase aus *Xanthomonas oryzae* 531 katalysiert die Reaktion von L-Aspartat zu L-Alanin. Die Herstellung von L-Aminosäuren aus α -Ketosäuren mit freien Enzymen und Kofaktorregenerierung wird am Beispiel von L-*tert*-Leucin und L-Phenylalanin beschrieben (Bommarius et al., 1994).

Im Gegensatz zu Alkoholdehydrogenasegenen (siehe Kapitel 2.1.4) wurden nur wenige neue Aminosäuredehydrogenasegene publiziert. Dazu gehören das Gen einer aromatischen Amindehydrogenase aus *Alcaligenes xylosoxydans* (Kondo et al., 2004), *ldh* aus *B. cereus* (Stoyan et al., 1997) sowie das Gen für Serindehydrogenase aus *Agrobacterium tumefaciens* (Fujisawa et al., 2002).

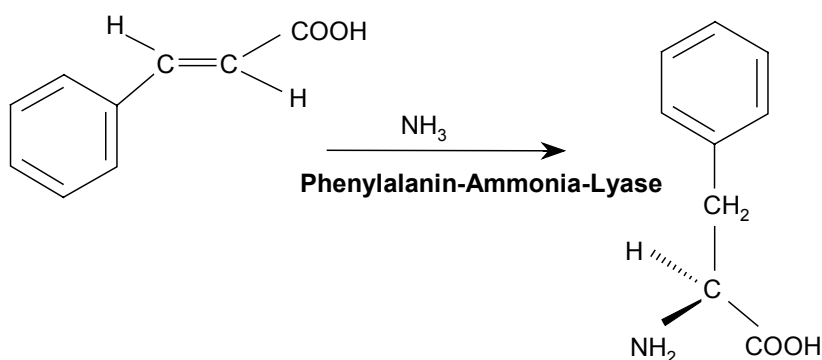


Abbildung 3: Herstellung von Phenylalanin mit Ammonialyase von *R. glutinis*.

2.1.4 Alkoholdehydrogenasen für Biotransformationen

Neben den bereits im industriellen Maßstab durchgeführten Biotransformationen von organischen Säuren nimmt die Herstellung sekundärer Alkohole mittels Biokatalysatoren als Bestandteile chiraler Komponenten von Pharmazeutika eine interessante Rolle als Alternative zur chemischen Synthese ein. Enzyme, die in der Lage sind, aus Ketonen sekundäre chirale Alkohole herzustellen, sind z. B. Alkoholdehydrogenasen (ADHs). ADHs gehören als Untergruppe der Dehydrogenasen zur Klasse der Oxidoreduktasen bzw. Ketoreduktasen und sind aufgrund der Fähigkeit einiger ihrer Vertreter, prochirale Carbonylverbindungen stereospezifisch zu reduzieren, wichtige Biokatalysatoren (Abokitse und Hummel 2003). ADHs können von den Kofaktoren NADH, NADPH oder Pyrrolo-Quinolin-Quinon (PQQ) abhängig sein, sowie über Metallatome wie Zink oder Eisen verfügen. Differenzierungen von ADHs erfolgen in kurzkettig, mittelkettig und langkettig, wobei die kurzkettigen auch als insektentyp-

sche ADHs bezeichnet werden. Mittel- und langkettige ADHs werden zudem noch aufgrund ihrer Abhängigkeit von Zink, Eisen oder anderen Metallen differenziert. In Tabelle 6 sind einige ausgewählte ADHs nach ihrer Kofaktornutzung aufgeführt.

Tabelle 6: Beispiele für Alkoholdehydrogenasen.

Alkoholdehydrogenase-Gen	(Mikro)Organismus	Referenz
NAD(H)-abhängige Alkoholdehydrogenasen		
<i>adhRE</i>	<i>R. erythropolis</i> DSM 43297	Abokitse und Hummel, 2003
<i>adhAP</i>	<i>A. paraffineus</i>	nicht publiziert
<i>adhE</i>	<i>E. coli</i>	Membrillo-Hernandez und Lin, 1999 und Holland-Staley et al., 2000
<i>adhF1</i>	<i>P. fluorescens</i> DSM 50106	Hildebrandt et al., 2002 und Poessl et al., 2004
<i>m-adh</i>	<i>Moraxella</i> sp. TAE123	Tsigos et al., 1998
<i>hl-adh</i>	Pferdeleber	z. B. Bradshaw et al., 1992
<i>yadh</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	z. B. Winer, 1958
NADP(H)-abhängige Alkoholdehydrogenasen		
<i>adh1</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	van der Oost et al., 2001
<i>tb-adh</i>	<i>Thermoanaerobium brockii</i>	z. B. Keinan et al., 1986
<i>lk-adh</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	Weckbecker und Hummel, 2004
PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenasen		
<i>tfaA</i>	<i>Ralstonia</i> sp.	Zarnt et al., 2001
<i>pbdA</i>	<i>P. putida</i>	Toyama et al., 2003
<i>adhAB</i>	<i>Acetobacter</i>	Kondo et al., 2003
<i>gbsA</i>	<i>Gluconobacter</i>	Matsushita et al., 1995

Von NADPH-abhängigen ADHs sind bis dato wenig Beispiele bekannt. Die bisher beschriebenen ADHs kommen vor allem aus extremophilen Bakterien wie *Pyrococcus furiosus*, *Hyperthermus butylicus* und *Thermococcus* spp. Die NADPH-abhängige ADH aus *Lactobacillus kefir* wurde ebenfalls bereits in Zusammenhang mit Ganzzellkatalysatoren beschrieben (Weckbecker und Hummel, 2004). NADPH-abhängige ADHs aus *Thermoanaerobium brockii* sowie aus *L. kefir* sind bereits kommerziell erhältlich, von den NADH-abhängigen diejenigen aus Hefe, Pferdeleber und *R. erythropolis* DSM 42397. PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenasen spielen vor allem in der Atmungskette und beim Abbau aromatischer und gesättigter Hetero-

zyklen eine Rolle. Zum Beispiel wird der Abbau von Tetrahydrofurfurylalkohol durch eine PQQ-abhängige ADH aus *Ralstonia* sp. eingeleitet (Zarnt et al., 2001) und der Alkohol durch diese bis zur Carbonsäure oxidiert. Weitere PQQ-abhängige ADHs wurden in *P. putida*, *Acetobacter* und *Gluconobacter* gefunden und sind meist an der Außenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert (Toyama et al., 2003; Kondo et al., 2003; Matsushita et al., 1995).

Die ADHs aus *R. erythropolis* DSM 43297 und *A. paraffineus* (taxonomisches Synonym von *R. erythropolis* DSM 312) werden in die Gruppe der zinkabhängigen mittelkettigen ADHs eingeordnet, da sie über ein Zinkatom je Untereinheit bzw. aktives Zentrum verfügen. Sie werden beide als rekombinant in *E. coli* gebildete Enzyme in dieser Arbeit in Ganzzellkatalysatoren zur stereospezifischen Reduktion von Ketoverbindungen verwendet. Beide Enzyme sind S-spezifisch orientiert und katalysieren die Umsetzung eines breiten Spektrums von aliphatischen und aromatischen Ketonen zu den korrespondierenden sekundären Alkoholen, womit sie als Modellenzyme für diese Arbeit eine wichtige Grundlage stellen. Beide ADHs besitzen auf Proteinebene eine 98 %-ige und auf DNA-Ebene eine 94 %-ige Identität und haben ebenfalls hohe Homologie zu verschiedenen zinkabhängigen ADHs.

Untersuchungen mit ADHF1 aus *P. fluorescens* DSM 50106 wurden von Hildebrandt et al. (2002) und Riermeier et al. (2002) veröffentlicht. Identitäten von 29 % und 32 % der Aminosäuresequenz wurden zu einer C α -Dehydrogenase aus *Pseudomonas paucimobilis* bzw. der NADPH-abhängigen AdhA aus *P. furiosus* aufgezeigt. ADHF1 sollte als Positivkontrolle sowohl bezüglich der Expression als auch in den Aktivitäten bei der Suche nach neuen ADHs in *S. coelicolor* A3(2) dienen. Das Gen befindet sich in einem Operon, das außer *adhF1* eine gut charakterisierte Esterase (*estF1*), ein zu einer Cyclohexanonmonooxygenase homologes (*orf3*) und ein zu einer Alkanhydroxylase homologes Enzym (*orf2*) codiert. Für ADHF1 wurde vermutet, dass das Enzym zyklische Alkohole zu deren korrespondierenden Ketonen umsetzt, bei denen dann weiter von der Cyclohexanonmonooxygenase in einer Bayer-Villiger-Oxidation ein Sauerstoffatom eingefügt wird. Die entstehenden Lactone werden anschließend durch Esterase EstF1 hydrolysiert. Trotz der von Hildebrandt et al. (2002) veröffentlichten Daten konnten deren Ergebnisse, das heißt, die Umsetzungen von zyklischen Ketoverbindungen wie Cyclohexanon zu den korrespondierenden sekundären Alkoholen nicht reproduziert werden, zumal sehr lange Reaktionszeiten aufgeführt wurden. Da die grundlegenden Untersuchungen zu ADHF1 sowie molekulargenetische Arbeiten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart erfolgten und Expressions- und Substratuntersuchungen an der Universität Greifswald liefen, wurden letztere aufgrund geringer Daten nochmals wiederholt.

Bei manchen ADHs wie von AdhA aus *P. furiosus* scheint auch die Stereoselektivität nicht spezifisch festgelegt. Wie von van der Oost et al. (2001) beschrieben, unter-

scheiden sich beispielsweise die spezifischen Aktivitäten hinsichtlich der *S*- und *R*-Stereoisomere von 2-Butanol um etwa 30 % (32 U/mg gegenüber 21,8 U/mg), wohingegen bei spezifischen *S*- oder *R*-ADHs ein Stereoisomer zu > 90 % bevorzugt wird. AdhA bevorzugt sekundäre Alkohole gegenüber den primären Varianten, die höchsten spezifischen Aktivitäten wurden mit ca. 42 U/mg für 2-Pentanol (Oxidationsreaktion) und Pyruvaldehyd (Reduktionsreaktion) angegeben. Für AdhA wird vermutet, dass das Enzym mit den ebenfalls im Operon codierten Proteinen AdhB, LamA und CelB eine Rolle im fermentativen Abbau von Kohlenwasserstoffen spielt.

2.1.5 Biotransformationen mit Enzymen und rekombinanten Mikroorganismen mit Kofaktorregenerierung

Biosynthesen wie die Herstellung von Zitronensäure oder verschiedenen Aminosäuren mit Mikroorganismen, die sich in der stationären Wachstumsphase befinden, laufen in der Regel ohne Zugabe von externem Kofaktor NAD(P)(H) ab (siehe Kapitel 2.1.3.1 und 2.1.3.4). Die Regenerierung des Kofaktors erfolgt im Organismus als Teil seines Stoffwechsels. Bei Biokatalysen mit Enzymen der Gruppe der Oxidoreduktasen und Oxygenasen, die Kofaktoren wie NAD(H) und NADP(H) benötigen, stellen die Kofaktoren einen merklichen Anteil bei den Prozesskosten dar, auch wenn sie nur in katalytischen Mengen eingesetzt werden müssen. Deshalb sind Verfahren geeignet, bei denen das genutzte Koenzym regeneriert wird. Dies kann über ein weiteres Enzym / Substrat-System, chemisch, elektrochemisch oder photochemisch erfolgen (Chenault und Whitesides, 1995). Am geeignetsten erscheint die Verwendung eines zweiten Enzyms mit gleicher Koenzymspezifität, das eine Reaktion in der entgegen dem Prozessenzym durchgeführten Reaktion vollzieht. Mit dieser Art der Kofaktorregenerierung wurden schon mehrere Verfahren entwickelt und beschrieben (z. B. Bommarius et al., 1994; Kaup et al., 2004; Galkin et al., 1997). Im Folgenden sollen aktuelle Untersuchungen zu Biotransformationen mit rekombinanten Enzymen bzw. rekombinanten Mikroorganismen vorgestellt werden, bei denen die Kofaktorregenerierung eine wichtige Rolle im Syntheseprozess erhält.

Untersuchungen mit aufgereinigten Enzymen zur reduktiven Aminierung mit Kofaktorregenerierung wurden zum Beispiel von Bommarius et al. (1994) und Bommarius et al. (1998) beschrieben. Bommarius et al. (1994) verwendeten für die Herstellung von *L*-*tert*-Leucin aus der komplementären α -Ketosäure Trimethylpyruvat Leucindehydrogenase (LDH) aus *Bacillus stearothermophilus* und Phenylalanindehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. Als kofaktorregenerierendes Enzym wurde Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* (FDH-CB) verwendet. Es konnte festgestellt werden, dass auch bei enzymatischen Katalysen Nebenprodukte auftreten, welche die Ausbeute des gewünschten Produkts verringern. In der zweiten Publikation wird ebenfalls die reduktive Aminierung mit Enzymen von Trimethylpyruvat und Substrat-

analoga mit dem LDH/FDH-System aufgeführt. Es werden als Aminosäuredehydrogenasen für derartige Prozesse auch Phenylalanindehydrogenase und Glutamatdehydrogenase aufgeführt.

Eine Alternative zu Biotransformationen mit aufgereinigten Enzymen sind Biotransformationen mit ganzen lebenden aber ruhenden Zellen. Ruhende Zellen haben aufgrund fehlender C-Quelle keinen aktiven Kohlenstoff-Stoffwechsel. Gegenüber enzymatischen Biokatalysen haben sie den Nachteil, dass unerwünschte Nebenreaktionen nicht ausgeschlossen werden können sowie auch Verunreinigungen durch Zellbestandteile bis hin zu Endotoxinen auftreten können, welche die Aufreinigung des Produktes komplizieren. Der Vorteil, dass die Herstellung der Biomasse kostengünstig ist gegenüber der Enzymaufreinigung, wird relativiert, da bei lebenden Zellen oft nur geringe Substratkonzentrationen eingesetzt werden können, damit die Zellen nicht absterben. Galkin et al. (1997) beschreiben die Herstellung optisch aktiver L- und D-Aminosäuren mit Kofaktorregenerierung durch ruhende rekombinante *E. coli*-Zellen, die über eine heterolog gebildete Amindehydrogenase und Formiatdehydrogenase verfügen. Als Amindehydrogenase wurde zum Beispiel eine Alanindehydrogenase aus *B. stearothermophilus* verwendet. Als Enzym zur Kofaktorregenerierung diente FDH aus *Mycobacterium vaccae* N10 (FDH-MV, Galkin et al. 1995). Mit diesen Kombinationen einer Amindehydrogenase und einer FDH konnten L-Leucin, L-Norleucin, L-Valin, L-Norvalin, L-Methionin, L- α -Aminobutyrat, L-Alanin, L-Phenylalanin und L-Tyrosin mit hohen Ausbeuten und hohen e.e.-Werten (über 92 %) aus den korrespondierenden α -Ketosäuren synthetisiert werden. Bei der Herstellung von D-Aminosäuren konnten hohe e.e.-Werte nicht bei allen Verbindungen erzielt werden. So wurde α -Aminobutyrat als racemische Mischung hergestellt, D-Norvalin wurde nur zu 35 % synthetisiert, ebenso gab es geringe Verunreinigungen durch die entsprechenden L-Isomere bei D-Valin, D-Methionin und D-Norleucin, wobei diese durch eine Alanindehydrogenase oder Alaninracemase verursacht wurden.

Wilberg et al. (1997) präsentieren einen Prozess zur Herstellung von Sorbitol und Gluconsäure mit permeabilisierten *Zymomonas mobilis*-Zellen. Die Permeabilisierung erfolgte mit Cetyltrimethylammoniumbromid. Der enzymatische Prozess wird durch zwei Enzyme von *Z. mobilis* katalysiert. Glucose-Fructose-Oxidoreduktase reduziert Fructose zu Sorbitol und oxidiert Glucose zu Gluconolacton. Zur Elektronenübertragung wird das Koenzym NADP(H) genutzt. Gluconolacton wird anschließend durch das zweite Enzym Gluconolactonase zur Gluconsäure hydrolysiert. Dadurch, dass der Kofaktor am Enzym gebunden ist, kann er weder durch die Permeabilisierung ins Reaktionsmedium übergehen, noch für Nebenreaktionen zur Verfügung stehen. Es konnten Umsatzraten von Glucose zu Gluconsäure von über 97 % erreicht werden bei einer Ausgangskonzentration von Glucose von 422,2 g/l, wobei ein Teil der Glu-

consäure offenbar weiter von intakten Zellen verstoffwechselt und damit die Ausbeute etwas reduziert wurde.

Ernst et al. (2004) setzten mit Hilfe ruhender rekombinanter *E. coli*-Zellen, die über Formiatdehydrogenase aus *M. vaccae* N10 und ADH aus *L. brevis* (ADH-LB) verfügen, prochirale Carbonylverbindungen zu chiralen Hydroxysäuren um. Mit den ruhenden Zellen wurden stereoselektiv 40 mM Methylacetoacetat zu (*R*)-3-Hydroxybutanoat umgesetzt. ADH-LB kann sowohl NADH als auch NADPH als Kofaktor nutzen, NADPH wird jedoch bevorzugt. Trotzdem wird durch die ausschließlich NAD⁺-abhängige FDH-MV die Kofaktorregenerierung ermöglicht, indem die Reaktion in einem Formiat-gepuffertem System stattfindet und durch Formiat das intrazelluläre [NADH]/[NAD⁺]-Verhältnis versiebenfacht wird. Somit wird die Bevorzugung des NADPH durch ADH-LB mit einer hohen NADH-Konzentration ausgeglichen. Im Gegensatz zu Ernst et al. (2004) beschreiben Weckbecker und Hummel (2004) einen Ganzzellkatalysator zur Synthese chiraler Alkohole mit drei koexprimierten Genen bzw. deren rekombinant gebildeten Genprodukten.

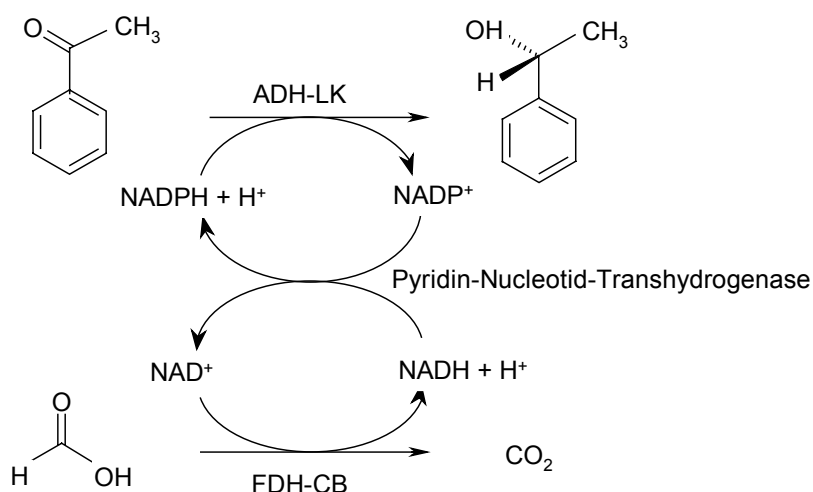


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Kofaktorregenerierung bei der Umsetzung von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol mit drei Enzymen und zwei Kofaktoren durch rekombinante *E. coli*-Zellen (nach Weckbecker und Hummel, 2004).

Die NADP(H)-abhängige ADH aus *L. kefir* (ADH-LK) reduziert prochirale Carbonylverbindungen zu chiralen Alkoholen, wobei NADPH zu NADP⁺ oxidiert wird. Die Regenerierung des Kofaktors NADPH wird durch Pyridin-Nucleotid-Transhydrogenase (PNT) aus *E. coli* vollzogen, die für die Übertragung von Reduktionsäquivalenten zwischen NAD⁺ und NADP⁺ verantwortlich ist. FDH-CB oxidiert Formiat zu CO₂ und stellt damit dem Enzym PNT das Substrat NADH für die Elektronenübertragung zur Verfügung. In Abbildung 4 ist das Schema für diese enzymati-

sche Reaktion dargestellt (nach Weckbecker und Hummel, 2004). Mit diesem Prinzip der Kofaktorregenerierung werden somit auch Biotransformationen mit Enzymen mit unterschiedlichen Kofaktoren möglich.

2.1.6 Arten der Kofaktorregenerierung und kofaktorregenerierende Enzyme

Für die Kofaktorregenerierung von NAD(P)H bei Redoxreaktionen sind vor allem Enzyme geeignet, deren Substrate und Produkte kostengünstig sind, leicht entfernbar sind, die eigentliche Produktsynthese nicht beeinträchtigen und im Vergleich zu chemischen, elektrochemischen oder photochemischen Kofaktorregenerierungen wesentlich effizienter sind. Für die Kofaktorregenerierung kommen drei Enzyme aufgrund ihrer Produkte besonders in Frage: FDHs, Malic Enzymes und Glucosedehydrogenasen (GDHs). Die Reaktionen, welche die genannten Enzyme katalysieren, sind in Abbildung 5 dargestellt.

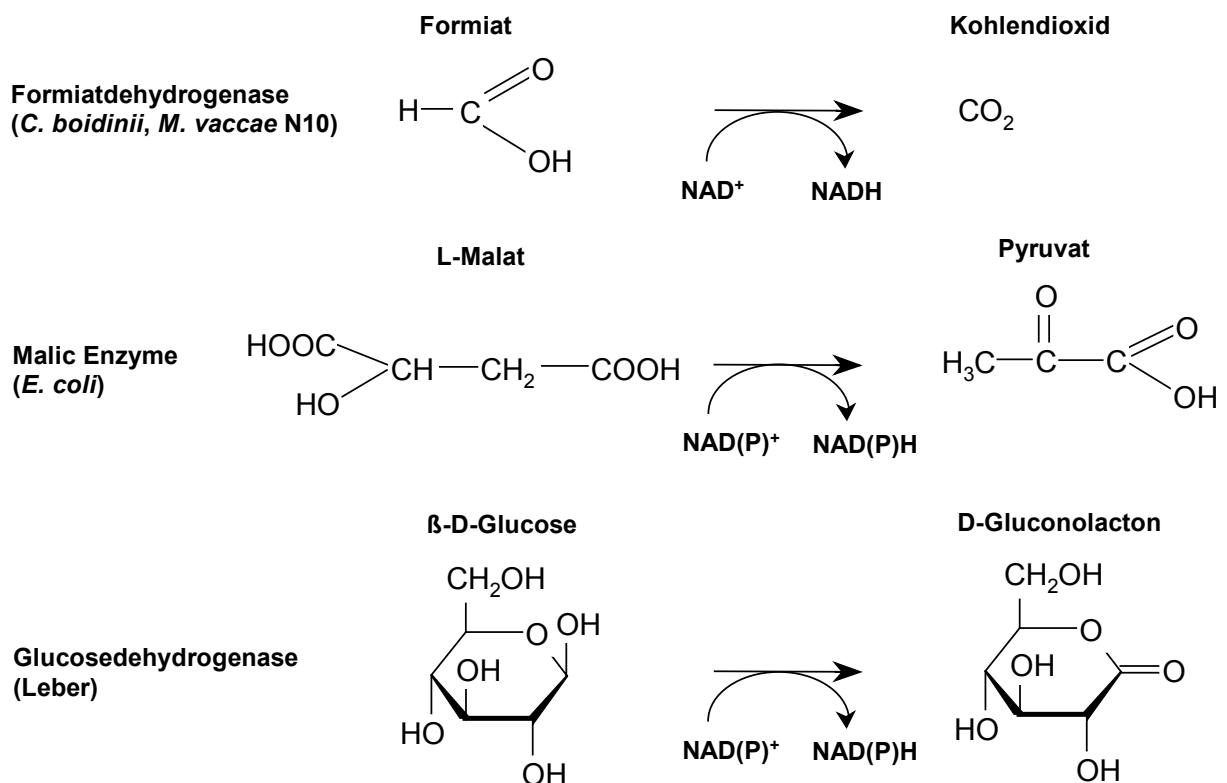


Abbildung 5: Reaktionen von FDH, Malic Enzymes und GDH, die für die Kofaktorregenerierung von NAD(P)H geeignet sind.

Andere Enzyme wie Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, ADH oder Hydrogenase sind auch einsetzbar, haben jedoch den Nachteil, dass entweder ihr Substrat selbst zu teuer ist oder Substrat bzw. Produkt andere Enzyme inaktivieren oder die Enzyme

selbst - speziell Hydrogenasen - gegenüber oxidierenden Reagenzien sensitiv sind. Einige Enzyme sind auch in der Lage, ein Substrat zu oxidieren und gleichzeitig ein weiteres zu reduzieren. Zum Beispiel können einige ADHs neben der gewünschten Reduktionsreaktion auch Isopropanol zu Aceton oxidieren, jedoch muss Isopropanol im großen Überschuss vorliegen, um hohe Ausbeuten des gewünschten Produktes zu erreichen. Aufgrund der geringen Toleranz gegenüber Isopropanol bis maximal 20 % im Reaktionsansatz sind der Biokatalyse jedoch hinsichtlich der eigentlichen Produktbildung Grenzen gesetzt. Im Allgemeinen ist unabhängig von der Art der Kofaktorregenerierung eine Eigenschaft am wichtigsten: die Anzahl der Regenerationszyklen des Kofaktors. Diese wird in der sogenannten *turn over number* ausgedrückt, die das Verhältnis zwischen gebildeter Produktmenge und Kofaktormenge in der Reaktion ausdrückt.

$$\text{turn over number} = \frac{\text{Endprodukt [mol]}}{\text{Kofaktor [mol]}}$$

Je höher diese Zahl ist, umso geeigneter ist die Art der Kofaktorregenerierung. Wirtschaftlich interessant beim Einsatz aufgereinigter Enzyme sind *turn over*-Zahlen von NAD(P)H von 10^3 - 10^6 . Bei enzymatischer Kofaktorregenerierung liegen die *turn over*-Zahlen bei ≥ 500 (Chenault et al., 1988). Photochemische und elektrochemische Regenerierungsmethoden sind, wie schon erwähnt, weitaus weniger effektiv und führen eher zum Verlust des Kofaktors. Hier soll auf die drei wichtigsten Enzyme (FDHs, Malic Enzymes und GDHs) zur Kofaktorregenerierung eingegangen werden.

FDHs spielen in unterschiedlichen Stoffwechselwegen eine Rolle und kommen in vielen Mikroorganismen und auch in Pflanzen vor. Einige Anwendungsbeispiele für FDHs sind bereits in Kapitel 2.1.6 beschrieben. Aufgrund ihrer physiologischen Funktionen und des dafür spezifischen Aufbaus können FDHs in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Die beiden wichtigsten Gruppen sind die der FDHs aus methylotrophen Bakterien und Hefen und anaerob exprimierte bzw. unter fermentativen Bedingungen aktive FDHs. Weiterhin gibt es FDHs aus methanogenen Archeabakterien und chemoautotrophen Bakterien. Tabelle 7 zeigt eine Einteilung von FDHs, wobei die Grenzen zwischen den einzelnen Gruppen fließend sein können, da vor allem die anaerob gebildeten FDHs meist auch andere Kofaktoren als NAD^+ benötigen.

Von den fermentativen FDHs wurde FDH-H (Nomenklatur lt. Publikation) aus *E. coli* von Wang und Gunsalus (2003) beschrieben. Das Enzym gehört zu einem Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplex, und wird nur unter anaeroben Bedingungen und dem Vorhandensein von Formiat im Medium exprimiert. Es stellt durch die Formiatoxidation Reduktionsäquivalente für andere Redoxprozesse zur Verfügung. Aus *E. coli* wurden

auch die FDHs FDH-N und FDH-O (N. It. P.) beschrieben (Wang und Gunsalus, 2003). Die Expression erfolgt unter anaeroben Bedingungen, die Enzyme sind im Allgemeinen membrangebunden und besitzen als aktive Zentren für Redoxreaktionen zum Beispiel Eisen-Schwefel-Zentren und ein membranintegrales Cytochrom. Formiat dient in der anaeroben Atmung als Elektronendonator für die Reduktion von Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Fumarat oder DMSO. FDH-N hat seine Funktion in der Formiat-Nitrat-Atmungskette, wobei durch Kopplung von FDH-N an die NarG-Nitrat-Reduktase die Reduktion von Nitrat zu Nitrit katalysiert wird. FDH-O wird im Gegensatz zu FDH-N nicht durch Nitrat induziert und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Umstellung des Stoffwechsels von aerober auf anaerobe Atmung und wird nur gering exprimiert.

Tabelle 7: Einteilung und Beispiele von bakteriellen und eukaryotischen FDHs.

Einteilung der FDHs	Beispiele	veröffentlicht durch
FDHs aus methylo-trophen Bakterien und Hefen	FDH-CB aus <i>C. boidinii</i>	Slusarczyk et al. (2002)
	FDH-MV aus <i>M. vaccae</i> N10	Galkin et al. (1995)
	FDH aus <i>Pseudomonas</i> sp.	-
	FDH aus Hefe (Y-FDH)	-
	FDH aus <i>Paracoccus</i> sp. 12-A	Shinoda et al. (2002)
	FDH-ME1 aus <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	Laukel et al. (2003)
anaerob bzw. unter fermentativen Bedingungen exprimierte FDHs	FDH-H aus <i>E. coli</i>	Wang und Gunsalus (2003)
	FDH-N aus <i>E. coli</i>	Wang und Gunsalus (2003)
	FDH-O aus <i>E. coli</i>	Wang und Gunsalus (2003)
FDHs aus methanogenen und chemoautotrophen Bakterien und FDHs mit Kofaktoren außer NAD(P) ⁺	FDH-MF aus <i>Methanobacterium formicicum</i>	Schauer und Ferry (1986), May et al. (1988)
	FdhA aus <i>Sulfurospirillum multivorans</i>	Schmitz und Diekert (2003)
	FDH-S aus <i>Ralstonia eutropha</i>	Friedewald und Bowien (1993)

Aus methanogenen Archeabakterien ist FDH-MF aus *Methanobacterium formicicum* beschrieben (Schauer und Ferry, 1986). Neben CO₂ und H₂ wird auch Formiat selbst als Substrat für die Methanogenese verwendet. Das strikt anaerobe Enzym ist membranassoziiert und benötigt zur Reduktion von Formiat zu Formaldehyd als Koenzym und Reduktionsäquivalent F₄₂₀. FDH-MF besteht aus zwei heterologen Unter-

einheiten $\alpha 1$ und $\beta 1$ mit mindestens einem Eisen-Schwefel-Zentrum. Es verfügt weiterhin über 1 Mol Molybdän pro Mol Enzym sowohl über 2 Mol Zink, 21 bis 24 Mol Eisen und 25 bis 29 Mol Schwefelatome. Der Einfluss von Molybdän und Wolfram auf die Aktivität von FDH-MF wurde von May et al. (1988) untersucht.

FdhA, die hohe Sequenzähnlichkeiten zu den größeren Untereinheiten von FDH-MF, FDH-N, FDH-O (N. It. P.) und FDH-H besitzt, wurde in *Sufurospirillum multivorans* gefunden, aufgereinigt und charakterisiert (Schmitz und Diekert, 2003). Das Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa verfügt über ein Eisen-Schwefel-Cluster und einen Selenocystein-Rest. Es wird vermutet, dass es aufgrund bestimmter Aminosäuresequenzen einen Molybdopterinkofaktor binden kann. Als Kofaktoren werden nicht NAD(P)^+ sondern Methylviologen akzeptiert. Von Friedewald und Bowien (1993) wurde FDH-S aus *Ralstonia eutropha*, einem chemoautotrophen Bakterium, beschrieben. Formiat wird hier als C-Quelle unter aeroben Bedingungen genutzt und zu CO_2 oxidiert.

Zur Gruppe der FDHs aus methylo trophen Bakterien und Hefen gehören zum Beispiel FDH-CB, FDH-MV, FDH aus *Pseudomonas sp.* 101 sowie Y-FDH. Formiat ist hier ein Intermediat aus der Oxidation von C1-Verbindungen zu CO_2 . Die zu dieser Gruppe gehörenden FDHs sind NAD^+ -abhängig, bestehen aus Homodimeren und enthalten keine Kofaktoren und Metalle. FDH-CB wurde unter anderem von Slusarczyk et al. (2000) beschrieben. Während das Wildtyp-Gen in *C. bovidinii* nur exprimiert wird, wenn Methanol als einzige C- und Energiequelle vorhanden ist, konnte das rekombinante Gen *fdhCB* in *E. coli* unter einem T7-Promotor exprimiert werden, wobei eine Ausbeute von 20 % des löslichen Proteinanteils erreicht wurde. Durch sitespezifische Mutagenese im Gen wurden in FDH-CB beide Cysteinreste ersetzt, um das Enzym gegen Inaktivierung durch Sauerstoff zu stabilisieren. FDH-MV wurde von Galkin et al. (1995) erstmals beschrieben und gilt wie FDH aus *Pseudomonas sp.* 101 als stabil gegen organische Lösungsmittel. Das Protein, das bis auf zwei Aminosäuren identisch mit FDH aus *Pseudomonas sp.* 101 ist, wurde ebenfalls rekombinant in *E. coli* synthetisiert. Eine weitere FDH, die hohe Sequenzähnlichkeiten zu FDH aus *Pseudomonas sp.* 101 besitzt, ist FDH aus *Paracoccus sp.* 12-A, einem Formiat assimilierenden Bakterium, das Formiat aber selten Methanol als C-Quelle nutzt (Shinoda et al., 2002). Die spezifische Aktivität der rekombinant in *E. coli* exprimierten FDH aus *Paracoccus sp.* 12-A liegt mit 0,7 U/mg im Bereich von FDH-CB. FDH1 aus *Methylobacterium extorquens* AM1 (hier FDH-ME1) nimmt hier eine Sonderstellung ein, da das strikt NAD^+ -abhängige Enzym wie FDH-MF aus zwei heterologen Untereinheiten besteht und Eisen-Schwefel-Zentren besitzt sowie über Wolfram (1,8 Mol Wolfram pro Mol Enzym) verfügt (Laukel et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden FDH-CB (modifiziert nach Slusarczyk et al., 2000), FDH-MV

und FDH-ME1 als kofaktorregenerierende Enzyme untersucht, wobei die codierenden Gene zum Teil synthetisch hergestellt oder gentechnisch verändert wurden.

Malic Enzymes wurden bereits in einer Vielzahl von Organismen gefunden und als oxidative Decarboxylasen in Pflanzen, Bakterien und Tieren beschrieben (Kobayashi et al., 1989, Chang und Tong, 2003, Wynn et al., 1999, Lobit et al., 2003). Malic Enzymes sind hoch konservierte Proteine und katalysieren im Stoffwechsel die oxidative Decarboxylierung von L-Malat zu Pyruvat und die reduktive Carboxylierung von Pyruvat. Im Gegensatz zu Malatdehydrogenasen, die im Zitronensäurezyklus die NAD^+ -abhängige Oxidation von L-Malat zu Oxalacetat katalysieren, können Malic Enzymes drei Reaktionen und damit drei Gruppen zugeordnet werden je nachdem, ob der Kofaktor (NAD(H) , NADP(H)) benötigt wird und ob Oxalacetat decarboxyliert werden kann (Fukuda et al., 2005). Die erste Gruppe (EC 1.1.1.38) benötigt NAD(H) und kann Oxalacetat decarboxylieren. Die zweite Gruppe (EC 1.1.1.39) bevorzugt NAD(H) , kann aber auch NADP(H) verwenden, und ist nicht in der Lage, Oxalacetat zu decarboxylieren. Die dritte Gruppe (EC 1.1.1.40) ist NADP(H) -abhängig und kann Oxalacetat decarboxylieren. Die NADP^+ -abhängigen Malic Enzymes treten im Zytoplasma und in den Mitochondrien auf und stellen Reduktionsäquivalente für die Biosynthese verschiedener Zellkomponenten bereit, während die NAD^+ -abhängigen Malic Enzymes nur in Mitochondrien vorkommen und für die Bereitstellung von Kohlenstoff für die Gluconeogenese oder den Tricarbonsäurezyklus zuständig sind. Das aus der Decarboxylierung von Malat gebildete Pyruvat kann daher von Pyruvat-Dehydrogenase zu CO_2 und Acetyl-CoA oxidiert und wieder dem Zitronensäurezyklus zugeführt werden. Damit gewährleistet Malic Enzyme die Bereitstellung von C2-Einheiten für und die Energiegewinnung durch den Zitronensäurezyklus (z. B. Lobit et al., 2003), wenn einzelne Reaktionen im Zitronensäurezyklus blockiert sind. Desweiteren kann das gebildete Pyruvat durch Phosphoenolpyruvat-Synthase in Phosphoenolpyruvat umgewandelt und der Gluconeogenese zugeführt werden.

Malic Enzymes sind im Allgemeinen tetramere Proteine, die aus vier homologen Untereinheiten von etwa 50 - 65 kDa bestehen. Für die Umwandlung von Malat zu Pyruvat und CO_2 sind außer den Kofaktoren auch zweiwertige Metallionen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}) essentiell. Menschliches Malic Enzyme kommt in sich schnell teilenden Zellen und Tumoren vor und gilt als potentiell Ziel in der Krebs-Chemotherapie (Chang und Tong, 2003). Ein thermostabiles Malic Enzyme wurde in *B. stearothermophilus* beschrieben (Kobayashi et al. 1989), ein weiteres in *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (Fukuda et al., 2005). Malic Enzyme aus *B. stearothermophilus* katalysiert sowohl die Decarboxylierung von L-Malat als auch die von Oxalacetat, als Kofaktor wird NAD^+ bevorzugt, während Malic Enzyme aus *T. kodakaraensis* NADP^+ bevorzugt. Malic Enzyme aus *Corynebacterium glutamicum* wurde im Rahmen einer Untersuchung zur Deletion von Pyruvatkinase analysiert (Netzer et al., 2004). Malic

Enzyme wird hier verstärkt gebildet und erhält das metabolische Gleichgewicht zwischen Glykolyse, Glukoneogenese und Zitronensäurezyklus.

In der vorliegenden Arbeit wurde Malic Enzyme aus *E. coli* für die Kofaktorregenerierung als Alternative zu den FDHs bei Reduktionsreaktionen untersucht (z. B. Mahajan et al., 1990). Im Rahmen einer Analyse von spontan mutierten und Mutagen-induzierten Mutanten, die DNA-Exonuklease VIII Aktivität zeigen, wurde das Enzym des *sfcA*-Gens untersucht. Durch Aufreinigung der entsprechenden Enzyme *sfcA* und *maeA* aus *E. coli* wurde bereits von Spina et al. (1970) und Yamaguchi et al. (1973) gezeigt, dass die beiden Gene identisch sind. Das von *sfcA* bzw. *maeA* codierte Malic Enzyme aus *E. coli* K12 ist trotz der hohen Homologie zu den NADP⁺-abhängigen Ratten- und Maus-Malic Enzyme NAD⁺-abhängig. Als Kofaktormetall werden Mangan- oder Magnesiumionen benötigt. Im Gegensatz zu den FDHs aus *C. boidinii* und *M. vaccae* N10 gibt es jedoch bis auf das Patent DE 102 40 603 (Naamnik et al., 2004) keine Veröffentlichungen über Malic Enzyme aus *E. coli* oder einem anderen Organismus als kofaktorregenerierendes Enzym, sondern nur Vermutungen, dass es als solches geeignet wäre.

Glucosedehydrogenasen (GDHs) sind eine dritte Möglichkeit, Kofaktoren bei Biotransformationen zu regenerieren. Sie kommen in vielen Organismen vor und sind bereits kommerziell z. B. aus *B. megaterium* oder *B. cereus* erhältlich und gut charakterisiert (z. B. Nidetzky et al., 1996; Wong und Drucekhammer, 1985). Eine weitere GDH aus Ochsenleber ist von Strecker und Korke (1952) beschrieben, GDH aus *Gluconobacter scleroides* wurde von Eguchi et al. (1992) und GDH aus Rinderleber von Levy und Vennesland (1957) beschrieben. Sie katalysieren die Umsetzung von D-Glucose zu D-Gluconolacton und D-Gluconsäure und sind gegenüber einer Reihe organischer Solventien, Sauerstoff, einigen Salzen sowie thermisch stabil. Als Kofaktoren können NAD⁺ und NADP⁺ genutzt werden, womit GDHs zur Regenerierung beider Kofaktoren eingesetzt werden können. Biotransformationssysteme mit ganzen *E. coli*-Zellen, die GDH aus *B. megaterium* und Carbonylreduktase koexprimieren, wurden von Kataoka et al. (2003) beschrieben. Hier wird die Herstellung chiraler Alkohole aus ihren prochiralen Vorstufen mittels ganzen Zellen durch rekombinant hergestellte Proteine gezeigt. GDH ist als kofaktorregenerierendes Enzym für Carbonylreduktasen besonders geeignet, da im Gegensatz zu FDHs NAD⁺ und NADP⁺ als Kofaktoren akzeptiert werden und damit GDH universell einsetzbar ist. Trotzdem hat GDH gegenüber FDH zwei Nachteile. Zum einen wird ein Nebenprodukt gebildet, das in Lösung bleibt und zum anderen führt die Bildung von Gluconolacton, das spontan oder enzymkatalysiert zu β -Gluconsäure hydrolysiert, zu einer Ansäuerung des Reaktionsmediums bis pH 3 und schlussfolgernd zu einem Reaktionsstop. Dieser kann nur durch kontinuierliche pH-Regulation vermieden werden, um hohe Aus-

beuten zu erhalten. Ein Einsatz in Enzymmembranreaktoren ist beschränkt möglich (Chenault und Whitesides, 1995).

Nichtenzymatische Methoden zur Kofaktorregenerierung können wie bereits erwähnt die hohen *turn over*-Zahlen der enzymatischen Kofaktorregenerierung nicht erreichen. Nachteil chemischer Regenerationsmethoden ist meistens, dass der Elektronendonator die Enzyme inhibiert oder die Enzymsubstrate direkt reduziert (Chenault und Whitesides, 1995). Weitere Möglichkeiten der Kofaktorregenerierung werden elektrochemisch oder photochemisch ermöglicht. Die elektrochemische Regenerierung des Kofaktors verfügt über den Vorteil, dass kein Nebenprodukt gebildet wird. Ein großer Nachteil ist jedoch die geringe Regioselektivität der Reduktion von NAD(P)^+ an der Kathode, so dass die Ausbeuten an enzymatisch aktivem Kofaktor niedrig sind. Eine photochemische Regenerierung des NAD(P)H mittels Licht erfolgt über den Transfer eines Elektrons von einem photoaktiven Material über eine Elektronentransportkette zu NAD(P) . Verfahren dazu wurden bereits von Chenault und Whitesides (1987) und Willner und Mandler (1989) beschrieben. Bis heute ist ihr Einsatz aufgrund der niedrigen Regenerationsraten jedoch gering.

2.2 Neue Aminosäure- und Alkoholdehydrogenasen

Die Suche nach neuen ADHs stellt einen wichtigen Punkt in der Entwicklung neuer Medikamente, deren Komponenten und Vorstufen dar, da die bisher für die Synthese chirale Wirkstoffe eingesetzten ADHs oft ein zu geringes Substratspektrum aufweisen, in zu geringen Mengen exprimiert werden oder den Anforderungen wie der hohen Enantioselektivität nicht genügend entsprechen. Neue ADHs, ob im Ganzzellkatalysator oder *in vitro* vorliegend, sollten demnach billig und in großen Mengen herzustellen sein, eine hohe spezifische Aktivität gegenüber einem großen Substratspektrum sowie eine hohe Enantioselektivität besitzen, wobei das Enzym zwischen den chiralen Formen nicht wechseln sollte. Zudem sollten neue ADHs stabil gegenüber hohen Konzentrationen ihrer Substrate und Produkte sein und durch diese nicht inaktiviert bzw. denaturiert werden. Die Suche nach neuen ADHs erfolgt wie bei vielen anderen Enzymen auch sowohl über das klassische als auch über das genetische Screening. Im Folgenden werden beide Methoden kurz vorgestellt.

2.2.1 Screeningverfahren

2.2.1.1 Klassisches (aktivitätsbasiertes) Screening

Beim klassischen Screening nach neuen Enzymen wird nach dem Zielenzym über das Anzuchtmedium selektiert. Die Isolate werden dazu auf den benötigten Selektionsdruck hin selektiert.

tionsplatten (im Allgemeinen Minimalmedium) mit spezifischen C- und N-Quellen angereichert. Eine C-Quelle (Kohlenstoff-Quelle) kann dabei ein sekundärer Alkohol oder ein Zucker (aber nicht Glucose) sein, als N-Quelle können Nitrate, Aminosäuren oder auch Ammoniumverbindungen dienen. Zusätzlich kann das Wachstum unter aeroben oder anaeroben Bedingungen bzw. anderen physikalischen Konditionen betrachtet werden. Als positive Stämme werden diejenigen betrachtet, die bei den minimalen Bedingungen wachsen können. Von diesen Kulturen werden üblicherweise Genbanken aus DNA-Fragmenten des Isolates zum Beispiel mit Hilfe von Cosmiden angelegt, in denen dann wiederholt nach dem entsprechenden Enzym über Selektionsplatten gesucht wird. Positive Klone werden isoliert, das im Cosmid vorliegende DNA-Fragment des Ursprungsstammes sequenziert und das Gen für das entsprechende Enzym isoliert. Nachteil dieser Methode ist neben der großen Anzahl entstehender Kolonien bei der Erstellung der Genbanken das daraus resultierende Hochdurchsatzscreening und die falsch positiven Kolonien, die trotz Abwesenheit des gesuchten Gens aufgrund alternativer Stoffwechselwege wachsen. Über das klassische Screening wurden unter anderem verschiedene ADHs wie diejenige aus *R. erythropolis* DSM 43297 gefunden und isoliert. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, zuerst das Enzym zu isolieren, dann die Proteinsequenz zu ermitteln und darüber die DNA-Sequenz zu bestimmen. Hier wird nicht versucht, die Gene zu exprimieren, sondern man konzentriert sich auf das gebildete Protein. Die Aufreinigung erfolgt aus dem Zellrohextrakt über mehrfache Säulenchromatographie mit unterschiedlichen Säulenmaterialien.

2.2.1.2 Genetisches Screening

Im Gegensatz zum klassischen Screening wird beim genetischen Screening nach Enzymen gesucht, bei denen schon einige Exemplare bekannt und untersucht sind. Dabei werden von deren Proteinsequenz degenerierte Oligonukleotide abgeleitet und mit genomischer bzw. Cosmid-DNA der mikrobiellen Isolate aus Bodenproben Genamplifikationen mittels PCR durchgeführt. Die Oligonukleotide werden dabei an konservierten Sequenzen wie zum Beispiel einer NAD⁺- oder Zinkbindestelle angesetzt. Von den daraus isolierten DNA-Fragmenten werden nach dem Sequenzieren neue Oligonukleotide abgeleitet und durch molekulargenetische Methoden wie reverse PCR das komplette Gen entsprechend seinem Leserahmen isoliert. Anschließend erfolgt die Klonierung in einem Expressionsvektor unter einen Promotor (zum Beispiel T7) und die Expression des Gens. Zu den Firmen, die solchen genetischen Screenings durchführen, gehört zum Beispiel B.R.A.I.N. AG. Die Firma verfügt über eine entsprechend große Stammsammlung vor allem von Bodenisolaten sowie über rekombinante Metagenombanken, mit denen sowohl aktivitätsbasierte Screenings als auch genetische Screenings durchgeführt und miteinander kombiniert werden. Das

Verfahren wurde bereits erfolgreich bei der Suche nach neuen Lipasen und Esterasen angewendet. Zu den geeigneten Bakterien, in denen ADHs zu finden sein sollten gehören z. B. Actinomyceten wie die verschiedenen Stämme von *R. erythropolis*. Diese verfügen über eine große Anzahl von Enzymen, die Biotransformationen wie Dehydrogenierungen oder Epoxidationen und den Abbau vieler Stoffe katalysieren können (de Carvalho und da Fonseca, 2005). Anhand der Proteinsequenz der ADH-RE aus *R. erythropolis* DSM 43297 (Abokitse und Hummel, 2004) und vieler weiterer Alkoholdehydrogenasen, die in Genbanken zu finden sind, wurden degenerierte Oligonukleotide gebildet und Metagenombanken beziehungsweise Mikroorganismen aus der Stammsammlung nach neuen ADHs durchsucht. Tatsächlich konnte aus *A. paraffineus* eine neue ADH isoliert werden. Da beide Bakterien, wie schon aus der taxonomischen Zuordnung ersichtlich ist, bei den Actinomyceten in die Familie der Nocardoiden eingeordnet werden und beide zur Untergruppe *Rhodococcus* sp. gehören, war eine hohe Ähnlichkeit beider Proteine nicht überraschend. Beide Proteinsequenzen stimmen zu 98,5 % miteinander überein, auf DNA-Basis liegt die Übereinstimmung bei 94 %, was eine familiäre Ähnlichkeit bestätigt. ADH aus *A. paraffineus* wurde als ADH-AP(A) bezeichnet und wurde wie auch die ADH-RE in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung von Ganzzellkatalysatoren zur Synthese enantiomerenreiner sekundärer Alkohole verwendet. Andere von der B.R.A.I.N. AG durch genetisches Screening ermittelte potentielle ADHs stammen zum Beispiel aus *S. coelicolor* A3(2), wurden allerdings bis dato noch nicht isoliert.

Die Nachteile des genetischen Screenings finden sich vor allem in der großen Anzahl an verschiedenen Gensequenzen bei Enzymen gleicher Klasse, wodurch eine signifikante Anzahl an degenerierten Oligonukleotiden notwendig ist sowie optimierte PCR-Bedingungen, um ein geeignetes DNA-Fragment zu finden. Weiterhin kann man nur Gene isolieren, die zu bekannten Genen homolog sind, man erhält also keine neue Klasse von Enzymen mit ähnlicher Reaktion. Umgekehrt erhält man viele Gensequenzen, die sich z. B. im gewählten Wirt nicht exprimieren lassen. Bei exprimierbaren Genen kann es schließlich noch vorkommen, dass man kein Substrat für das gebildete Protein findet. Bei Lipasen und Esterasen erscheint diese Methode aufgrund der geringeren Variabilität zwischen den Enzymen im Vergleich zu anderen Enzymklassen geeignet zu sein, um in Isolaten neue Gene zu finden. Die Variabilität zwischen ADHs ist um vielfaches größer, sowie auch deren Substratspezifität entsprechend unterschiedlich ist. Somit können durch ein genetisches Screening mit Hilfe degenerierter Oligonukleotide wie schon erwähnt nur strukturell bzw. in ihrer Substratspezifität ähnliche ADHs gefunden werden.

2.3 Zielsetzung

2.3.1 Design von Ganzzellkatalysatoren für reduktive Aminierungen und Reduktionen von α -Ketosäuren

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Konstruktion von Biokatalysatoren aus ganzen Zellen, die α -Ketosäuren und andere Ketoverbindungen mittels reduktiver Aminierung bzw. Reduktion der Ketoverbindung zu den komplementären Aminosäuren bzw. sekundären Alkoholen umwandeln sollten. Eine Regenerierung des benötigten Kofaktors sollte ebenfalls gewährleistet werden. Es sollten zuerst die Gene der für die Reduktionsreaktionen (Aminosäuredehydrogenase, ADH) und Kofaktorregenerierung (FDH, Malic Enzyme) in Frage kommenden Enzyme auf geeignete Expressionsvektoren kloniert werden. Anschließend sollten die jeweiligen Gene für Reduktion bzw. Kofaktorregenerierung in einem geeigneten *E. coli*-Stamm koexprimiert werden und die Zellen mit den rekombinant gebildeten Enzymen als Ganzzellkatalysatoren für die Synthese der Aminosäuren bzw. sekundären Alkohole eingesetzt werden. Als Modellreaktionen wurden einmal die Umsetzung von Trimethylpyruvat zu *L-tert*-Leucin (reduktive Aminierung) und zum anderen die Reduktion der Ketoverbindung *p*-Chloracetophenon zu *p*-Chlorphenylethanol im Rahmen des BMBF-Projektes „Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Aminosäuren mittels eines Ganzzellkatalysators“ ausgewählt. Die Umsetzungen sollten im Labormaßstab etabliert und optimiert werden. Weiterhin war die Wahl des geeigneteren kofaktorregenerierenden Enzyms von Interesse, um maximale Ausbeuten (> 95 %) bei hohen Substratkonzentrationen (> 300 mmol/l) zu erreichen.

2.3.2 Suche nach neuen Alkoholdehydrogenasen in *S. coelicolor* A3(2)

Streptomyces coelicolor gehört zur Familie der Streptomyceten, die den Actinomyce-ten angehören. Sie sind grampositive Bodenbakterien und tragen zur Remineralisierung des Bodens bei. Streptomyceten sind in der Lage eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten wie Antibiotika (z.B. Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin, Tetracycline, Spectinomycin) zu produzieren. *S. coelicolor* A3(2) produziert beispielsweise Aktinorhodin und Methylenomycin, die Antibiotikaproduktion des Bakteriums ist von Bibb (1996) beschrieben. Viele Streptomyceten bauen auch Cellulose, Chitin und viele schwer abbaubare Naturstoffe ab, indem sie eine Vielzahl von hydrolytischen Enzymen sekretieren. Aufgrund dessen ist die Gattung auch interessant für die Suche nach neuen ADHs, die an der Synthese der Sekundärmetabolite beteiligt sein könnten oder zum Abbau von Schadstoffen beitragen und damit auch für ein breiteres Substratspektrum verfügbar wären. Die Suche nach diesen neuen ADHs wurde

speziell auf *S. coelicolor* A3(2) fokussiert. Das Bakterium besitzt mit 8,7 Mbp ein fast doppelt so großes Genom wie *E. coli* und mit einem GC-Gehalt von 72 %. Das Genom wurde vollständig sequenziert und etwa 8.000 Gene kartiert, bei denen jedoch meist nur mögliche Funktionen aufgrund von Proteinsequenzhomologien vorausgesagt werden konnten (Bentley et al., 2002; Redenbach et al., 1996; Donadio et al., 2002; Hopwood, 1999). Als Grundlage für die Auswahl putativer neuer ADHs wurden die Online-Datenbank des Sanger Institutes in Cambridge (Großbritannien) genutzt, die über das komplett sequenzierte *S. coelicolor*-Genom verfügt, sowie die Protein-datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA). Da hinsichtlich des Interesses, neue mittel- und kurzkettige ADHs zu finden, besonders nach homologen Proteinen zur ADH-RE und ADHF1 gesucht wurde, wurde die Suche sequenzbasiert gestaltet. Über Alignments wurden die zehn zu ADH-RE und ADHF1 ähnlichsten Peptidsequenzen ermittelt. Die Expression von möglichen, rekombinanten ADHs aus *S. coelicolor* wurde untersucht.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Enzyme und Kofaktoren

Die für Klonierungen und Plasmidüberprüfungen eingesetzten Restriktionsendonukleasen wurden von Roche und NEB bezogen. T4-DNA-Ligase, Alkalische Phosphatase und Klenow-Polymerase wurden ebenfalls von Roche bezogen. Von Biomaster wurde Taq-Polymerase und von Roche Expand High Fidelity Polymerase für DNA-Amplifikation verwendet. Von BIOMOL Feinbiochemica wurden die Kofaktoren NAD(P)⁺ und NAD(P)H sowie Ampicillin eingesetzt.

3.1.2 Feinchemikalien

Feinchemikalien wie sekundäre Alkohole und sekundäre Ketone wurden von Fluka, Roth, Serva Feinbiochemika oder SIGMA Aldrich bezogen. Trimethylpyruvat und L-*tert*-Leucin wurden von Degussa bereitgestellt. Die Talon-Säulen für die His-Tag-Reinigung wurden bei Clontech bestellt. Alternativ wurde eine Ni-NTA-Matrix von Qiagen verwendet. Strep-Tactin-Säulen für Strep-Tag-Aufreinigungen sind bei IBA GmbH erhältlich.

3.1.3 Sonstige Chemikalien

Alle sonstigen verwendeten Chemikalien und Lösungen sind erhältlich bei SIGMA, Merck, Fluka, Difco (Invitrogen), Biozym und Biorad.

3.1.4 Nicht selbständig hergestellte Plasmide

Einige der verwendeten Plasmide wurden für Klonierungsarbeiten zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Nicht selbst hergestellte Plasmide.

Plasmid	Promotor	Resistenz	Insert	Publikation/sonstige Bemerkungen
pJOE4016.7	<i>rha</i>	Ap ^R	<i>adhF1</i>	Hildebrandt et al. (2002)
pJOE4056.2	<i>rha</i>	Ap ^R	<i>eGFP</i>	nicht veröffentlicht
pJOE4580.2	<i>rha</i>	Ap ^R	<i>lacZ</i>	nicht veröffentlicht
pJOE4625.1	<i>rha</i>	Ap ^R	<i>sfcA</i>	nicht veröffentlicht
pJOE5066.1	<i>rha</i>	Ap ^R	<i>eGFP</i>	nicht veröffentlicht
pZSU179.9	<i>mtl</i>	Km ^R	<i>eGFP</i>	nicht veröffentlicht
pTST101.1	<i>rha</i>	Ap ^R	<i>malE/eGFP</i>	nicht veröffentlicht
pWA21	<i>rha/T7</i>	Ap ^R	<i>eGFP</i>	nicht veröffentlicht
pHWG640.12	<i>rha</i>	Cm ^R	<i>sfcA</i>	nicht veröffentlicht
pNO9	<i>rha</i>	Ap ^R	<i>adhRE(co)</i>	von Degussa
pNO11	<i>rha</i>	Cm ^R	<i>adhRE(co)</i>	von Degussa
pET22-HD14-A	-	Ap ^R	<i>adhAP(A)</i>	von B.R.A.I.N. AG
pET22-HD14-G	-	Ap ^R	<i>adhAP(G)</i>	von B.R.A.I.N. AG
050544pPCR-Script	T3/T7	Ap ^R	<i>fdhMV</i>	von Degussa
042645pPCR-Script	T3/T7	Ap ^R	<i>fdh1A</i> , <i>fdh1B</i>	von Degussa
pACYCisc	-	Cm ^R	<i>isc</i> -Operon	Gräwert et al., 2004

3.1.5 Verwendete Kits

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Kits und deren Zweck.

Kit-Bezeichnung	Firma	Zweck
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	Plasmidisolierung
PCR and Gel Band Purification Kit	GFX	PCR-Fragment-Aufreinigung, Fragmentaufreinigung aus Gelblöckchen
Easy Pure	Biozym Diagnostic GmbH	Gelelution

3.1.6 Verwendete Medien

Tabelle 10: Medienzusammensetzung.

Medium	Bestandteil	Konzentration
LB ₀ -Medium (pH 7,2)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
TY-Medium (pH 7,2)	Trypton	5 g
	Hefeextrakt	2,5 g
	H ₂ O _{mp}	ad 500 ml
Glycerinkulturmedium	87 % Glycerin	57,5 ml
	TY-Medium (erst nach dem Autoklavieren mischen)	42,5 ml
TSS-Medium	LB ₀ -Medium (pH 6,5)	82,5 ml
	PEG 6000	10 g
	DMSO	5 ml
	2 M MgCl ₂	2,5 ml
Batchmedium für 8 l (Fermentation)	Na ₂ SO ₄ ·10 H ₂ O	16 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	21,4 g
	NH ₄ Cl	4 g
	K ₂ HPO ₄	117 g
	NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	28,8 g
	(NH ₄) ₂ H-Citrat	8 g
	VE H ₂ O	ad 7,5 l
Glucose-Monohydrat VE H ₂ O (getrennt autoklavieren)	Glucose-Monohydrat	220 g
	VE H ₂ O (getrennt autoklavieren)	ad 0,5 l
	1 M MgSO ₄ -Lösung	16 ml
Spurenelemente-Lösung	Spurenelemente-Lösung	24 ml
	10 g/l Thiaminlösung	8 ml
Fedbatch Feed I (alles getrennt autoklavieren, dann vereinigen)	Glucose-Monohydrat	2750 g in 3,5 l H ₂ O
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	98,5 g in 150 ml H ₂ O
	Spurenelemente-Lösung	H ₂ O
	Thiaminlösung	0,5 l
	L-Rhamnose	2,5 g in 50 ml H ₂ O 10,4 g in 26 ml H ₂ O
Fedbatch Feed II (pH 7)	(NH ₄) ₂ HPO ₄	396 g in 1 l H ₂ O

Tabelle 11: Fortsetzung Medienzusammensetzung.

Medium	Bestandteil	Konzentration
Spurenelemente (Fermentation)	CaCl ₂ x2 H ₂ O	0,5 g
	ZnSO ₄ x7 H ₂ O	0,18 g
	MnSO ₄ xH ₂ O	0,1 g
	Di-Na-EDTA	20,1 g
	FeCl ₃ x6 H ₂ O	16,7 g
	CuSO ₄ x5 H ₂ O	0,16 g
	CoCl ₂ x6 H ₂ O	0,18 g
	VE H ₂ O	ad 1 l
Vorkulturmedium (Fermentation, Rezept für 1 l)	Na ₂ SO ₄ x10 H ₂ O	2 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,675 g
	NH ₄ Cl	0,5 g
	K ₂ HPO ₄	14,625 g
	NaH ₂ PO ₄ x2 H ₂ O	3,6 g
	VE H ₂ O	ad 900 ml
	Glucose-Monohydrat	10 g
	VE H ₂ O (getrennt autoklavieren)	ad 0,09 l
	1 M MgSO ₄ -Lösung	2 ml
Spurenelemente-Lösung	3 ml	
10 g/l Thiamin in H ₂ O	1 ml	

3.1.7 Antibiotika und andere Zusätze

Tabelle 12: Medienzusätze.

Antibiotikum/Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in 50 % EtOH	100 µg/ml
Chloramphenicol	25 mg/ml in EtOH	25 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in 0,1M NaOH	50 µg/ml
Nalidixinsäure	20 mg/ml in 0,1M NaOH	10 µg/ml bzw. 40 µg/ml
IPTG	24 mg/ml in 50 % EtOH	48 µg/ml
X-Gal	64 mg/ml in Dimethylformamid	80 µg/ml
L-Rhamnose	20 % w/v in VE H ₂ O	0,2 %
L-Arabinose	400 mg/ml	0,05 mg/ml – 4 mg/ml

3.1.8 Puffer, Lösungen und Testlösungen

Tabelle 13: Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung/Testlösung	Bestandteil	Konzentration
Coomassie-Färbelösung	Coomassie R250 Coomassie G250 EtOH MeOH Eisessig VE H ₂ O	2 g 0,5 g 425 ml 50 ml 100 ml 425 ml
Entfärbelösung	EtOH Eisessig VE H ₂ O	450 ml 100 ml 450 ml
Substratlösung für FDH-Aktivitätstest (pH 8,2 mit 25 % NH ₃ und 100 % HCOOH bzw. 2 M NaOH und 1 M HCl)	Natriumformiat K ₂ HPO ₄ VE H ₂ O	2,72 g (0,8 mol/l) 0,87 g (0,1 mol/l) ad 50 ml
Substratlösung für LDH-Aktivitätstest (pH 8,2 mit 25 % NH ₃ und 100 % HCOOH bzw. 2 M NaOH und 1 M HCl)	Trimethylpyruvat Ammoniumchlorid K ₂ HPO ₄ VE H ₂ O	38,3 mg (5 mmol/l) 2,14 g (0,8 mmol/l) 0,87 g (0,1 mol/l) ad 50 ml
Substratlösung für Malic Enzyme- Aktivitätstest	Äpfelsäure pH 7,5 DTE MgCl ₂ KPP pH 7,5	1 M (100 µl) 100 mM (10 µl) 1 M (10 µl) 100 mM (770 µl)
Substratlösung für ADHF1-Aktivitätstest (pH 11 mit 2 M NaOH und 1 M HCl)	Glycinpuffer sekundärer Alkohol (z. B. 2- Hexanol)	0,05 M 0,01 M
Substratlösung für ADH-Aktivitätstest (15 min Inkubation im Ultraschallbad für Emulgation)	KPP pH 6 oder pH 7 p-Chloracetophenon	0,1 M 1,5 mM
NAD ⁺ -Lösung für FDH und ADHF1 (pH 8 mit 2 M NaOH, Lagerung bei -20 °C)	NAD ⁺ in VE H ₂ O	40 mmol/l
NAD ⁺ -Lösung für Malic Enzyme (pH 7,5 mit 2 M NaOH, Lagerung bei -20 °C)	NAD ⁺ in VE H ₂ O	100 mmol/l
NADH-Lösung für LDH	NADH in VE H ₂ O	2 mmol/l
NADH-Lösung für ADH-RE/ADH-AP	NADH in VE H ₂ O	12,5 mmol/l

Tabelle 14: Fortsetzung Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung/Testlösung	Bestandteil	Konzentration
5x Auftragspuffer für SDS-PAGE	Tris/HCl pH 6,8 EDTA SDS β-Mercaptoethanol Glycerin Bromphenolblau	250 mM 10 mM 5 % 5 % 50 % 0,005 %
10x Laufpuffer für SDS-PAGE	Tris Base Glycin SDS H ₂ O	30 g 144 g 10 g ad 1 l
10x Auftragspuffer für DNA-Agarosegelelektrophorese (4 °C bzw. RT)	Xylencyanol Bromphenolblau Glycerin 0,5 M EDTA pH 8	0,25 % (w/v) 0,25 % (w/v) 50 % ad 200 ml
50x TAE	Tris Base Eisessig EDTA VE H ₂ O	242 g 57,1 ml 18,6 g ad 1 l
TE 10.01	Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0 VE H ₂ O	10 mM 0,1 mM ad 1 l
HPLC-Laufmittel für p-Chloracetophenon-Analytik	Acetonitril Trifluoressigsäure VE H ₂ O	510 ml 1 ml 490 ml
HPLC-Laufmittel für Trimethylpyruvat-Analytik	12,5 mM KPP pH 7,2 MeOH	50 % 50 %
Lysepuffer Biofeedback	Glucose Tris/HCl pH 8,0 EDTA VE H ₂ O zusätzlich: Lysozym RNase I	50 mM 25 mM 10 mM ad 1 l 10 mg/ml 25 µg/ml

3.1.9 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme und ihre Genotypen sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Verwendete Bakterienstämme und ihre Genotypen.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> AM106	MC4100 <i>rssB::Tn10</i>	Pruteanu und Hengge-Aronis, 2002
<i>E. coli</i> AM125	MC4100 <i>clpP1::cat^a</i>	Pruteanu und Hengge-Aronis, 2002
<i>E. coli</i> BL21	<i>F ompT hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i>	Studier und Moffatt, 1986
<i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS	<i>F ompT hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS</i>	Studier und Moffatt, 1986
<i>E. coli</i> BW3110	W3110 <i>rhaB⁻</i>	Stumpp et al., 2000; Wilms et al., 2001
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron et al., 1985
<i>E. coli</i> MC4100	<i>F Δ(arg-lac)U169 araD139 rpsL150 ptsF25 flbB5301 rbsR deoC relA1</i>	Pruteanu und Hengge-Aronis, 2002
<i>E. coli</i> RH90	MC4100 <i>rpoS359::Tn10</i>	Pruteanu und Hengge-Aronis, 2002
<i>E. coli</i> S17.1	<i>Tp^r Sm^r recA thi pro hsdR^M RP4:2-Tc:Mu:Km Tn7</i>	Simon et al., 1983
<i>E. coli</i> W3110	Wildtyp	Stumpp et al., 2000
<i>P. putida</i> KT2440	<i>hsdM⁺ hsdR⁺ rif^r</i>	Bagdasarian et al., 1981

3.2 Methoden

3.2.1 Stammhaltung von *E. coli* und *Pseudomonas* sp.

Für die Herstellung von Dauerkulturen wurden Einzelkolonien von Bakterienstämmen in 2x 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 30 °C (*Pseudomonas* sp.) über Nacht inkubiert. Die Zellen der Übernachtskulturen wurden anschließend pelletiert (Megafuge, 4.500 rpm, 5 min, RT) und der

Überstand verworfen. Die pelletierten Zellen aus zwei Ansätzen wurden durch Re-suspendieren in 3 ml Glycerinkulturmedium vereinigt und auf zwei Gefrieröhrchen verteilt. Die Dauerkulturen wurden räumlich getrennt bei -20 °C aufbewahrt.

Wurden Stämme ständig benötigt, wurden sie auf die entsprechenden LB-Platten ausgestrichen, bei 37 °C oder 30 °C über Nacht inkubiert und dann im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Für Versuche wurde von da aus von Einzelkolonien angeimpft.

3.2.2 Anzucht von *E. coli* und *Pseudomonas sp.*

Im Allgemeinen wurden für alle Versuche und Transformationen als erstes 5 ml-Übernachtskulturen aus Einzelkolonien der betreffenden Stämme in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angefertigt und diese bei 37 °C oder 30 °C inkubiert. Daraus wurden am folgenden Tag die Hauptkulturen 1 : 100 in LB-Medium angeimpft und bei den entsprechenden Temperaturen weiter bis zur gewünschten optischen Dichte bei 600 nm von 0,4 inkubiert. Ab dieser optischen Dichte erfolgte dann entweder die Induktion der Genexpression oder die Zellernte für die Transformation.

3.2.3 Induktion der Genexpression mit L-Rhamnose, L-Arabinose und D-Mannitol

Für die Expression von Genen wurden die Stämme mit den entsprechenden Plasmiden aus Übernachtskulturen 1 : 100 in LB-Medium ohne/mit Antibiotika angeimpft und 2 h bei 37 °C oder 30 °C inkubiert (Schüttler: New Brunswick Scientific, 200 rpm). Die Induktion der Genexpression erfolgte mit den jeweiligen Endkonzentrationen von 0,2 % L-Rhamnose (*E. coli*), 0,5 % Mannitol (*Pseudomonas sp.*) und 0,05 - 4 mg/ml L-Arabinose (*E. coli*). Die Genexpression bei L-Rhamnoseinduktion erfolgte im Allgemeinen bei 30 °C, konnte aber z. B. bei Bildung von Einschlusskörpern in Abhängigkeit vom Bakterienstamm auch bei 28 °C oder 22 °C erfolgen. Die Expression von Genen mit Mannitol und L-Arabinose erfolgte ebenfalls bei 30 °C.

3.2.4 Zugabe von Metallionen

Für Untersuchungen zur Metallabhängigkeit von ADHF1 aus *P. fluorescens* DSM 50106, deren Gen *adhF1* z. B. auf den Plasmiden pJOE4016.7 und pAM144.1 inseriert war, wurden zu *E. coli* JM109 mit dem jeweiligen Plasmid ZnCl₂, NiCl₂, CoCl₂, MnSO₄, MgCl₂, FeCl₂ und CuCl₂ jeweils in einer Endkonzentration von 0,5 mmol/l ab Induktionsbeginn zugegeben. Bei Induktionen der ADHs aus *R. erythropolis* DSM 43297 und *A. paraffineus* wurde ZnCl₂ in einer Endkonzentration von 0,5 mmol/l zugegeben.

3.2.5 Molekulargenetische Methoden

3.2.5.1 Plasmidisolierung mit QIAprep®Spin Miniprep Kit

Für die Isolierung von Plasmid-DNA für Klonierungen und Dauerlagerung bei -20 °C mit dem Miniprep Kit der Firma QIAGEN wurden 5 ml-Übernachtskulturen angefertigt und mit ihnen die Plasmidisolierung nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die eluierte DNA wurde bei 4 °C im Kühl- oder -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

3.2.5.2 Plasmidisolierung nach Lee und Rasheed (1990, modifiziert)

Plasmidisolierungen nach Lee und Rasheed (modifiziert, Biofeedback) wurde als kostensparende Variante für die Untersuchung von Transformanten durchgeführt. Die benötigten Lösungen setzen sich, wie nachfolgend angegeben, für 25 Ansätze zusammen:

- Lysepuffer: 5 ml Lysepuffer, 125 µl RNAse I (10 mg/ml), 50 mg Lysozym
- NaOH/SDS : 0,84 ml 2 M NaOH, 0,84 ml 10 % SDS, 6,72 ml VE H₂O
- 7,5 M NH₄-Acetat (eisgekühlt)

Von jedem zu testenden Klon wurde eine 3 ml-Übernachtskultur angefertigt. Davon wurden 1,5 ml in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (Eppendorfszentrifuge, 5.000 rpm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl des Lysepuffers resuspendiert. Es folgten 5 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) und anschließend die Zugabe von 300 µl der NaOH/SDS-Lösung. Das Mischen erfolgte durch Schwenken der Reaktionsgefäße, die Inkubation erfolgte für 5 min auf Eis. Danach wurden 400 µl NH₄-Acetat zugegeben, erneut gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt, bei dem chromosomale DNA und ein Teil der Proteine pelletiert wurden (Eppendorfszentrifuge, 14.000 rpm, 5 min, RT). Zur Plasmid-DNA-Fällung wurden die Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt, in die bereits 700 µl Isopropanol vorgelegt wurden. Die Inkubation erfolgte bei RT für 10 min mit anschließender Zentrifugation (Tischzentrifuge, 10 min, 14.000 rpm, RT). Die Überstände wurden verworfen und die DNA-Pellets zweimal mit 70 % EtOH gewaschen (Zentrifugation jeweils 3 min bei 14.000 rpm, RT). Nach dem Verwerfen der Überstände wurden die DNA-Pellets in einer Vakuumzentrifuge getrocknet (ca. 10 min) und dann in 50 µl TE 10.01 aufgenommen. Für die Kontrollrestriktionsverdau der mit Biofeedback isolierten Plasmid-DNA wurden 4 µl DNA (das entspricht 100 - 200 ng DNA) eingesetzt.

3.2.5.3 Hergestellte Plasmide

In Tabelle 16 und 17 sind die in dieser Arbeit erstellten relevanten Plasmide zusammengestellt.

Tabelle 16: Plasmidzusammenstellung.

Bezeichnung	Ursprungsvektor	Insert	Oligos für Insert	Resistenz	Promotor
pAM3.25	pJOE4580.2	<i>fdhCB</i>	s3723/s3716	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM5.22	pJOE4625.1	<i>ldh</i>	s3713/s3714	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM8.21	pHWG640.12	<i>ldh</i>	s3713/s3714	Cm ^R	<i>rha</i>
pAM10.1	pAM8.21	<i>ldh/sfcA</i>	-	Cm ^R	<i>rha</i>
pAM18.2	pJOE4580.2	<i>sco0365</i>	s3719/s3720	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM19.1	pJOE4580.2	<i>sco4304</i>	s3717/s3718	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM24.3	pJOE4580.2	<i>sco2490</i>	s3810/s3811	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM32.8	pJOE4580.2	<i>sco1611</i>	s3806/s3807	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM50.7	pJOE4580.2	<i>sco7147</i>	s3871/s3872	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM75.14	pJOE4580.2	<i>sco7362</i>	s3906/s3907	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM77.6	pJOE4580.2	<i>sco0522</i>		Ap ^R	<i>rha</i>
pAM82	pJOE4580.2	<i>adhRE-m</i>	s3896/s3897	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM83	pJOE4580.2	<i>adhRE-m</i>	s3896/s3897	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM86	pJOE4580.2	<i>adhRE-m</i>	s3896/s3897	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM92.1	pAM3.25	<i>fdhCB/ldh</i>	s3918/s3919	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM94.4	pJOE4580.2	<i>adhRE</i> (wt)	s3917/s3897	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM104.12	pJOE4056.2	<i>adhAP</i> (A)	-	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM105.2	pJOE4056.2	<i>adhAP</i> (G)	-	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM121.4	pHWG640.12	<i>adhAP</i> (A)	-	Cm ^R	<i>rha</i>
pAM130.3	pJOE4580.2	<i>adhF1-med</i>	s4040/s4042	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM131.3	pJOE4580.2	<i>adhF1-long</i>	s4041/s4042	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM132.1	pHWG640.12	<i>adhRE-m42</i>	-	Cm ^R	<i>rha</i>
pAM136.3	pZSU179.9	<i>adhF1</i>	-	Km ^R	<i>mtl</i>
pAM137.1	pHWG640.12	<i>adhRE</i> (wt)	-	Cm ^R	<i>rha</i>
pAM138.2	pJOE4042.1	<i>adhF1</i>	-	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM141.1	pJOE5066.1	<i>adhF1</i>	-	Ap ^R	<i>rha</i>

Tabelle 17: Plasmidzusammenstellung Fortsetzung.

Bezeichnung	Ursprungsvektor	Insert	Oligos für Insert	Resistenz	Promotor
pAM142.1	pJOE4056.2	<i>adhF1</i>	-	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM143.1	pJOE4056.2	<i>sfcA</i>	-	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM144.1	pJOE4056.2	<i>adhF1</i> (wt)	s4078/s4079	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM145.8	pJOE4580.2	<i>adhE</i>	s4076/s4077	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM146.1	pJOE4580.2	<i>sco1705</i>	s4101/s4102	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM148.1	pWA21	<i>adhF1</i>	-	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM149.1	pWA21	<i>fdhMV</i>	-	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM153.16	pWA21	<i>fdh1BA</i>	-	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM154.1	pHWG640.12	<i>fdh1A</i>	-	Cm ^R	<i>rha</i>
pAM155.1	pAM153.1	<i>fdh1B</i>	-	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM159.4	pAM158.2	<i>fdh1AB</i>	-	Ap ^R	<i>rha</i>
pAM160.1	pHWG640.12	<i>adhRE</i> (co)	-	Cm ^R	<i>rha</i>

3.2.5.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Restriktionsverdau und PCR-Fragmenten wurden aus SEA-KEM-Agarose und 1x TAE-Puffer 1 %-ige Gele (durch Erhitzen) hergestellt, nach kurzem Abkühlen wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 µg/ml zugegeben und das noch flüssige Gel in einen vorbereiteten Schlitten mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Auslaufsperrern und der Kamm entnommen und das Gel in eine vorbereitete Gelkammer mit 1x TAE inklusive 0,4 µg/ml Ethidiumbromid als Laufpuffer gelegt. Ethidiumbromid im Gel interkaliert in Doppelstrang-DNA und macht sie unter UV-Licht sichtbar. Ethidiumbromid im Laufpuffer verhindert, dass es aus dem Gel in den Puffer diffundiert und der DNA-Nachweis erschwert wird.

Die aufzutragende DNA (im Allgemeinen 10 µl, aus PCR-Ansätzen 5 µl) wurden mit 1 µl Auftragspuffer gemischt und in eine Geltasche pipettiert, als DNA-Längenstandard wurde zum Fragmentlängenvergleich der 1 kB-Ladder-Marker von Gibco/Invitrogen mit aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mit einer angelegten Spannung von 10 V/cm Gellänge. Die Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte unter UV-Licht.

3.2.5.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach der Auftrennung der Fragmente aus einem Restriktionsverdau. Die für die Ligation benötigten DNA-Fragmente der richtigen Bandengröße wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Standardreaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Easy Pure DNA Purification Kit der Firma Biozym nach Anleitung. Die DNA wurde in 15 µl TE 10.01 eluiert und für Ligationen eingesetzt.

3.2.5.6 Verwendete Oligonukleotide

Die in Tabelle 18 und Tabelle 19 aufgeführten Oligonukleotide wurden in der vorliegenden Arbeit zur Genamplifikation verwendet:

Tabelle 18: Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen/Richtung/ Zweck
s988	AAG CTG AAA ATC TTC TCT	Sequenzierung
s1095	GGC CCA TTT TCC TGT CAG T	Sequenzierung
s3713	AAA AAA CTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGA CAT TAG AAA TCT TCG AA	<i>ldh</i> for.
s3714	AAA AAA CTG CAG TTA GCG ACG GCT AAT AAT AT	<i>ldh</i> rev.
s3716	AAA AAA GAC GTC TTA TTT CTT ATC GTG TTT ACC	<i>fdhCB</i> rev.
s3717	AAA AAC ATA TGG GAC AGC TCG AAG GCA	<i>sco4304</i> for.
s3718	AAA AAA AGC TTC CGG GTC AGA TCT GGT TCT C	<i>sco4304</i> rev.
s3719	AAA AAC ATA TGA AGC AAC CCC GAG CCG	<i>sco0365</i> for.
s3720	AAA AAA AGC TTT CAC GCC ATC ACC CAC CCT	<i>sco0365</i> rev.
s3723	AAA AAA CAT ATG AAG ATT GTC TTA GTT CTT	<i>fdhCB</i> for.
s3806	AAA AAC ATA TGA GCG AAG ACA TCG TCT	<i>sco1611</i> for
s3807	AAA AAA AGC TTC TAC AGC GGT GTG ACG TA	<i>sco1611</i> rev.
s3810	AAA AAC ATA TGA CCA CCC AGC GCT TCA C	<i>sco2490</i> for.
s3811	AAA AAA AGC TTC AGG CCG TCT GGC CGC	<i>sco2490</i> rev.
s3845	AAA AAC TTA AGT TAT TTC TTA TCG TGT TTA CCG	<i>fdhCB</i> rev.
s3863	AAA AAA CCG GTT TAG CGA CGG CTA ATA ATA TCG T	<i>ldh</i> rev.
s3869	AAA AAC ATA TGA ACA CGA ACA CGC ACA C	<i>sco6249</i> for.
s3870	AAA AAA AGC TTC TAC GCC GCG TGG CCG C	<i>sco6249</i> rev.
s3871	AAA AAC ATA TGT CCC CGA ACC AGT CCC	<i>sco7147</i> for.

Tabelle 19: Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen/Richtung/ Zweck
s3872	AAA AAA AGC TTC CAG ATG AGT TCC CAG GCC G	sco7147 rev.
s3887	AAA AAC ATA TGT CCC GTA CAG ACT CGG C	sco0522 for.
s3888	AAA AAA AGC TTC TAC TGC GCA CTG GCG GC	sco0522 rev.
s3889	AAA AAC ATA TGA AGG CAG CGG TCG TCC	sco0199 for.
s3890	AAA AAA AGC TTT CAG CCT CCC GCG TTG AGA	sco0199 rev.
s3891	AAA AAC ATA TGA AAG CAG TCC AGG TGG T	sco0259 for.
s3892	AAA AAA AGC TTT CAC GGG ACA AGG ATC GCG	sco0259 rev.
s3896	AAA AAA CAT ATG AA(AG) GCN AT(ACT) CA(AG) TA(CT) ACG CGC ATC GGC GCG GAA CCC GAA	<i>adhRE</i> for. für TIR-Modifi- kation
s3897	AAA AAA AGC TTC TAC AGA CCA GGG ACC ACA	<i>adhRE</i> rev.
s3906	AAA AAA CAT ATG AAG GCA CTG CAG TAC CG	sco7362 for.
s3907	AAA AAA AAG CTT TCA GCC GTG GGG CAG GAT	sco7362 rev.
s3917	AAA AAA CAT ATG AAG GCA ATC CAG TAC ACG	<i>adhRE</i> (wt) for.
s3918	AAA AAA GAC GTC ATG ACA TTA GAA ATC TTC GAA TAC	<i>ldh</i> for.
s3919	AAA AAA GAC GTC TTA GCG ACG GCT AAT AAT ATC	<i>ldh</i> rev.
s3952	AAA AAA AAG CTT ATG AAA GCT ATT CAA TAT ACG AG	<i>adhRE</i> -m42 for.
s3953	TTT TTT GGA TCC CAG ACC AGG GAC CAC AAC	<i>adhRE</i> -m42 rev.
s3963	AAA AAA CAT ATG CAG AAC ATC ATC CGA AAA G	A64901 for.
s3964	AAA AAA AAG CTT TTA GCG GCG GAA ATC AAT CA	A64901 rev.
s4040	AAA AAA CAT ATG GCG CTT CAA GCG GGT	<i>adhF1</i> (med) for.
s4041	AAA AAA CAT ATG GCC CGC TTC GAC ATG	<i>adhF1</i> (long) for.
s4042	AAA AAA CTT TCA GAG ACG GGG CTC GTC	<i>adhF1</i> rev.
s4078	AAA AAA CAT ATG AAG TCA TTC AAC GGC CGC	<i>adhF1</i> for.
s4079	AAA AAA AAG CTT TCA GAG ACG GGG CTC GTC G	<i>adhF1</i> rev.

3.2.5.7 Genamplifikation mit PCR

Um Gene aus chromosomaler DNA zu isolieren und zu amplifizieren sowie Gene mit neuen Restriktionsschnittstellen zu synthetisieren, wurden PCRs im Minicycler™ von

MJ Research durchgeführt. PCR-Ansätze für Reaktionen mit Taq-Polymerase setzen sich für 100 µl Reaktionsvolumen zusammen wie in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Zusammensetzung von PCR-Reaktionen mit Taq-Polymerase.

Zusatz	Volumen / Konzentration
DNA (extrachromosomal oder chromosomal)	50 ng
100 % DMSO	0 – 10 µl
10 x Polymerase-Puffer	10 µl
50 mM MgCl ₂	3 µl
10 mM dNTPs	2 µl
33,3 µM Oligonukleotid 1	1 µl
33,3 µM Oligonukleotid 2	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl
VE H ₂ O	ad 100 µl

Die Zusätze wurden gemischt und die PCR im Minicycler™ gestartet. Als Reaktionsgefäße wurden MultiPLY®-Safecup-Amplifikationsgefäße der Firma Sarstedt eingesetzt. Zuerst wurde die dsDNA bei 94 °C für 5 min zur Denaturierung erhitzt. Anschließend folgt ein 30-facher Zyklus, der mit dem Annealing der Oligonukleotide startet (in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Oligonukleotide meist 3 °C bis 7 °C niedriger als diese) und 1 min dauert. Als nächster Schritt folgt die Elongation der Oligonukleotide durch die Polymerase bei 72 °C, in Abhängigkeit von der Zielfragmentlänge zwischen 30 sec und 1,5 min. Dann erfolgt wieder ein Denaturierungsschritt bei nur 92 °C für 1 min und ein neuer Zyklus. Nach 30 Zyklen wurden die PCR-Ansätze noch 7 min bei 72 °C inkubiert, um alle einzelsträngigen Bereiche noch komplementär mit dNTPs aufzufüllen.

Da durch Taq-Polymerase häufig Fehler in die Sequenz eingebaut werden, wurde für möglichst fehlerfreie Amplifikationen auch High Fidelity Polymerase eingesetzt. Diese ist nicht hitzestabil und wurde erst nach dem ersten Denaturierungsschritt zugegeben. Die PCR-Ansätze setzten sich hierbei aus zwei Mastermixen zusammen, die in Tabelle 21 zusammengefasst sind. Mit Mastermix 1 wird der erste Denaturierungsschritt durchgeführt, Mastermix 2 wird dann für die 30 Zyklen zugegeben. Nach der PCR-Reaktion wurden 5 µl eines Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und die Amplifikation mit Gelelektrophorese überprüft.

Tabelle 21: Zusammensetzung von PCR-Reaktionen mit High Fidelity Polymerase.

Mastermix 1		Mastermix 2	
10 mM dNTPs	2 µl	5 x Expand High Fidelity Puffer	20 µl
33,3 µM Oligonukleotid 1	1 µl	VE H ₂ O	29 µl
33,3 µM Oligonukleotid 1	1 µl	High Fidelity Polymerase	1 µl
DNA	50 ng		
100 % DMSO	0 – 10 %		
VE H ₂ O	ad 50 µl		

3.2.5.8 Reinigung von PCR-Fragmenten

War eine Genamplifikation mit PCR laut Gelelektrophorese positiv verlaufen, wurde das synthetisierte Fragment direkt aus dem PCR-Ansatz mit dem „PCR and Gel Band Purification Kit“ der Firma GFX nach Anleitung aufgereinigt. Das eluierte Fragment wurde ebenfalls mit Gelelektrophorese kontrolliert und für Restriktionsverdau eingesetzt.

3.2.5.9 Restriktionsverdau

Für Klonierungen oder Charakterisierungen von Plasmiden und PCR-Fragmenten wurde DNA mit Restriktionsendonukleasen der Firmen Roche oder NEB behandelt. Dazu wurden im Allgemeinen 10 µl-Ansätze gewählt. Ein Ansatz bestand dabei aus 1 µl Enzympuffer (10-fach konzentriert), 1 µl Enzym (5 - 10 U/µl Ausgangskonzentration), 3 - 5 µl DNA (100 - 250 ng) und additiv VE H₂O. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C. Musste DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut werden, wurde die DNA zwischen beiden Restriktionsverdau mit Isopropanol gefällt (siehe Kapitel 3.2.5.10). Zur Auftrennung der Fragmente wurden die Ansätze mit 1 µl DNA-Auftragspuffer versetzt und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

3.2.5.10 Isopropanolfällung

Isopropanolfällung wurde als Zwischenschritt durchgeführt, wenn DNA mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen behandelt werden sollte, um das erste Enzym und dessen Puffer zu entfernen. Nach der ersten Restriktion wurden dem 10 µl-Ansatz 1 µl 3 M Na-Acetat-Puffer pH 6,2 und 10 µl Isopropanol zur Fällung der DNA zugegeben, gemischt und die DNA durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 14.000 rpm, Eppendorffzentrifuge, RT). Der Überstand wurde entnommen und das Pellet in 10 µl 100 % EtOH gewaschen, erneut 3 min zentrifugiert und der Überstand

entfernt. Die gefällte DNA wurde vakuumgetrocknet (Vakuumzentrifuge, 5 min) und anschließend in 8 µl TE 10.01 aufgenommen. Die zweite Restriktion wurde durch Zugabe von 1 µl Enzym 2 und 1 µl Restriktionspuffer 2 (10-fach konzentriert) gestartet und ebenfalls bei 37 °C inkubiert.

3.2.5.11 Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Da bei Klonierungen, bei denen Vektor und Insert mit nur einem Enzym geschnitten werden, die Wahrscheinlichkeit einer Religierung des Vektors hoch ist, wurde dessen lineare dsDNA nach der Restriktion mit Isopropanol gefällt, in 8 µl TE 10.01 aufgenommen und mit Alkalischer Phosphatase behandelt. Das Enzym stammt aus Kälbermagen (Roche) und spaltet die Phosphatgruppe am 5'-Ende der linearen dsDNA ab, um eine Religierung zu verhindern. Zur Vektor-DNA wurden 1 µl Alkalische Phosphatase (20 U/µl) und 1 µl 10x Phosphatase-Puffer gegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Trennung der DNA von Alkalischer Phosphatase erfolgte durch Gelelektrophorese.

3.2.5.12 Behandlung mit Klenow-Polymerase

Die Behandlung mit Klenow-Polymerase wurde durchgeführt, um ein Plasmid nach der Deletion eines Inserts durch zwei verschiedene Restriktionsenzyme wieder ligieren zu können. Mit Hilfe des Enzyms, dem die 5'-3'-Exonukleaseaktivität fehlt, werden überstehende 5'-Enden linearer Doppelstrang-DNA aufgefüllt oder überstehende 3'-Enden abgebaut. Es entstehen DNA-Fragmente mit glatten Enden, die sich leicht miteinander ligieren lassen. Für die Klenow-Behandlung werden 8 µl mit Isopropanol gefällter und in TE 10.01 aufgenommener DNA mit 1 µl 10x Roche-Restriktionspuffer B, 1 µl 2,5 mM dNTPs und 1 µl Klenow-Polymerase (5 U) gemischt und bei 37 °C für 20 min inkubiert. Die Aufreinigung der modifizierten DNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese und Gelelution. Durch das Auffüllen bzw. den Abbau der Enden können die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme verloren gehen.

3.2.5.13 Ligation

Die Verbindung von DNA-Fragmenten erfolgt enzymatisch durch Ligase. In der vorliegenden Arbeit wurde T4-DNA-Ligase und deren Puffer von Roche verwendet. Für Ligationsansätze wurde ein Gesamtvolumen von 15 µl und für jede Klonierung vier Ligationsansätze mit unterschiedlichen Vektor/Insert-Verhältnissen (inklusive Kontrollen) gewählt. Für alle Ansätze war gleich: 1,5 µl 10x Ligase-Puffer und 1 µl Ligase. Als Kontrollen wurde mit Restriktionsenzymen behandelte Vektor mit und ohne Ligase ohne Insertzugabe inkubiert. Die Ligationsreaktion erfolgte entweder 2 h bei 24 °C (Thermoschüttler) oder über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank.

3.2.6 Plasmidübertragungen

3.2.6.1 Transformation von *E. coli* mit Plasmiden

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen wurde *E. coli* aus einer Übernachtskultur 1 : 100 in 40 ml LB-Medium (eventuell mit Antibiotikum) angeimpft und 2 h bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ auf einem Schüttler (New Brunswick Scientific, Gyrotory Shaker) inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in SS34-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (Kühlzentrifuge SORVALL, 10 min, 4 °C, 4.500 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2,5 ml eisgekühlten TSS-Medium resuspendiert. Jeweils 200 µl wurden davon zu den Ligationsansätzen gegeben. Positivkontrolle war bei Transformationen pUC18 und als Negativkontrolle wurde TE 10.01 eingesetzt. Die Transformationsansätze wurden anschließend 30 - 60 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Hitzeschockbehandlung bei 42 °C für 90 sec im Wasserbad. Die Ansätze wurden danach in Zentrifugenröhrchen mit 2 ml LB₀ gegeben und 50 min bei 37 °C im Roller inkubiert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 4.500 rpm, 5 min), der Überstand abgekippt und das Pellet im Restmedium resuspendiert und komplett ausplattiert auf LB-Agar mit entsprechenden Antibiotika. Bei Bedarf wurden auch Screening-Marker (z. B. β-Galaktosidase zur Blau-Weiß-Selektion) zur ersten Identifizierung möglicher richtiger Transformanten genutzt. Bei den Kontrollen und bei Transformation mit vollständigen Plasmiden (Transformation von 2 µl DNA) wurden die Transformationsansätze nicht zentrifugiert, sondern nach der Inkubation im Roller 50 µl und 100 µl des Ansatzes direkt ausplattiert. Die Transformationsplatten wurden im Allgemeinen bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.2.6.2 Kreuzung von *E. coli* und *P. putida* KT2440

Um Plasmide in einen *Pseudomonas*-Stamm zu transferieren, wurde erst *E. coli* S17.1 mit diesen Plasmiden transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte über die Antibiotikaresistenz. Von *E. coli* S17.1 mit dem entsprechenden Plasmid wurde anschließend bei 37 °C eine Übernachtskultur angefertigt und gleichzeitig der gewünschte *Pseudomonas*-Stamm in 10 ml LB₀ bei 30 °C angezogen. Für die folgende Kreuzung (Konjugation) wurden die Zellen der *E. coli* S17.1-Übernachtskultur abzentrifugiert (Megafuge, 4.500 rpm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml LB₀ resuspendiert. Davon wurden 50 µl mit 150 µl der *Pseudomonas*-Übernachtskultur und 4,9 ml LB₀ gemischt und ein Tropfen auf die Mitte einer LB₀-Platte pipettiert. Die Inkubation erfolgte schließlich bei 30 °C über Nacht. Am Folgetag wurden die gewachsenen Zellen mit 5 ml LB₀ von der Platte gewaschen, in einem sterilen Zentrifugenglas gesammelt und gut gemischt. Mit einer sterilen Impföse wurde etwas Zellsuspension entnommen und auf LB-Agar mit Nalidixinsäure

(10 µg/ml, zur Selektion von *Pseudomonas*) und Antibiotikum auf Einzelkolonien ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte mindestens 24 h bei 30 °C.

3.2.7 Proteinanalytik

3.2.7.1 Zellernte bei Genexpressionsuntersuchungen

Vor der Zellernte bei Genexpressionsversuchen wurde zuerst die optische Dichte der Zellkultur bei 600 nm im Photometer bestimmt. Anschließend wurden von allen Ansätzen 5 OD oder 10 OD Zellen entnommen (in Eppendorfstandardreaktionsgefäße) und die Zellen pelletiert (Tischzentrifuge, 5.000 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet entweder bei -20 °C gelagert bis zur Weiterverwendung oder für den Zellaufschluss in 0,5 ml bzw. 1 ml 0,1 M NaPP (je nach Enzym pH 7 - pH 8) aufgenommen.

3.2.7.2 Zellaufschluss und Herstellung von Zellrohextrakt

Für die Trennung von löslichen und unlöslichen Proteinfractionen und zur späteren Untersuchung der Enzymaktivitäten wurden die Zellen (im 0,1 M NaPP pH 7 bis pH 8, siehe Kapitel 3.2.7.5) mit Ultraschall aufgeschlossen (Ultrasonic Sonicator). Die Ultraschallbehandlung erfolgte in Eiswasser pulsierend (50 % duty cycle) für 2 x 30 sec mit 30 sec Pause zwischen den Behandlungen. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 14.000 rpm, 15 min, 4 °C) und der Überstand, der die löslichen Proteinfractionen enthält, in ein frisches Probengefäß übertragen. Das verbliebene Proteinpellet wurde in der äquivalenten Menge 0,1 M NaPP wie die lösliche Proteinfraction aufgenommen. Falls keine sofortige Weiterverwendung erfolgte, wurde die Probe bei -20 °C gelagert.

3.2.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) werden mit Detergenz, Reduktionsmittel und Hitze denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Mit diesem Verfahren werden nach Induktionsversuchen Zellen auf die Produktion der rekombinanten Proteine hin untersucht. Zudem gibt die Trennung in lösliche und unlösliche Proteinfraction Aufschluss darüber, ob Proteine löslich sind oder als Inclusion Body vorliegen. Das Molekulargewicht kann durch einen Längensstandard kontrolliert und geschätzt werden. Hier wurde der Längensstandard ROTI®-Mark (Roth) verwendet.

Für die Proteinauftrennung wurden 12 %-ige Polyacrylamidgele verwendet. In Tabelle 22 sind die Zusammensetzungen von Trenn- und Sammelgel zusammengefasst. Mit den angegebenen Volumina können zwei SDS-Gele bei Verwendung der

Biometra Twin Mini Gelkammern hergestellt werden. Die Trenngele wurden zuerst gegossen, indem die vorbereitete Gelkammer bis ca. 1,5 cm unter dem oberen Rand gefüllt wurde. Ein langes Trenngel ermöglicht eine bessere Auftrennung der Proteine. Nach dem Gießen der Trenngele wurden diese mit Isopropanol überschichtet, um Blasenbildung zu vermeiden und eine gerade Oberfläche zu erhalten. Nach dem Festwerden wurde das Isopropanol vollständig durch Abkippen und Aufsaugen mit Zellstoff entfernt und das Sammelgel ohne Luftblasen darauf gegossen. Für die Bildung der Geltaschen wurden die benötigten Kämmen eingesetzt. Nach dem Aushärten der Gele wurden diese in feuchte Zellstofftücher verpackt und maximal eine Woche bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Vor dem Auftragen mussten die Proben denaturiert werden. Dazu wurden 12 µl Rohextrakt (ca. 15 µg Protein) mit 3 µl 5x SDS-Laufpuffer 5 min im Wasserbad gekocht und anschließend aufgetragen. Während des Laufs im Sammelgel betrug die Stromstärke 10 mA pro Gel. Nach dem die Blaufront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke auf 20 mA je Gel eingestellt und bis zum Abschluss der Elektrophorese nachgeregelt. Als Laufpuffer wurde 1x SDS-Laufpuffer verwendet. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Blaufront vollständig aus dem Gel ausgelaufen war. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung 30 min bei RT inkubiert und 45 min mit Entfärbelösung unspezifische Färbung rückgängig gemacht. Zum weiteren Aufbewahren und Fotografieren wurden die Gele in 7,5 %-ige Essigsäure überführt und in PE-Folie eingeschweißt.

Tabelle 22: Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE

	12 %-iges Trenngel	Sammelgel
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	8 ml	0,67 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	5 ml	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	1,25 ml
10 % SDS	200 µl	50 µl
VE H ₂ O	6,7 ml	3 ml
10 % APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

3.2.7.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford mit Hilfe des BIORAD-Reagenz. Dieses wurde im Verhältnis 1 : 5 mit in VE H₂O verdünnten Proteinen gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 1 ml durchgeführt. Die Extinktion der Proben wurde bei 595 nm im Photometer gegen VE H₂O als Blindprobe bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichgerade, die aus einer Verdünnungsreihe (0 - 7 µg/ml) aus BSA (1,38 mg/ml Ausgangslösung) angefertigt wurde, ermittelt. Die Eichgerade wurde für jede Proteinbestimmung neu erstellt.

3.2.7.5 Aktivitätstests

Mit allen in dieser Arbeit verwendeten Dehydrogenasen wurden die Enzymaktivitäten am Photometer (Kontron UVIKON 860) in Form von Enzymkinetiken gemessen, um die spezifische Aktivität zu bestimmen. Da alle untersuchten Dehydrogenasen NAD⁺ bzw. NADH als Kofaktor nutzten, wurde die Aktivität über Zu- oder Abnahme der Extinktion der Kofaktoren bei 340 nm gemessen. Die Kofaktoren für die einzelnen Enzymreaktionen wurden wie in Tabelle 23 beschrieben vorbereitet und wie nachfolgend beschrieben eingesetzt. Die Substratlösungen wurden jeweils auf 30 °C vorgewärmt, um für alle Enzyme gleiche Reaktionstemperaturen zu garantieren. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Anstieg oder Abfall der Extinktion verwendet. Die für die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität genutzte Formel ist im Folgenden gezeigt:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}} \cdot V_g \cdot f}{\varepsilon \cdot V_p \cdot t \cdot d \cdot c_p}$$

U/mg ist dabei die spezifische Enzymaktivität, wobei 1 U eines Enzyms 1 µmol Substrat pro Minute unter den gegebenen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert) umsetzt. Sie setzt sich zusammen aus dem Extinktionsanstieg bei 340 nm ($\Delta E_{340\text{nm}}$), dem Gesamtprobenvolumen V_g [ml], dem Probenverdünnungsfaktor f , dem molaren Extinktionskoeffizienten ε für NAD(H) mit $\varepsilon = 6,3 \text{ ml}/(\mu\text{mol} \times \text{cm})$, dem Probenvolumen V_p [ml], der Reaktionszeit t [min], der Küvettendicke d [cm] und der Proteinkonzentration c_p [mg/ml].

Da jedes Enzym seine spezifische Substratlösung hat, sind im Folgenden alle Aktivitätstests kurz tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 23). Angegeben sind dabei die Volumina der Rohextrakte, die Volumina der Substratlösungen, deren Zusammensetzungen wie auch die der Kofaktorlösungen in Tabelle 13 und Tabelle 14 aufgeführt sind, und die Volumina der Kofaktorlösungen.

Die pH-Werte der Substratlösungen und der NAD⁺-Lösungen wurden jeweils an die pH-Optima der zu analysierenden Enzyme angepasst. Bei den NADH-Lösungen wurde kein pH-Wert eingestellt. Das Reaktionsvolumen wurde auf 1 ml festgesetzt. Die Kofaktorlösung wurde jeweils kurz vor Reaktionsstart zum Substrat gegeben. Die Reaktionen wurden jeweils mit Zugabe des Zellrohextraktes gestartet. Rohextrakt und Substratlösung mit Kofaktor wurden in der mit Parafilm abgedichteten Messküvette durch fünfmaliges Schwenken gemischt und die Messung anschließend sofort gestartet. Wurden nichtlineare Kinetiken gemessen, wurden die betroffenen Rohextrakte verdünnt eingesetzt oder mehr Zellrohextrakt für die Messung verwendet.

Tabelle 23: Zusammensetzung der Lösungen für die Aktivitätstests.

Komponente	Formiatdehydrogenasen	LDH	Malic Enzyme	ADHF1	ADH-RE ADH-AP	sco-Proteine
Substratlösung [µl]	900	930	940	900	970	930
Zellrohextrakt [µl]	50	50	5-10	50	5-10	50
Kofaktor	NAD ⁺	NADH	NAD ⁺	NAD(H)	NADH	NAD(H)
Kofaktor [µl]	50	20	50	50 (20)	20	50 (20)

Die Bestimmung der Aktivitäten der FDHs, von LDH und ADH-RE wurden nach Protokollen von Degussa modifiziert durchgeführt (FDH-Protokoll: QM-AV/SC-FE-FC-1-002/02, LDH-Protokoll: QM-AV/SC-FE-FC-1-001/02, ADH-RE-Protokoll: QM-AV/FC-FEA-2-1-013/01). Für ADH-AP wurde aufgrund der sequenziellen Ähnlichkeit ebenfalls das modifizierte ADH-RE-Protokoll verwendet. Für ADHF1 wurden sowohl das Protokoll der ADH-RE als auch das der FDHs angepasst. Dazu wurde aufgrund des breiteren Spektrums für die Pufferung 50 mM Glycinpuffer pH 7 bis pH 12 sowohl für die Oxidations- als auch für die Reduktionsreaktionen verwendet. Messungen der Aktivität unterhalb pH 7 wurden mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer durchgeführt.

Die Proteine der exprimierten *S. coelicolor*-Gene wurden ebenfalls mit dem modifizierten Protokoll zur Analyse der ADH-RE untersucht, allerdings auch Oxidationsreaktionen nach dem Beispiel der ADHF1 durchgeführt.

3.2.7.6 Reinigung von Proteinen über IMAC (immobilized metal affinity chromatography)

Proteine, die mit einem His-Tag am N- oder C-terminalen Ende fusioniert sind, können über eine Ni-NTA-Matrix aufgereinigt werden. Die Säule (Ni-NTA Spin Colum,

Qiagen) wurde dabei bereits am Vortag vorbereitet. Zuerst wurden dabei 2 ml Ni-NTA-Harz (Ni-NTA-Agarose, Qiagen) auf die Säule pipettiert und der Matrixpuffer anschließend 2 min bei 1.800 rpm abzentrifugiert (Megafuge, Heraeus). Anschließend wurde nochmals 1 ml Ni-NTA-Harz auf die Säule gegeben und die Zentrifugation wiederholt. Danach folgte ein Waschschrift mit 1 ml Waschpuffer 1 (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT). Dieser wurde entfernt (2 min, RT, 1.000 rpm). Anschließend wurde wiederum 1 ml Waschpuffer 1 zugeben und die Säule 1 h im Kühlraum inkubiert. Danach wurde nochmals 1 ml Waschpuffer 1 auf die Säule gegeben und diese bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Für die Proteinreinigung erfolgten alle weiteren Schritte bei 4 °C. Zuerst wurde die Säule 5 mal mit 1 ml Waschpuffer 1 gewaschen (ohne Zentrifugation). Währenddessen erfolgte der Zellaufschluss, um das lösliche Protein zu erhalten. Der resultierende Zellrohextrakt wurde anschließend für 20 min bei 14.000 rpm und 4 °C (Eppendorfzentrifuge) zentrifugiert und der lösliche Proteinanteil in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Dieser wurde portionsweise auf die Säulenmatrix gegeben und anschließend die Matrix wieder 5 mal mit je 1 ml Waschpuffer 1 und weitere 5 mal mit je 1 ml Waschpuffer 2 (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) gewaschen. Danach folgten sieben Elutionsschritte mit je 600 µl Elutionspuffer (Waschpuffer 1 plus 150 mM Imidazol). Die Elutionsfraktionen wurden einzeln aufgefangen, ein Aktivitätstest durchgeführt und die Fraktionen einzeln dialysiert. Die Dialyse zum Entfernen des Imidazols aus der Proteinlösung wurde in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 bzw. pH 8 bei 4 °C durchgeführt. Die erste Dialyse erfolgte über Nacht, die zweite und dritte für jeweils eine Stunde mit frischem Puffer. Nach der Dialyse erfolgte die Proteinanalyse mit SDS-Page und nochmalige Aktivitätstests.

3.2.7.7 Affinitätsreinigung mit Strep-Tag (nach IBA-Protokoll)

Für die Aufreinigung von Proteinen mit Strep-Tag wurden 2 ml-Kunststoffsäulen (IBA) mit 1 ml Strep-Tactin-Sepharose gefüllt und abtropfen gelassen. Anschließend wurde die Sepharose 5 mal mit 1 ml Puffer W (Waschpuffer) gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe des aufzureinigenden Enzyms im Zellrohextrakt und weitere fünf Waschschriffe mit 1 ml Puffer W. Die Elution des Proteins wurde mit Puffer E (Elutionspuffer) (6 mal 0,5 ml) durchgeführt und alle Fraktionen gesammelt. Um zu kontrollieren, in welchem Eluat sich das Protein befindet, wurden alle Fraktionen mit SDS-PAGE und Aktivitätstest analysiert. Die Säule wurde nach der Elution mit 15 ml Puffer R (Regeneration) regeneriert und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Zusammensetzungen der Puffer sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Das in Puffer E zugesetzte EDTA wird nicht bei der Aufreinigung von Metalloproteinen zugegeben.

Tabelle 24: Zusammensetzung der Puffer für Affinitätsreinigung über Strep-Tag.

Puffer	Zusammensetzung
W	100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl
E	100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2,5 mM Desthiobiotin, (1 mM EDTA)
R	100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM HABA (Hydroxyazophenylbenzoic Acid)

3.2.8 Herstellung von L-*tert*-Leucin aus Trimethylpyruvat

Die Umsetzungen von Trimethylpyruvat zu L-*tert*-Leucin mit den Ganzzellkatalysatoren FDH-CB/LDH und Malic Enzyme/LDH wurden in Vorversuchen in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen mit 1 ml Reaktionsvolumen und zur Reaktionsoptimierung in einem STAT-Titrino 718 (Metrohm) durchgeführt. Als Stämme wurden *E. coli* JM109 pAM3.25/pAM10.1 und *E. coli* JM109 pAM5.22 aus Schüttelkolbenanzucht verwendet. Die pH-Werte der Ausgangslösungen von Malat und Trimethylpyruvat wurden mit 25 % NH₃ eingestellt. Zum Einstellen des pH-Wertes der Ausgangslösung von Natriumformiat wurde 100 % Ameisensäure verwendet.

Die Vorversuche wurden ausschließlich in Thermoschüttlern (Eppendorf) bei verschiedenen Temperaturen (25 °C bis 45 °C) sowie verschiedenen Anfangs-pH-Werten (pH 6 bis pH 8) und Zellkonzentrationen (20 bis 100 g/l Biofeuchtmasse) durchgeführt. Die Substratkonzentrationen von Trimethylpyruvat und Na-Formiat bzw. Malat, welche als Substrate für die kofaktorregenerierenden Enzyme eingesetzt wurden, wurden variiert (10 mM bis 3 M). Um eine Inhibierung der Reaktionen durch das entstehende CO₂ auszuschließen oder zu vermeiden, wurden die Deckel der Eppendorfreaktionsgefäße durchstoßen, um den Überdruck abzubauen.

Nach den Vorversuchen wurde der Reaktionsmaßstab vergrößert und die Umsetzungen von Trimethylpyruvat im STAT Titrino 718 durchgeführt. Die Untersuchungen zu pH- und Temperaturoptimum wurden nochmals unter besser kontrollierbaren Bedingungen mit Zellen von *E. coli* BW3110 pAM3.25/pAM10.1 aus einer Hochzell-dichtefermentation bzw. *E. coli* JM109 pAM5.22 aus Schüttelkolbenanzucht durchgeführt, die nach der Zellkultivierung bei -20 °C gelagert wurden. Musste der pH-Wert reguliert werden, wurde dies mit 1 M HCl durchgeführt. Als Standardkonzentrationen wurden für die Reaktionen 300 mmol/l Trimethylpyruvat und 450 mmol/l des jeweils zweiten Substrates für das kofaktorregenerierende Enzym eingesetzt. Das Reaktionsvolumen wurde mit 15 ml festgelegt. Die eingesetzte Biomasse war 1 g / 15 ml (67 g/l Biofeuchtmasse), wobei der Anteil an Feuchtigkeit von der Qualität der Zentrifugation der Biomasse nach der Zellernte abhängt. Es erfolgte keine Pufferung des Reaktionssystems. Erhöhungen der Trimethylpyruvatkonzentration zur Reaktionsoptimierung wurden ebenfalls bei gleichbleibender Biomassekonzentration durchgeführt

und sind detailliert unter Kapitel 4.1.9.3 aufgeführt. Die Auswertung erfolgte über HPLC (siehe Kapitel 3.2.10).

3.2.9 Herstellung von p-Chlorphenylethanol

Umsetzungen von p-Chloracetophenon zu p-Chlorphenylethanol mit den Ganzzellkatalysatoren ADH/FDH oder ADH/Malic Enzyme wurden in Vorversuchen in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen durchgeführt. Im Gegensatz zur Herstellung von L-*tert*-Leucin wurde für die Vorversuche ein Überkopffroller verwendet, da mit einem Zweiphasensystem gearbeitet wurde, bei dem die organische Phase am Gefäßboden auftrat und im Thermoschüttler die Durchmischung sehr gering war. Ein kontinuierlicher Druckausgleich war so nicht möglich. Als Standardkonzentration für p-Chloracetophenon wurde in den Vorversuchen 100 mmol/l eingesetzt, die Substrate für die kofaktorregenerierenden Enzyme wurden in fünffachem Überschuss zugegeben. Hinsichtlich der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Herstellung von L-*tert*-Leucin und bei Degussa durchgeführten Versuche wurde mit einem Anfangs-pH-Wert von pH 7 gearbeitet, allerdings wurden die Reaktionen gepuffert (0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7) durchgeführt. Untersuchungen erfolgten zur eingesetzten Zellkonzentration, zur Zugabe von Lösungsmitteln für die organische Phase und der Zugabe von Kofaktor NAD⁺ in verschiedenen Konzentrationen. Nach den Vorversuchen im Überkopffroller wurde wegen unvorteilhafter Durchmischung der Reaktionsansätze auf 10 ml-Reaktionsvolumina in 20 ml-Glasgefäßen (Innendurchmesser 24 mm) mit Schraubdeckel übergegangen, in denen die Durchmischung mittels Magnetrührer geregelt wird. Hier wurden die Substratkonzentrationen und die Zellkonzentrationen variiert sowie Untersuchungen zur Kofaktorzugabe durchgeführt. Die Kofaktoralösung (0,5 M NAD⁺) wurde zuvor auf pH 7 eingestellt. Die Reaktionen wurden mit HPLC ausgewertet.

3.2.10 HPLC-Analytik („high pressure liquid chromatography“)

Zur Analyse der Herstellung von L-*tert*-Leucin und p-Chlorphenylethanol wurden HPLC-Messungen durchgeführt. Die verwendete Apparatur wurde von SYKAM bezogen. Die Detektion der Substanzen erfolgte mittels einer D2-Lampe. Die genutzten Wellenlängen sowie die verwendeten Laufmittel und weitere Parameter sind in Tabelle 25 aufgeführt. Als Säule wurde in allen Fällen eine RP-18-Säule Lichrospher 100 (Refill 250 mm x 4 mm, 5 µm Partikelgröße des Säulenmaterials) verwendet.

Da nur Konzentrationen der zu detektierenden Substanzen bis zu 20 mM auswertbar waren, mussten die Proben vor der HPLC-Analyse in Abhängigkeit der zu erwartenden Konzentration verdünnt werden. Im Fall der Detektion von p-Chloracetophenon und p-Chlorphenylethanol wurden die Proben direkt nach der Probennahme 1 : 5 mit

Acetonitril verdünnt, um die zu detektierenden Substanzen aus dem denaturierten Zellprotein zu lösen und ein Einphasengemisch zu erstellen. Die anschließende Zentrifugation erfolgte in einer Eppendorffzentrifuge (RT, 13.000 rpm, 10 min). Vom Überstand wurden 50 µl mit 950 µl Acetonitril gemischt und davon 35 µl zur Detektion eingespritzt. Die Gesamtverdünnung betrug 1 : 100. Zur Detektion von Trimethylpyruvat wurden die Proben, wenn nötig in Laufpuffer verdünnt, und davon 50 µl mit 950 µl Methanol gemischt. Davon wurden ebenfalls 35 µl zur Detektion eingespritzt.

Tabelle 25: HPLC-Parameter für Analyse der Biokatalysen.

Reagenz/ HPLC-Parameter	L- <i>tert</i> -Leucin	Trimethylpyruvat	p-Chloracetophenon p-Chlorphenylethanol
Probenvorbereitung	Zellabtrennung Verdünnung Derivatisierung	Zellabtrennung Verdünnung	Vorverdünnung Zellabtrennung Verdünnung
Probenverdünnung	Laufpuffer	Methanol	100 % Acetonitril
Laufpuffer	50 % Methanol 50 % 12,5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2	50 % Methanol 50 % 12,5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2	490 ml VE H ₂ O entgast 510 ml Acetonitril 1 ml Trifluoressigsäure
Wellenlänge	230 nm	230 nm	215 nm
Flussrate	0,7 ml/min	0,7 ml/min	1 ml/min
Säulentemperatur	21 °C	21 °C	21 °C

Die Probenaufbereitung zur Detektion von L-*tert*-Leucin gestaltete sich aufwendiger. Zuerst musste der durch die Biokatalyse enthaltene Ammoniak durch Zugabe von 10 µl 6 M NaOH zu 10 µl unverdünntem Probenüberstand und ca. 8 h Eintrocknen der Probe in einer Vakuumzentrifuge (Speed-Vac Concentrator, SAVANT) entfernt werden, da dieser bei der folgenden Derivatisierung störend wirkt. Nach dem Eintrocknen der Probe wurde diese mit 20 µl VE H₂O gelöst und konnte für die Derivatisierung eingesetzt werden. Die Derivatisierung erfolgte mit *ortho*-Phtaldialdehyd (OPA), das mit primären Aminen reagiert. In Gegenwart eines Reduktionsmittels wird ein Isoindolderivat gebildet, das mit einem UV-Detektor an der HPLC detektiert werden kann.

In Tabelle 26 ist die Zusammensetzung eines Ansatzes zur Derivatisierung gezeigt. Das OPA-Reagenz setzte sich zusammen aus 50 mg *ortho*-Phtaldialdehyd, 50 µl 3-Mercaptopropionsäure (Reduktionsmittel), 4,5 ml Methanol und 500 µl 1 M Na-Borat-Puffer pH 9,5. Wurde ein Isoindolderivat gebildet, konnte das durch eine Blaufärbung

des Derivatisierungsansatzes unter UV-Licht beobachtet werden. Aufgrund der langen Probenvorbereitung für die Derivatisierung und des hohen Probendurchsatzes für die Analytik wurden Derivatisierungsreaktionen nur vereinzelt als Kontrollen durchgeführt und der Reaktionsverlauf ansonsten über die Abnahme des Trimethylpyruvat beobachtet.

Tabelle 26: Derivatisierungsansatz.

Komponente	Volumen	Bemerkung
1 M Na-Borat-Puffer pH 9,5	100 µl	mischen, dann OPA-Reagenz zugeben
Methanol	100 µl	
Probe	10 µl	
OPA-Reagenz	25 µl	mischen und 150 s bei RT inkubieren, dann Kaliumphosphatpuffer zugeben
12,5 mM Kaliumphosphatpuffer pH7,2	765 µl	

3.2.11 Hochzelldichtefermentation (nach Wilms et al., 2001)

Zum Erhalt einer ausreichenden Menge an Biofeuchtmasse mit rekombinant synthetisiertem Protein wurden Zellen mit Hochzelldichtefermentation kultiviert. Die Zellen wurden dazu aus 5 ml-Übernachtskulturen (LB-Medium mit Antibiotika) in 2x 200 ml Vorkulturmedium (siehe Tabelle 13 mit Antibiotika über Nacht angezogen und nach dem Autoklavieren des Batchmediums im Fermenter zusammen mit Glucose, MgSO₄ und Thiamin zugeben (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11). Die Fermentation erfolgte in einem 30 l-Fermenter (BIOENGINEERING, Fabrikat D 596). Zu Beginn der Fermentation betrug das Volumen des Batchmediums 8 l, während die Fermentationsbrühe bis zum Ende der Fedbatchphase ein Volumen bis zu 14 l erreichte.

Die Zellen wurden zunächst als Batchkultur bis zu einer OD₆₀₀ = 50 und dem vollständigen Verbrauch der Glucose angezogen (ca. 22 h). Anschließend wurde die Fedbatchphase durch Zugabe von Feed I und Feed II sowie die Geninduktion durch Zugabe von 0,2 % Rhamnose im Fermenter gestartet. Die Zugabe von Feed I und Feed II erfolgte dazu exponentiell. Der Sauerstoffeintrag wurde durchgehend mittels der Rührerdrehzahl geregelt, wobei ein Sauerstoffanteil von gelöstem Sauerstoff im Medium von 50 % nicht unterschritten werden sollte. Der pH-Wert des Mediums wurde mit 25 % NH₃ geregelt und lag zwischen pH 6,8 und pH 7,2 während der gesamten Fermentation. Während der Fedbatchphase gebildeter Schaum im Fermenter wurde manuell mit Antischaummittel degeneriert.

Die Probennahme, welche die Messung der OD₆₀₀ und die Ermittlung der spezifischen Aktivität nach der Geninduktion umfasste, erfolgte alle zwei Stunden, um bei Abnahme der Enzymaktivität die Fermentation rechtzeitig stoppen zu können. Der Abbruch erfolgte durch Ernte der Zellen und Pelletierung der Biofeuchtmasse mit einem Separator (CEPRA Z41G der Carl Padberg GmbH) bei 20.000 rpm. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20 °C.

4 Ergebnisse

4.1 Konstruktion von Ganzzellkatalysatoren

Ziel dieser Arbeit war es, Biokatalysatoren aus ganzen Zellen zu entwickeln, die zur enantioselektiven reduktiven Aminierung bzw. Reduktion von Ketoverbindungen zu den korrespondierenden Aminosäuren bzw. sekundären Alkoholen mit Hilfe eines Kofaktors (NAD(P)H) eingesetzt werden können, um im Folgenden ein technisches Verfahren bzw. eine Reaktionsplattform zu etablieren. Der Ganzzellkatalysator sollte dazu über ein Enzym für die Reduktion (z. B. Aminosäuredehydrogenase, ADH) und ein Enzym für die Regenerierung des Kofaktors NAD(P)H verfügen. Verschiedene Ganzzell- und Enzymkatalysatoren mit Kofaktorregenerierung sind bereits beschrieben (Bommarius et al., 1994; Wilberg et al., 1997; Krix et al., 1997; Hummel, 1999; Gröger et al., 2002; Hummel et al., 2003; van Beilen et al., 2003, Galkin et al., 1995). Für die Reduktionsreaktionen standen Leucindehydrogenase (LDH) aus *B. cereus* und zwei ADHs aus *R. erythropolis* DSM 43297 und *A. paraffineus* zur Verfügung. Für die Kofaktorregenerierung sollten die NAD⁺-abhängigen FDHs aus *C. boidinii*, *M. vaccae* N10 und *M. extorquens* AM1 sowie Malic Enzyme aus *E. coli* in Bezug auf ihre Eignung verglichen werden. Die Expression und Koexpression der entsprechenden Gene wurde dabei mit Vektoren mit Rhamnose-induzierbaren Promotoren durchgeführt (Stumpp et al., 2000). Im weiteren Verlauf sollen als erstes kurz die Vektoren mit den verschiedenen Genen und deren Konstruktion für die Ganzzellkatalysatoren beschrieben werden und anschließend auf die Expression der Gene einzeln und koexprimiert eingegangen werden. Danach werden die einzelnen Ganzzellkatalysatoren genauer charakterisiert und miteinander verglichen.

4.1.1 Herstellung der Vektoren mit Formiatdehydrogenase-Genen

Die Gene der für die Kofaktorregenerierung im Ganzzellkatalysator zur Verfügung stehenden FDHs stammen ursprünglich aus *C. boidinii* (*fdhCB*, Enzym: FDH-CB), *M. vaccae* N10 (*fdhMV*, Enzym: FDH-MV) und *M. extorquens* AM1 (*fdh1A* und *fdh1B*, Enzym: FDH-ME1). Das Gen für FDH-CB wurde direkt mit PCR aus der Plasmid-DNA pFDH-C23S/C262A mit Hilfe der Oligonukleotide s3723 und s3716 amplifiziert, die dem Gen eine *Nde*I- bzw. *Aat*II-Schnittstelle für Klonierungen hinzufügten. Das Gen wurde zuvor an zwei Stellen durch sitespezifische Mutagenese verändert, wodurch die Cysteinreste C23 und C262 durch Serin bzw. Alanin ersetzt wurden. Die Cysteinreste galten als Grund für die Inaktivierung des Enzyms durch

oxidativen Stress. Als Modell dieser Mutagenese diente dazu die 3D-Enzymstruktur von *Pseudomonas*-FDH und verwandter FDHs. Die resultierende optimierte FDH-CB ist stabiler gegen oxidativen Stress, der durch Cu^{2+} -Ionen ausgelöst wird. Die kinetischen Eigenschaften wie Temperaturverhalten und pH-Optimum sowie die K_m -Werte gegenüber NAD^+ und Formiat änderten sich gegenüber dem Wildtyp-Protein nicht signifikant (Slusarczyk et al., 2000). Da die Kofaktorregenerierung mit FDH-CB im Rahmen des BMBF-Projektes von Beginn an im Vordergrund stand und *fdhMV* erst gegen Ende der Arbeit zur Verfügung stand, wurden die meisten Untersuchungen mit dem Gen *fdhCB* bzw. dem Protein FDH-CB durchgeführt.

FDH-MV wurde bereits als kofaktorregenerierendes Enzym von Galkin et al. (1995) beschrieben. Aufgrund der besseren Stabilität gegenüber organischen Substanzen wie aromatischen Alkoholen stellte es eine mögliche Alternative zur FDH-CB dar. Das Gen von FDH-MV *fdhMV* wurde synthetisch hergestellt und so an die Codon-Usage von *E. coli* angepasst (nicht publiziert). An drei Positionen wurde zudem die Proteinsequenz verändert (C6A, C146S und C256V). Das Gen wurde auf dem Plasmid 050544pPCR-Script von Degussa zur Verfügung gestellt.

Tabelle 27: Vektoren mit Formiatdehydrogenase-Genen.

Formiatdehydrogenase	Klonierungsvektor	Restriktionsenzyme	Zielpiasmid
<i>fdhCB</i>	pJOE4580.2	<i>NdeI/AatII</i>	pAM3.25
<i>fdhMV</i>	pWA21	<i>NdeI/HindIII</i>	pAM149.1
<i>fdh1BA</i>	pWA21	<i>MunI/HindIII</i>	pAM153.16
<i>fdh1A</i>	pHWG640.12	<i>NdeI/HindIII</i>	pAM154.1
<i>fdh1B</i>	pAM153.16	<i>ApaI/HindIII</i>	pAM155.1
<i>fdh1AB</i>	pAM153.16/pAM158.2	<i>BglII/BamHI</i>	pAM159.4

FDH-ME1 wurde für die Kofaktorregenerierung nur in Betracht gezogen, wenn Expression und Aktivitäten vergleichbar waren mit den anderen beiden FDHs unter Kontrolle des Rhamnosepromotors. FDH-ME1 wurde bereits als Wildtyp-Protein beschrieben (Laukel et al., 2003 und Chistoserdova et al., 2004) und ebenfalls für die Anwendung im Ganzzellkatalysator synthetisch hergestellt (nicht publiziert). Die Gene der beiden heterologen Untereinheiten von FDH-ME1 *fdh1A* und *fdh1B* wurden auf dem Plasmid 042645pPCR-Script in Form eines Operons zur Verfügung gestellt und im Folgenden - wenn als Operon vorliegend - als *fdh1BA* bezeichnet. Die für die Expression der FDHs hergestellten Vektoren sind in Tabelle 27 mit den jeweiligen Restriktionsenzymen für die Klonierungen und den Klonierungsvektoren zusammengefasst. Die Gene der heterologen Untereinheiten von FDH-ME1 wurden zusätzlich

zur Klonierung in Form eines Operon auch noch einzeln (*fdh1A* und *fdh1B*) in kompatible Plasmide inseriert. Bei pAM153.16 sind die Gene der FDH-ME1-Untereinheiten so nach dem Rhamnosepromotor angeordnet, dass die kleinere β -Untereinheit (*fdh1B*) vor der größeren α -Untereinheit (*fdh1A*) exprimiert wird, bei pAM159.4 sind die Gene für die Untereinheiten von *fdh1* vertauscht worden. Bis auf das Plasmid pAM154.1 verfügen alle anderen Vektoren über ein β -Lactamase-Gen (Resistenz gegen Ampicillin), pAM154.1 codiert eine Resistenz gegen Chloramphenicol.

4.1.2 Herstellung der Vektoren mit dem Gen *ldh*

LDH aus *B. cereus* DSM 396 wurde bereits von Stoyan et al. (1997), Krix et al. (1997) und Ansorge und Kula (2000) beschrieben und sollte als Aminosäuredehydrogenase für die Ganzzellkatalyse von L-*tert*-Leucin aus Trimethylpyruvat eingesetzt werden. Das *ldh*-Gen wurde direkt aus Plasmid-DNA von pLeu2 amplifiziert. Die für die Genamplifikationen verwendeten Oligonukleotide s3717 und s3718 trugen zusätzlich Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen *Bfr*I (Isochizomer von *Afl*III, siehe Abbildung 6) und *Pst*I. Das synthetisierte PCR-Fragment wurde mit Hilfe der genannten Restriktionsenzyme vor das Gen des Malic Enzyme *sfcA* in das Plasmid pJOE4625.1 inseriert und als pAM5.22 bezeichnet. Dieser Vektor konnte direkt in *E. coli* JM109 oder *E. coli* BW3110 zur Synthese der an der Biokatalyse beteiligten Enzyme verwendet werden (LDH/ME-Ganzzellkatalysator). Für die Kofaktorregenerierung mit FDH-CB oder FDH-MV wurde *ldh* in ein pACYC184-Derivat (Chang und Cohen, 1978) mit im Vergleich zu pBR322-Derivaten etwas geringerer Kopienzahl und Chloramphenicol-Resistenz (Donorplasmid pHWG640.12) inseriert und das Zielplasmid als pAM10.1 bezeichnet. Die Plasmidkarten pAM5.22 und pAM10.1 sind in Abbildung 6 gezeigt.

Durch Transformation eines *E. coli*-Stammes mit den Plasmiden pAM10.1 und pAM3.25 (*fdhCB*) konnten beide Gene unter dem Rhamnose-Promotor als Zwei-Plasmid-System koexprimiert und die Zellen für die Ganzzellkatalyse eingesetzt werden.

Da die Koexpression von *sfcA* und *ldh* auf einem Plasmid gut funktionierte (siehe Kapitel 4.1.7.2), erfolgte zudem die Klonierung von *ldh* und *fdhCB* auf ein gemeinsames Plasmid. Das Gen *ldh* wurde dazu nochmals mit PCR amplifiziert (Oligonukleotide s3918 und s3919), wobei beide Oligonukleotide Restriktionsschnittstellen für *Aat*II besitzen. Über die *Aat*II-Schnittstellen erfolgte die Insertion von *ldh* hinter das *fdhCB*-Gen auf pAM3.25, sodass beide Gene unter einem Rhamnosepromotor exprimiert werden. Damit lag das Gen für FDH-CB mit der gegenüber LDH geringeren spezifischen Aktivität direkt hinter den Rhamnose-Promotor und *ldh* mit eigener Ribosomenbindestelle hinter dem optimierten *fdhCB*-Gen. Diese Reihenfolge war sinnvoll,

da ein Gen an zweiter Stelle eines Operons gewöhnlich geringer exprimiert wird und FDH-CB von vornherein eine niedrigere Enzymaktivität zeigt. Das Zielplasmid mit dem *fdhCB/ldh*-Operon wurde als pAM92.1 bezeichnet und ist in Abbildung 7 dargestellt.

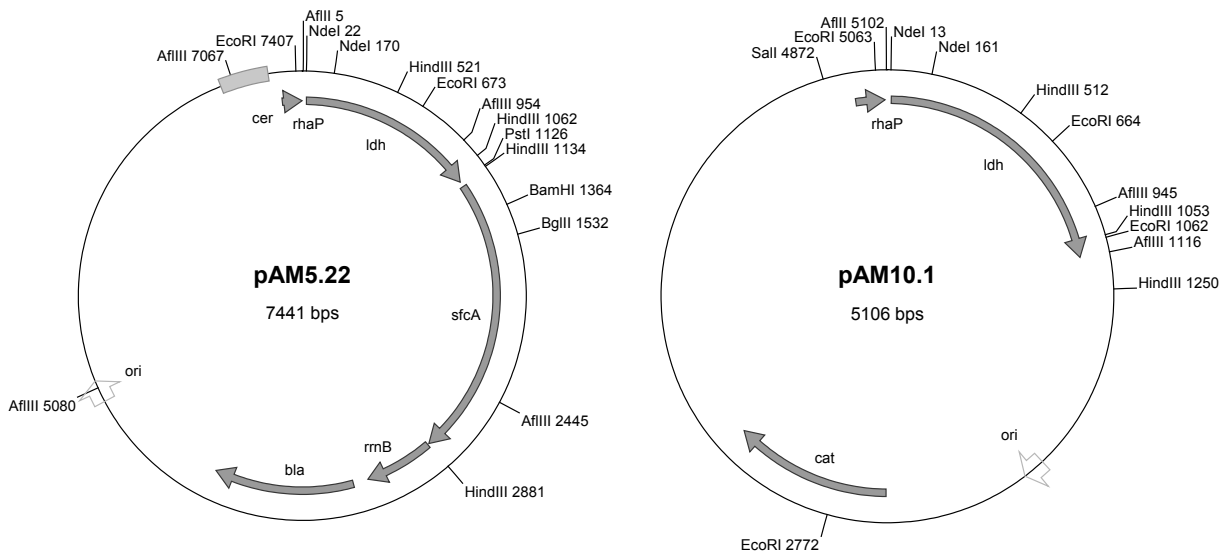


Abbildung 6: Vektoren für LDH-Produktion: pAM5.22 mit dem *ldh/sfcA*-Operon und pAM10.1 mit *ldh*.

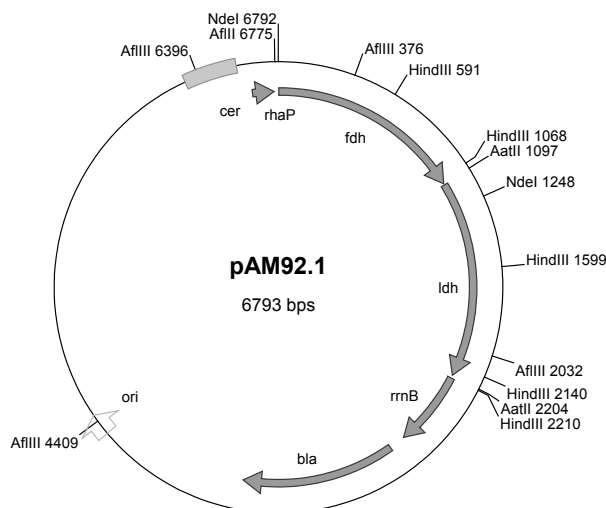


Abbildung 7: Vektor pAM92.1 mit *fdhCB* und *ldh* als Operon hinter dem Rhamnosepromotor.

4.1.3 Expression der Gene *fdhCB* und *fdhMV*

Die Expression von *fdhCB* wurde in *E. coli* JM109 pAM3.25 und *E. coli* BW3110 pAM3.25 untersucht. Dazu wurden die Bakterien nach etwa 2 h Inkubation bei 37 °C und einer $OD_{600} \sim 0,4$ mit 0,2 % L-Rhamnose induziert und weiter bei 30 °C inkubiert. Die Probennahme erfolgte nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h und 24 h Induktion. Der Vergleich der Expression erfolgte durch Bestimmung der spezifischen Aktivität und durch SDS-Gel-Analyse.

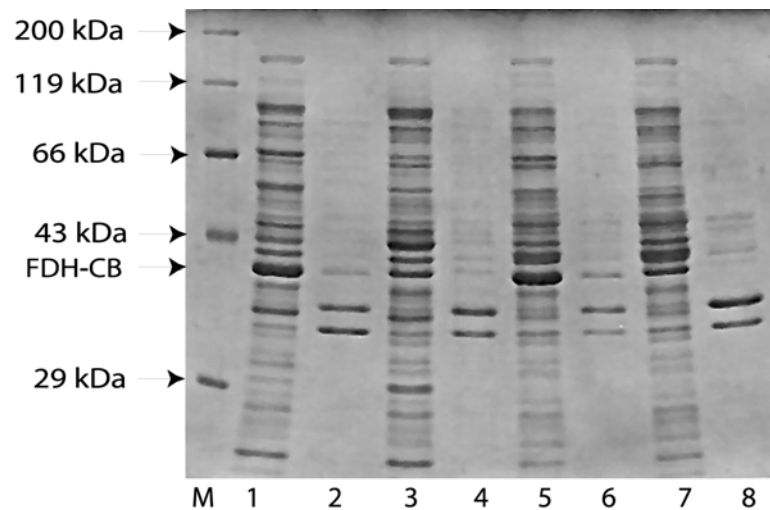


Abbildung 8: SDS-PAGE-Analyse der Expression von *fdhCB* in *E. coli* JM109 pAM3.25 nach 6 h Induktion und *E. coli* BW3110 pAM3.25 nach 16 h mit 0,2 % Rhamnose bei 30 °C. Es wurden lösliche (ungerade Spuren) und unlösliche Proteinfractionen (gerade Spuren) getrennt aufgetragen. Zur Kontrolle der Genexpression wurden die korrespondierenden Proteinextrakte der nicht mit Rhamnose induzierten Ansätze zum Vergleich aufgetragen. Das gebildete Protein FDH-CB ist markiert. M: Standardproteinmarker ROTH; 1, 2: *E. coli* JM109 pAM3.25 induziert; 3, 4: *E. coli* JM109 pAM3.25 nicht induziert; 5, 6: *E. coli* BW3110 pAM3.25 induziert; 7, 8: *E. coli* BW3110 pAM3.25 nicht induziert.

In Abbildung 8 ist die Expression von *fdhCB* in *E. coli* JM109 pAM3.25 nach 6 h und in *E. coli* BW3110 pAM3.25 nach 16 h abgebildet. Das kalkulierte Molekulargewicht von FDH-CB beträgt 40,3 kDa. Als Kontrolle der *fdhCB*-Expression wurden auch Zellrohextrakte getrennt nach löslicher und unlöslicher Proteinfraction (Trennung durch Zentrifugation in Tischzentrifuge, 13.200 rpm, 4 °C, 15 min) von nichtinduzierten *E. coli* JM109 pAM3.25 und *E. coli* BW3110 pAM3.25 aufgetragen. Die Expression von *fdhCB* (Spur 1 und Spur 5) in beiden Stämmen ist verglichen mit anderen, heterolog exprimierten Genen gering und macht laut SDS-Gel-Analyse etwa 5 - 10 % des Zellproteins aus. Eine genaue Abschätzung des Anteils bzw. der Konzentration von FDH-CB bezüglich des Zellproteins anhand der SDS-PAGE kann jedoch nicht erfol-

gen, da die Proteinbande ein *E. coli*-eigenes Protein überlagert (Vergleich induziert/nichtinduziert bei Spuren 1 und 3).

Die höchste spezifische Enzymaktivität wurde in *E. coli* BW3110 pAM3.25 nach 16 h Induktion (Spur 5) bei 30 °C mit 0,7 bis 1,1 U/mg erreicht und entspricht in etwa der spezifischen Aktivität des Wildtypenzym im Zellrohextrakt, wie von Slusarczyk et al. (2000) bestimmt. In *E. coli* JM109 pAM3.25 (Spur 1) wurde die höchste spezifische Aktivität mit 0,25 U/mg ermittelt und liegt damit unter 30 % der Expression in *E. coli* BW3110 pAM3.25. Bei den Kontrollansätzen ohne 0,2 % Rhamnose konnten keine Formiatdehydrogenase-Aktivitäten ermittelt werden.

In Abbildung 9 ist die Kinetik der Induktion durch Darstellung der spezifischen Aktivitäten von FDH-CB dargestellt. Induktionskinetiken wurden so durchgeführt, dass alle Proben bis auf den 16 h-Wert jeweils aus einem Schüttelkolben erfolgten. Für die Probe nach 16 h Induktion wurde eine separate Kultur induziert. Es können dadurch Schwankungen in den spezifischen Aktivitäten zwischen den Proben nach 8 h, 16 h und 24 h auftreten, wobei die Probe nach 16 h Induktion aufgrund experimenteller Schwankungen mitunter stark abweicht (zu hohe oder zu niedrige Aktivität im Vergleich zu den spezifischen Aktivitäten nach 8 h und 24 h). Während bei Induktion von *E. coli* JM109 pAM3.25 nach 8 h kaum noch Veränderungen der spezifischen Aktivität auftreten, verdreifacht sich die spezifische Enzymaktivität von FDH-CB bei Expression von *fdhCB* in *E. coli* BW3110 pAM3.25 zwischen 8 h und 16 h Induktion.

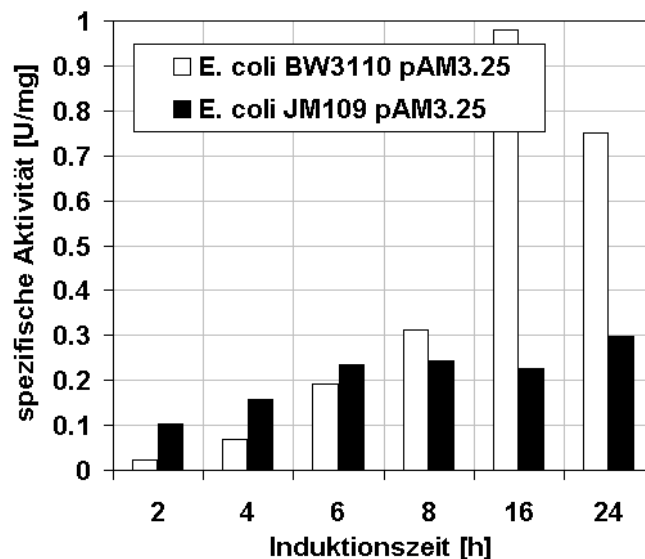


Abbildung 9: Spezifische Aktivitäten von FDH-CB bei Expression von *fdhCB* in *E. coli* JM109 pAM3.25 und *E. coli* BW3110 pAM3.25 bei 30 °C Induktionstemperatur und Induktion mit 0,2 % Rhamnose. Die Induktion mit 0,2 % Rhamnose und der Temperaturshift auf 30 °C erfolgten nach zwei Stunden Wachstum der Kulturen bei 37 °C, die aus Übernachtskulturen 1 : 100 verdünnt angeimpft wurden.

In Hinblick auf eine Koexpression von *fdhCB* mit einem Amindehydrogenase-Gen oder einem Alkoholdehydrogenase-Gen zur Kofaktorregenerierung, wurde aufgrund der niedrigen Enzymaktivitäten angestrebt, *fdhCB* entweder unter einem eigenen Rhamnosepromotor auf einem Plasmid mit hoher Kopienzahl zu exprimieren (pAM3.25) oder im Operon (zum Beispiel mit *ldh*, siehe Abbildung 7, pAM92.1) unmittelbar hinter einem Rhamnosepromotor zu inserieren, um die niedrige Enzymaktivität von FDH-CB zumindest teilweise auszugleichen. Letztere Möglichkeit hat den Vorteil, den Expressionsstamm mit nur einem Antibiotikum zu belasten.

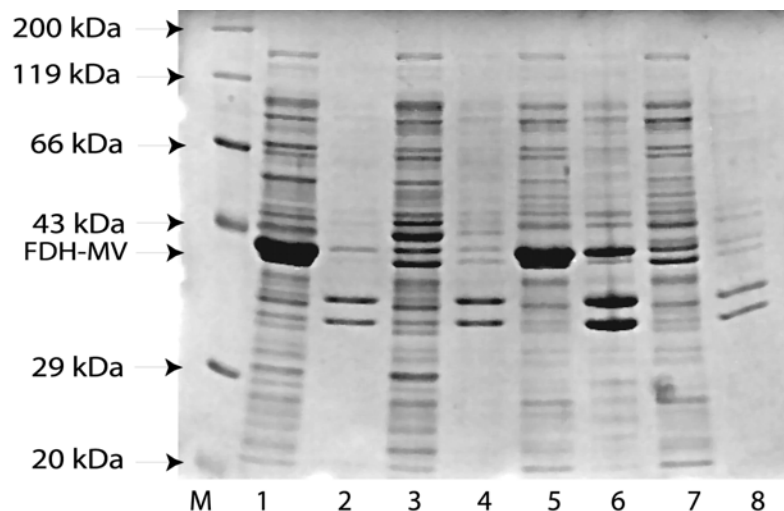


Abbildung 10: SDS-Gelanalyse der Induktion des *fdhMV*-Gens in *E. coli* JM109 pAM149.1 (nach 6 h) und *E. coli* BW3110 pAM149.1 (nach 16 h) mit und ohne Induktion der Genexpression mit 0,2 % Rhamnose bei 30 °C. Es wurden die löslichen (Spuren 1, 3, 5, 7) und unlöslichen (Spuren 2, 4, 6, 8) Proteinfractionen getrennt aufgetragen. Das gebildete Protein ist durch einen Pfeil markiert. M: Standardmarker von Roth; 1 + 2: *E. coli* JM109 pAM149.1 induziert; 3 + 4: *E. coli* JM109 pAM149.1 nicht induziert; 5 + 6: *E. coli* BW3110 pAM149.1 induziert; 7 + 8: *E. coli* BW3110 pAM149.1 nicht induziert.

Mit FDH aus *M. vaccae* N10, deren Gen *fdhMV* auf pAM149.1 vorlag, wurden ebenfalls Induktionskinetiken in *E. coli* JM109 pAM149.1 und *E. coli* BW3110 pAM149.1 durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten und der Anteil an löslichem Zellprotein waren bei Einzelexpression im Vergleich zu FDH-CB mehr als doppelt so hoch. Es konnten spezifische Aktivitäten zwischen 1,3 und 1,6 U/mg Gesamtprotein nach 6 h Induktion mit L-Rhamnose in *E. coli* JM109 pAM149.1 und nach 24 h Induktion in *E. coli* BW3110 pAM149.1 erreicht werden. In Abbildung 10 ist ein repräsentatives Ergebnis der Proteinauftrennung mittels SDS-Page dargestellt.

In Abbildung 10 ist die deutlich höhere Expression des *fdhMV*-Gens in *E. coli* JM109 pAM149.1 und *E. coli* BW3110 pAM149.1 im Vergleich zur Expression von *fdhCB* z.

B. in *E. coli* JM109 pAM3.25 anhand einer wesentlich stärkeren Proteinbande unterhalb von 43 kDa zu erkennen (Markierung durch Pfeil in Abbildung 10), wobei das Enzym nach der Protein-Sequenz ein kalkuliertes Molekulargewicht von 44,1 kDa besitzt. Das anhand des SDS-Gels ermittelte Molekulargewicht liegt allerdings bei etwa 41 kDa bis 42 kDa. Die Proteinbande von FDH-CB in Abbildung 8 ist wesentlich weniger intensiv, zeigt aber auch keine Bildung von Einschlusskörpern, die bei Expression von *fdhMV* in *E. coli* BW3110 pAM149.1 in geringen Mengen gebildet werden (siehe Abbildung 10, Spur 6). Das Gen *fdhMV* führt neben der Synthese von großen Mengen Protein auch zu höheren spezifischen Aktivitäten. Bei den nichtinduzierten Kontrollansätzen konnten keine Aktivitäten nachgewiesen werden.

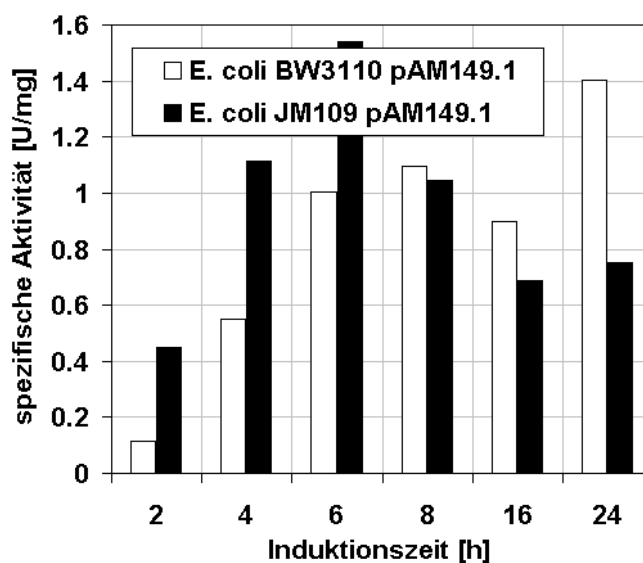


Abbildung 11: Induktionskinetik von *fdhMV* in *E. coli* BW3110 pAM149.1 und *E. coli* JM109 pAM149.1. Die Induktion des Rhamnosepromotors erfolgte mit 0,2% Rhamnose bei 30°C. Die Kinetik wurde aus der Mittelung der Versuchsergebnisse von vier Versuchen zusammengestellt.

In Abbildung 11 ist eine repräsentative Induktionskinetik von *fdhMV* in *E. coli* JM109 pAM149.1 und *E. coli* BW3110 pAM149.1 dargestellt. Dabei kommt es in *E. coli* JM109 pAM149.1 zunächst zu einer Zunahme der spezifischen Aktivität bis 6 h nach Induktion des Promotors und im weiteren Verlauf zu einer Abnahme der Enzymaktivität auf etwa 0,8 U/mg nach 16 h, die dann bis 24 h nach der Induktion stabil bleibt. Warum ein derartiger Verlust der spezifischen Aktivität auftritt, ist unklar. In *E. coli* BW3110 ist die Expression von *fdhMV* auf pAM149.1, wie auch in den SDS-Gelen gezeigt wird, etwas geringer. Die spezifische Aktivität nimmt kontinuierlich bis zum Zeitpunkt von 24 h der Induktion zu, übersteigt aber nicht die maximale Aktivität der Expression in *E. coli* JM109 pAM149.1 nach 6 h Induktion. Wie schon bei der Induktionskinetik von *fdhCB* beschrieben, können zwischen dem 8 h-, 16 h- und 24 h-Wert

der spezifischen Aktivität experimentelle Schwankungen durch Induktion einer separaten Kultur für die Probe nach 16 h Induktion auftreten (durch Schüttelkolben, Temperaturschwankungen, Anzahl der Probennahmen aus einer Kultur).

Aufgrund der höheren spezifischen Aktivität und der höheren Stabilität gegenüber einer Vielzahl organischer Verbindungen wäre FDH-MV geeigneter als kofaktorregenerierendes Enzym im Vergleich zu FDH-CB. Dennoch wurden die meisten Ergebnisse mit *fdhCB* erarbeitet, da *fdhMV* erst gegen Ende der Arbeit zur Verfügung stand. Die Ergebnisse zur Koexpression von *fdhCB* und *fdhMV* mit *adhRE* sind unter Kapitel 4.2.5 zusammengestellt. Ebenso wird auf die Umsetzung von p-Chloracetophenon mit beiden Formiatdehydrogenasen als kofaktorregenerierende Enzyme in Kombination mit ADH-RE genauer eingegangen (siehe Kapitel 4.2.9.1 und 4.2.9.2).

4.1.4 Expression von *fdh1* aus *M. extorquens* AM1

FDH-ME1 stellt als Wolfram-abhängige FDH aus einem α -Proteobakterium eine Herausforderung bei Überexpression in einem γ -Proteobakterium dar. Wie von Laukel et al. (2003) und Chistoserdova et al. (2004) beschrieben, besitzt *M. extorquens* AM1 neben der untersuchten FDH-ME1 noch zwei weitere FDHs, die alle drei eine Rolle im C1-Stoffwechsel spielen. Für die Expression von *fdh1A* und *fdh1B* in *E. coli* JM109 wurden Ein- und Zwei-Plasmid-Systeme miteinander verglichen (pAM153.16 und pAM154.1/ pAM155.1, siehe Tabelle 27).

Wie in der genannten Literatur beschrieben wird, macht es bei diesem Enzym offensichtlich keinen Unterschied, ob die Enzympräparation unter oxidischen oder anoxischen Bedingungen erfolgt, sodass für die Geninduktion zuerst die üblichen Anzuchtbedingungen gewählt wurden (50 ml LB-Medium im 500 ml-Kolben und nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C Temperaturshift auf 30 C und Induktion der Genexpression mit 0,2 % Rhamnose ohne weitere Zusätze). Die Gene von FDH-ME1 *fdh1A* und *fdh1B* konnten dabei sowohl mit dem Ein- als auch mit dem Zwei-Plasmid-System in *E. coli* JM109 exprimiert werden. Verglichen mit den Genen der beiden FDHs aus *C. bovidinii* und *M. vaccae* N10 war die Expression vergleichsweise gering aber in der SDS-PAGE deutlich sichtbar (vergleiche Abbildung 8, Abbildung 10 und Abbildung 12). Wurden beide Untereinheiten von *fdh1* in *E. coli* JM109 pAM154.1/pAM155.1 getrennt auf zwei Plasmiden induziert, war die Expression etwas höher als bei Induktion in Form eines Operons (siehe Abbildung 12, Spuren 2 bis 4), es konnte aber keine Aktivität gemessen werden. Das in *E. coli* JM109 pAM154.1/pAM155.1 rekombinant produzierte Protein FDH-ME1 wurde zu einem signifikanten Anteil in Form von Einschlusskörpern gebildet, während bei Expression

der Gene *fdh1A* und *fdh1B* als Operon in *E. coli* JM109 pAM153.16 die Bildung von Einschlusskörpern deutlich geringer war.

Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten von FDH-ME1 in *E. coli* JM109 pAM153.16 oder *E. coli* JM109 pAM154.1/pAM155.1 ohne Zugabe weiterer Komponenten zur Induktion außer Rhamnose zeigte, dass die Unterschiede minimal sind. Die spezifische Aktivität von FDH-ME1 lag bei Induktion von *E. coli* JM109 pAM153.16 zwischen 0,048 und 0,061 U/mg und bei Induktion von *E. coli* JM109 pAM154.1/pAM155.1 zwischen 0,052 und 0,065 U/mg (jeweils 7 h Induktion bei 30 °C).

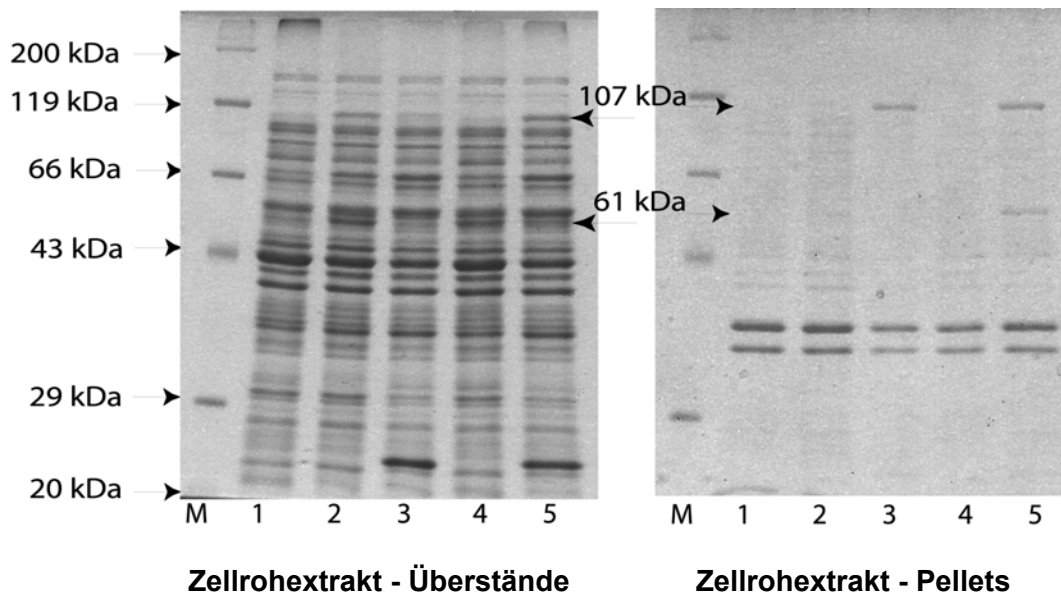


Abbildung 12: SDS-PAGE von Zellrohextrakten von induzierten *E. coli* JM109 mit und ohne Plasmid(e) mit *fdh1*. Die Induktion erfolgte für 7 h aerob bei 30 °C mit 0,2 % Rhamnose. Spuren: M: Standardmarker von Roth; 1: *E. coli* JM109; 2: *E. coli* JM109 pAM153.16; 3: *E. coli* JM109 pAM154.1; 4: *E. coli* JM109 pAM155.1; 5: *E. coli* JM109 pAM154.1/pAM155.1. Die Molekulargewichte des Standardmarkers sind mit Pfeilen markiert (links) und in kDa angegeben. Die beiden Untereinheiten von FDH-ME1 sind 107 kDa und 61 kDa groß und der Abbildung ebenfalls mit Pfeilen markiert.

Der erste Schritt zur Optimierung der Expression von FDH-ME1 wurde durch Zugabe von 0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ zum Kulturmedium bei Induktion von *E. coli* JM109 pAM153.16 und *E. coli* JM109 pAM154.1/pAM155.1 sowie als Kontrolle von *E. coli* JM109 ohne Plasmid untersucht. Die Bedingungen waren ebenfalls 30 °C, 0,2 % Rhamnose und 7 h Induktionszeit. Ein Ergebnis ist dazu in Abbildung 13 dargestellt.

Im Vergleich zu Kulturen ohne Zugabe von 0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ konnte die spezifische Aktivität von FDH-ME1 um bis zu 40 % gesteigert werden und lag sowohl bei Expression in *E. coli* JM109 pAM153.16 als auch in *E. coli* JM109

pAM154.1/pAM155.1 bei rund 0,085 U/mg. In *E. coli* JM109 ohne Plasmid konnte nach Zugabe von $0,3 \mu\text{M Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ebenfalls FDH-Aktivität gemessen werden mit 0,002 U/mg. Auch unter diesen Bedingungen waren die spezifischen Aktivitäten von FDH-ME1 geringer im Vergleich zu FDH-CB mit bis zu 1 U/mg und FDH-MV mit bis zu 1,7 U/mg im Zellrohextrakt. Die erreichten Werte lagen zudem noch unter den von Laukel et al. (2003) publizierten Daten von nichtrekombinant produzierter FDH-ME1 bei Induktion durch 1 % Methanol. Dessen Daten zufolge erreichte man mit dem induzierten Gen 0,1 bis 0,2 U/mg im Zellrohextrakt in Abhängigkeit der Zugabe von Wolfram und/oder Molybdän.

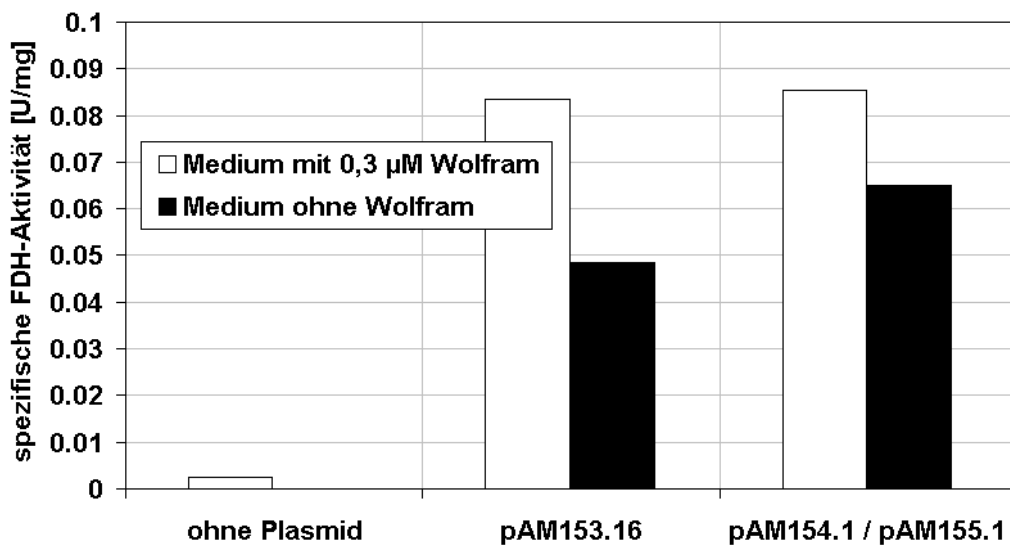


Abbildung 13: Spezifische FDH-Aktivität nach 7 h Induktion bei 30 °C von *E. coli* JM109 pAM153.16 und *E. coli* JM109 pAM154.1/pAM155.1 mit 0,2 % Rhamnose mit und ohne Zugabe von $0,3 \mu\text{M Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$. Als Kontrolle wurde *E. coli* JM109 ohne Plasmid mit 0,2 % Rhamnose mit und ohne Zugabe von $0,3 \mu\text{M Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ induziert.

Weiterhin wurde der Einfluss von Molybdän ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ in einer Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$) in Kombination mit $0,3 \mu\text{M Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ bei Induktion von *fdh1* untersucht. Im Vergleich zu Kulturen, die mit Wolframionen supplementiert wurden, konnte jedoch keine Steigerung der spezifischen Aktivität gemessen werden. Da das Enzym als Wolfram- und nicht als Molybdänabhängig charakterisiert wurde und zudem Wolfram- und Molybdänatome um den Einbau in das Enzym konkurrieren (Makdessi et al., 2001), wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen auf die Zugabe von $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ zur Induktion von *fdh1* verzichtet.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Bildung aktiven Enzyms im anaeroben Milieu ebenfalls mit und ohne den in Tabelle 28 aufgeführten Zusätzen besser funktioniert. Die Zusätze wurden einzeln oder in Kombination mit anderen Zusätzen zugegeben,

um die optimale Induktion und Expression zu ermitteln. Für die anaerobe Induktion wurden zuvor 100 ml-Mediumflaschen (mit Magnetrührstäbchen für die Durchmischung) sterilisiert, anschließend das Kulturmedium (LB-Medium mit Antibiotika, 0,2 % Rhamnose, eventuell weitere Zusätze) und das Inokulum zugeben und zuletzt die Gefäße komplett mit LB-Medium (mit Antibiotika) aufgefüllt und mit dem Flaschendeckel verschlossen. Natriumsulfit oder Natriumselenit zur Bindung des gelösten Sauerstoffs im Medium wurden nicht zugesetzt, so dass kein vollkommen anaerober sondern ein semianaerober Zustand vorlag. Die Induktion wurde bei 30 °C und 300 rpm auf einem Magnetrührblock (Variomag) durchgeführt, wobei zwischen den Reaktionsgefäßen und dem Magnetrührblock noch eine leere Petrischale positioniert wurde, um die vom Magnetrührblock entstehende Wärme nicht auf die Kulturen zu übertragen.

Die semianaerobe Expression von *fdh1* erfolgte zunächst mit *E. coli* JM109 pAM154.1/ pAM155.1, da erwartet wurde, dass mit dem Zwei-Plasmid-System wie auch bei aerober Induktion beide Gene unter einem eigenen Promotor besser exprimiert werden. Die Zusammensetzung der Medien der semianaeroben Anzucht von *E. coli* JM109 pAM154.1/pAM155.1 ist in Tabelle 28 zusammengefasst. Die Wolframkonzentration von 0,1 mM wurde hier gewählt, um eine mögliche Verbesserung der Expression zu erreichen. Die Konzentration von NaNO₃ wurde einer Publikation zur Untersuchung der FDHs aus *E. coli* entnommen (Wang und Gunsalus, 2003). Die Konzentration von FeSO₄ war an die Publikation von Laukel et al. (2003) angelehnt.

Tabelle 28: Produktion von FDH-ME1 durch Induktion von *E. coli* JM109 pAM154.1/ pAM155.1 unter semianaeroben Bedingungen: Zusätze und Kombinationen der Zusätze zum LB-Medium (mit Antibiotika).

Ansätze/ Zusätze	1	2	3	4	5	6	7
Rhamnose 0,2 %	+	+	+	+	+	+	+
Wolfram 0,1 mM	-	+	+	+	+	+	+
NaNO ₃ 5 mM	-	-	+	+	+	-	+
Na-Formiat 10 mM	-	-	-	+	+	+	-
FeSO ₄ 0,1 mM	-	-	-	-	+	+	+

Bei der semianaeroben Anzucht von *E. coli* JM109 pAM154.1/pAM155.1 trat eine starke Ansäuerung auf, die durch den anaeroben Zuckerstoffwechsel verursacht wird. Der pH-Wert sank während der ersten Induktionsstunden auf pH 5,7 bis 6,2 je nach Zusatz ab, sodass eine maximale OD₆₀₀ von 0,8 erreicht wurde. Von den Kulturen wurden für die Ermittlung der spezifischen Aktivität jeweils 15 ml Kulturvolumen

entnommen, die Zellen pelletiert (Megafuge, 10 min, 4.500 rpm, Raumtemperatur) und Zellaufschluss und Aktivitätstests für FDH durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.7.5). Die Aktivitätstests ergaben dabei im Vergleich zu den aerob induzierten Zellen spezifische Aktivitäten von 0,02 U/mg bis zu 0,33 U/mg Gesamtprotein. Die höheren Aktivitäten wurden bei den Ansätzen erreicht, die mit Natriumnitrat supplementiert waren (siehe Abbildung 14).

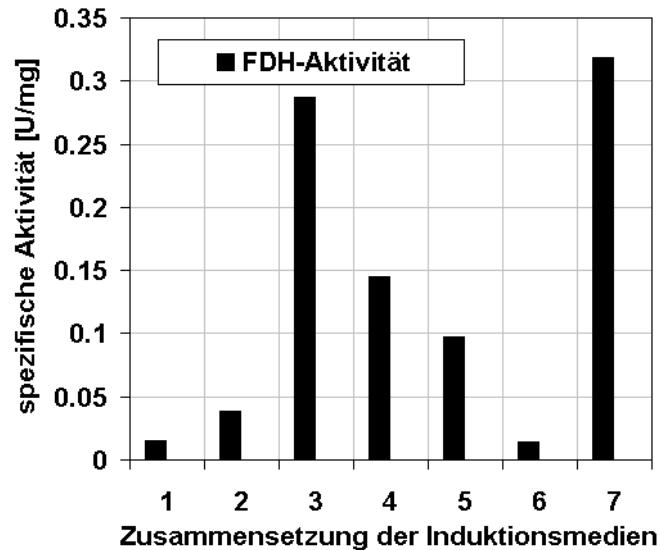


Abbildung 14: Spezifische FDH-Aktivitäten bei semianaerober Expression von *fdh1* mit *E. coli* JM109 pAM154.1/pAM155.1. Die Zusammensetzungen der Induktionsmedien entsprechen denen in Tabelle 28.

Nach SDS-PAGE (siehe Abbildung 15) zeigte sich dann, dass die hohe Aktivität offensichtlich nicht ausschließlich auf FDH-ME1 zurückgeführt werden konnte. Im löslichen Proteinanteil war weder die α - noch die β -Untereinheit zu erkennen, beide Untereinheiten lagen fast ausschließlich als Einschlusskörper vor. Die hohe FDH-Aktivität wurde vermutlich durch eine der drei *E. coli*-FDHs erreicht. Anhand der Beschreibung von Wang und Gunsalus (2003) könnte dies die Nitratinduzierbare anaerobe FDH-N sein, die aus drei heterologen Untereinheiten besteht (Molekulargewichte: 112,9 kDa, 32,3 kDa und 25,4 kDa). Diese konnten im löslichen Proteinanteil im SDS-Gel bestimmt werden und kamen nur bei den Ansätzen, die Nitrat enthielten, vor. Allerdings stimmt das kalkulierte Molekulargewicht der α -Untereinheit von FDH-N nicht mit dem im SDS-Gel ermittelten (128 kDa) überein. Da FDH-N membrangebunden ist (und z. T. im periplasmatischen Raum lokalisiert ist) und damit vermutlich über hydrophobe Bereiche verfügt (Wang und Gunsalus, 2003; Abaibou et al., 1995), könnte dies Einfluss auf das Laufverhalten im SDS-Gel haben, wenn bei der Vorbehandlung für SDS-Page die Proteinstruktur nicht ausreichend aufgebrochen wurde. FDH-O (auch FDH-Z, Abaibou et al., 1995), die FDH-N strukturell ähn-

lich ist, dürfte kaum für die gemessenen Aktivitäten verantwortlich sein, da die Expression dieses Gens nur bei der Umstellung des Organismus von aerob auf anaerob auftritt und nicht durch Nitrat induziert wird. Allerdings sind ihre Molekulargewichte mit 112,5 kDa, 33,1 kDa und 24,6 kDa denen der Untereinheiten von FDH-N sehr ähnlich. FDH-H (80 kDa) konnte im SDS-Gel nicht nachgewiesen werden. Die Synthese dieses Enzyms wird durch Formiat aber nicht durch Nitrat induziert, die Expression konnte auch in Ansätzen ohne Nitrat nicht festgestellt werden.

In Abbildung 15 sind dazu die SDS-Gele mit den Zellrohextrakten der unter semianaeroben Bedingungen induzierten Zellen von *E. coli* JM109 pAM154.1/pAM155.1 dargestellt. Bei den Nitrat-enthaltenden Ansätzen sind die drei Untereinheiten der vermuteten FDH-N sichtbar (Spuren 3, 4, 5 und 7). FDH-ME1 wurde in allen Fällen hauptsächlich als Einschlusskörper produziert (siehe Abbildung 15, Rohextrakt-Pellets). Für die Induktion und Expression von *fdh1* ist NaNO_3 somit nicht stimulierend.

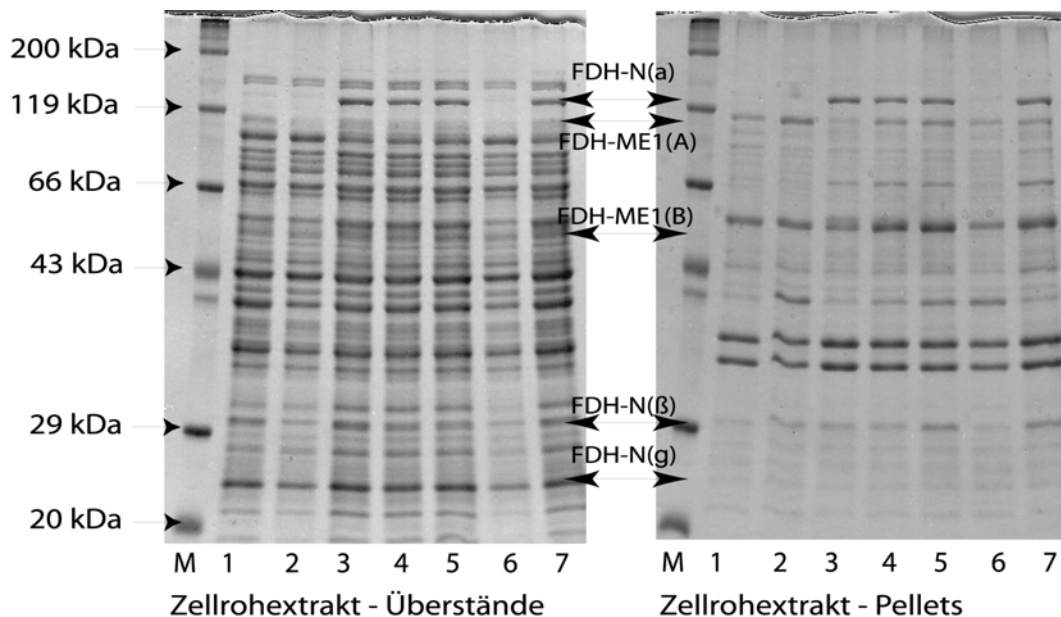


Abbildung 15: Zellrohextrakte von anaerob induzierten Zellen von *E. coli* JM109 pAM154.1/pAM155.1. Die Induktion wurde bei 30 °C für 16 h durchgeführt. Zusammensetzung des Mediums (Spuren 1 – 7) für die Expression lt. Tabelle 28 (UE = Untereinheit). A): Zellrohextrakt – lösliche Bestandteile, B): Zellrohextrakt – unlösliche Bestandteile. M: Standardproteinmarker von Roth.

Um noch eine Verbesserung der anaeroben Expression von *fdh1* zu erreichen, wurden noch zwei Möglichkeiten untersucht. Als erstes wurde *E. coli* JM109 pAM153.16 zusätzlich mit pACYCisc transformiert. Das *isc*-Operon trägt zur Bildung und Stabilisierung von Eisen-Schwefel-Clustern in *E. coli* bei und ist z. B. von Gräwert et al.

(2004) und Djaman et al. (2004) beschrieben. Die zweite Variante bestand darin, das Kulturmedium zu puffern, um den pH-Wert des Kulturmediums konstant zu halten. Das Anzuchtmedium (LB-Medium) wurde dafür nicht in Wasser, sondern in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7 hergestellt. Es wurden die Stämme *E. coli* JM109 pAM153.16, *E. coli* JM109 pAM154.1 / pAM155.1 und *E. coli* JM109 pAM153.16 / pACYCisc getestet sowie die Induktion bei Zugabe von Eisenionen (0,05 mM), $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,3 mM bzw. 0,3 μM), NaNO_3 (5 mM) und Cystein (1 mM) untersucht. Die Zugabe von Eisenionen und Cystein sollte die Ausbildung der Eisen-Schwefel-Cluster in FDH-ME1 optimieren. Das im ersten Versuch zur anaeroben Expression von *fdh1* verwendete FeSO_4 wurde aufgrund seiner schlechten Löslichkeit durch dreiwertiges Eisen in Form von FeCl_3 bzw. Eisen(III)-Ammoniumcitrat ersetzt.

Tabelle 29: Spezifische FDH-Aktivitäten bei 16 h anaerober Induktion von unterschiedlichen Expressionsstämmen mit verschiedenen Zusätzen in gepuffertem Medium. Die Induktion erfolgte mit 0,2 % Rhamnose bei 30 °C.

Stamm	Zusätze	spez. Aktivität [U/mg]
<i>E. coli</i> JM109 pAM153.16	keine Zusätze	0,04 – 0,05
	0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,095 – 0,13
	0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 5 mM NaNO_3	0,04 – 0,045
	0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 mM Fe(III)- NH_4 -Citrat, 1 mM Cystein	0,095 – 0,11
<i>E. coli</i> JM109 pAM153.16/pACYCisc	keine Zusätze	0,045 – 0,051
	0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,085 – 0,095
	0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 mM Fe(III)- NH_4 -Citrat, 1 mM Cystein	0,085 – 0,092
	0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1 mM Cystein	0,09 – 0,1
	0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,05mM FeCl_3	0,09 – 0,1
	0,1 mM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,05mM FeCl_3	0,045 – 0,05
	0,3 mM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,05mM FeCl_3	0,028 – 0,037
<i>E. coli</i> JM109 pAM154.1/pAM155.1	keine Zusätze	0,025 – 0,035
	0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,087 – 0,105

Die Ergebnisse der anaeroben Induktion von *fdh1* im gepufferten Medium sind in Tabelle 29 zusammengestellt. Danach ist die optimale Konzentration von $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,3 μM bei der Induktion von *E. coli* JM109 pAM153.16, *E. coli*

JM109 pAM154.1 / pAM155.1 und *E. coli* JM109 pAM153.16 / pACYCisc zum Erreichen der höchsten spezifischen Aktivität von FDH-ME1 im Vergleich zur Zugabe von 0,1 mM oder 0,3 mM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$. Aus Tabelle 29 kann entnommen werden, dass die alleinige Zugabe von 0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ bei Induktion von allen drei Ex-pressionsstämmen unter sauerstoffreduzierten Bedingungen zur maximal erreichbaren spezifischen FDH-Aktivität führt. Weitere Zusätze wie Eisenionen, Cystein oder die zusätzliche Transformation des Expressionsstammes mit pACYCisc sind nicht notwendig, da sie zu keiner Verbesserung der Expression und spezifischen Aktivität führen.

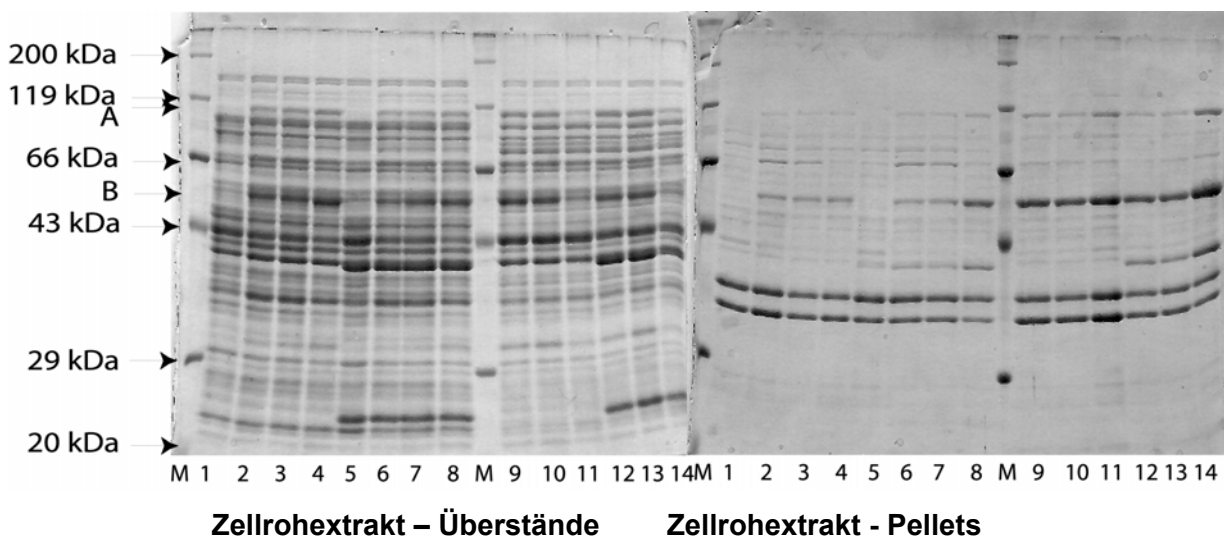


Abbildung 16: SDS-PAGE der Zellrohextrakte aus dem Induktionsversuch von *E. coli* JM109 pAM153.16 und *E. coli* JM109 pAM153.16 / pACYCisc getrennt nach löslichen und unlöslichen Proteinfractionen (Induktionstemperatur 30 °C). Die Spuren 1 bis 4 und 9 bis 11 zeigen Ansätze mit *E. coli* JM109 pAM153.16, die Ansätze 5 bis 8 und 12 bis 14 zeigen Ansätze mit *E. coli* JM109 pAM153.16 / pACYCisc. Die Zellrohextrakte der Spuren 1 bis 8 wurden aus aerob induzierten Ansätzen und diejenigen der Spuren 9 bis 14 aus anaerob induzierten Ansätzen gewonnen. M: Standardmarker von Roth. A: FDH-ME1(α), B: FDH-ME1(β).

Zusätzlich zur semianaeroben Induktion von *fdhME1* wurde nochmals ein direkter Vergleich mit induzierten aeroben Schüttelkulturen von *E. coli* pAM153.16 und *E. coli* pAM153.16/pACYCisc durchgeführt. Die aerobe Induktion wurde für 8 h ebenfalls in gepuffertem LB-Medium (siehe oben) bei 30 °C durchgeführt, die semianaerobe Induktion unter gleichen Bedingungen aufgrund des langsameren Wachstums der Kulturen für 16 h. Es wurden anhand der bisherigen Ergebnisse aus den semian- und aeroben Induktionsuntersuchungen die folgenden Medienzusammensetzungen ausgewählt:

- nicht induziert (Spuren 1 und 5 in Abbildung 16)
- induziert mit 0,2 % Rhamnose (Spuren 2, 6, 9, 12 in Abbildung 16)
- induziert mit 0,2 % Rhamnose, Zugabe von 0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Spuren 3, 7, 10 und 13 in Abbildung 16)
- induziert mit 0,2 % Rhamnose, Zugabe von 0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 mM Eisen(III)-Ammoniumcitrat und 1 mM Cystein (Spuren 4, 8, 11 und 14 in Abbildung 16)

Es zeigte sich deutlich, dass FDH-ME1 als lösliches Protein durch *E. coli* JM109 pAM153.16 mit oder ohne pACYCisc in signifikanten Mengen gebildet wird (siehe Abbildung 16, Markierung der Untereinheiten durch Pfeile A (α -Untereinheit) und B (β -Untereinheit)) und diese bis auf die anaeroben Ansätze, bei denen Eisen und Cystein zugegeben wurde (Spuren 11 und 14), nahezu identisch sind. Die induzierten sind von den nichtinduzierten Proben gut zu unterscheiden.

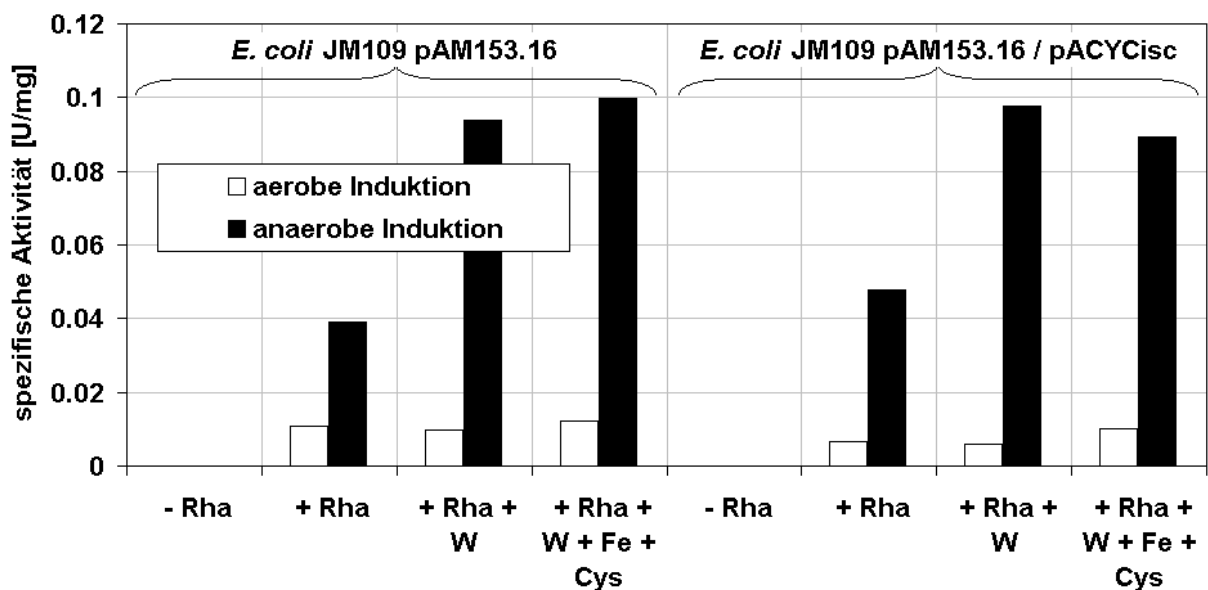


Abbildung 17: Spezifische Aktivitäten von FDH-ME1 nach aerober (8 h) und anaerober (16 h) Induktion von *E. coli* JM109 pAM153.16 und *E. coli* JM109 pAM153.16/pACYCisc bei 30 °C in LB-Medium in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer mit Antibiotika. (Rha: 0,2 % Rhamnose, W: 0,3 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, Fe: 0,05 mM Eisen(III)-Ammoniumcitrat, Cys: 1 mM Cystein).

Bei der Bildung von Einschlusskörpern treten jedoch einige Unterschiede auf. Bei anaerober Expression von *fdhME1* wird insgesamt mehr rekombinantes Protein gebildet, wobei speziell die kleinere β -Untereinheit von FDH-ME1 in hohem Maße als Einschlusskörper vorliegt. Die Zugabe von Eisen und Cystein führt zudem zur Bildung weniger löslichen Proteins als wenn beide Komponenten nicht zugegeben

werden. Bei aerober Expression werden ebenfalls beide FDH-ME1-Untereinheiten als Einschlusskörper gebildet, allerdings zu geringeren Anteilen. Trotz der geringeren Bildung von Einschlusskörpern bei aerober Expression von *fdhME1* konnten mit den Zellrohextrakten der anaeroben Expression die wesentlich höheren spezifischen Aktivitäten ermittelt werden. Ein repräsentatives Diagramm ist in Abbildung 17 gezeigt. Hier zeigt sich wiederholt, dass das zusätzliche Einbringen des *isc*-Operons sowohl bei aerober als auch bei anaerober Induktion keine Verbesserung bringt. Auch die Zugabe von Eisen und Cystein führen bei beiden untersuchten Stämmen zu keiner signifikanten Verbesserung der Expression und Aktivität.

Als Enzym für die Kofaktorregenerierung ist FDH-ME1 aufgrund seiner geringen Aktivität nicht geeignet und wurde aus diesem Grund nicht in den Ganzzellkatalysatoren eingesetzt. Mit den durchgeführten Optimierungsversuchen wurde jedoch nur *E. coli* JM109 als Induktionsstamm unter verschiedenen Bedingungen getestet, sodass durch einen Wechsel des Expressionsstammes, ein Absenken der Temperatur und eventuell einen anderen Promotor eine bessere Expression erzielt werden könnte.

4.1.5 Expression von *ldh*

Die Expression von *ldh* aus *B. cereus* wurde in *E. coli* JM109 pAM10.1 und *E. coli* BW3110 pAM10.1 untersucht. In 50 ml-Kulturen wurden die Zellen erst 2 h bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} \sim 0,4$ inkubiert und nach der Induktion mit 0,2 % Rhamnose bei 30 °C weiter kultiviert. Für die Proben wurden 5 OD Zellen entnommen. Die Probenahmen erfolgten nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h und 24 h Induktion. Da die Einzelexpression von *ldh* auf einem pACYC184-Derivat erfolgte, wurden Aktivitäten von 16 U/mg im Zellrohextrakt, wie von Stoyan et al. (1997) bei Expression auf einem pUC18-Derivat in *E. coli* XL-1 blue beschrieben, nicht erwartet. Aus diesem Grund konnten vermutlich auch im SDS-Gel (siehe Abbildung 18) keine starken Proteinbanden nachgewiesen werden. Zudem überlagert die Proteinbande von LDH eine *E. coli*-eigene Proteinbande. In Abbildung 18 ist in einem repräsentativen SDS-Gel die Proteinmenge zum Zeitpunkt von 6 h Induktion in *E. coli* JM109 pAM10.1 und zum Zeitpunkt von 16 h in *E. coli* BW3110 pAM10.1 dargestellt. Als Kontrollen wurden die Zellrohextrakte der nicht-induzierten Kulturen aufgetragen.

Die maximale spezifische Aktivität von 2,4 U/mg bei der Expression von *ldh* in *E. coli* JM109 pAM10.1 wurde nach 6 h Induktion mit Rhamnose erreicht. Auch hier war wie bei *fdhCB* die Expression und die spezifische Aktivität in *E. coli* BW3110 mit 4,5 U/mg nach 8 h Induktion höher, sodass eine hohe Expression des Gens im Falle einer Fermentation mit *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 auf jeden Fall gewährleistet ist.

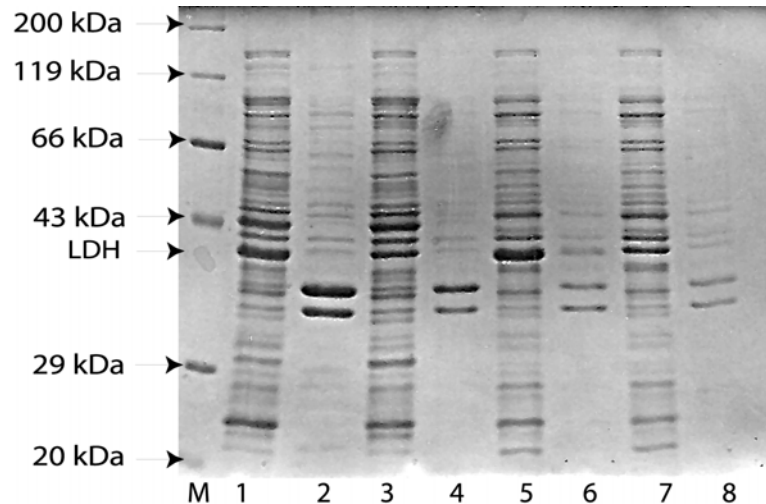


Abbildung 18: Expressionsanalyse von *ldh* in *E. coli* JM109 pAM10.1 und *E. coli* BW3110 pAM10.1 nach 6 h bzw. 16 h Induktion mit 0,2 % Rhamnose mit SDS-PAGE. Es wurden die löslichen (Spuren 1, 3, 5, 7) und unlöslichen (Spuren 2, 4, 6, 8) Proteinfractionen getrennt aufgetragen. Das gebildete Protein ist durch einen Pfeil markiert. M: Standardmarker von Roth; 1 + 2: *E. coli* JM109 pAM10.1 induziert; 3 + 4: *E. coli* JM109 pAM10.1 nicht induziert; 5 + 6: *E. coli* BW3110 pAM10.1 induziert; 7 + 8: *E. coli* BW3110 pAM10.1 nicht induziert.

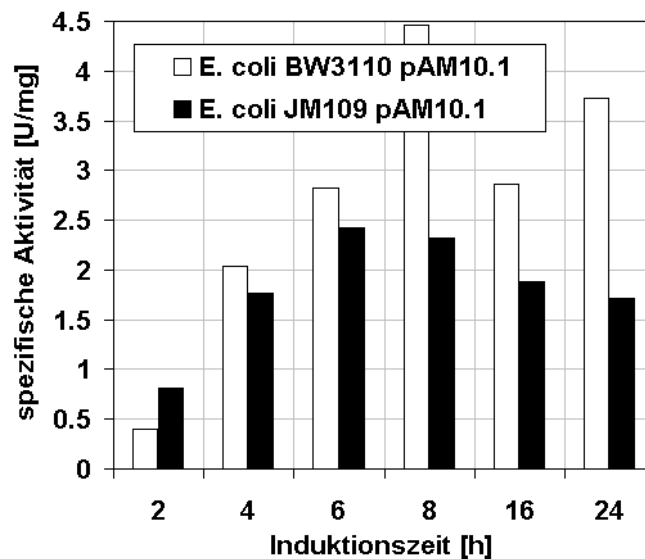


Abbildung 19: Induktionskinetik von *ldh* in *E. coli* JM109 pAM10.1 und *E. coli* BW3110 pAM10.1 bei Induktion mit 0,2 % Rhamnose und einer Induktionstemperatur von 30 °C. Die Expressionsdaten sind Mittelungen aus drei Versuchen.

In Abbildung 19 ist die Induktionskinetik von *ldh* in den Expressionsstämmen *E. coli* JM109 pAM10.1 und *E. coli* BW3110 pAM10.1 gezeigt. Der Wert nach 16 h Induktion wurde jeweils durch einen zweiten Versuchsansatz ermittelt, wobei die Induktion am Nachmittag eines Versuchstages gestartet wurde und die Zellernte 16 h später am

Folgetag erfolgte. Hinsichtlich der spezifischen Aktivitäten sind dadurch Schwankungen zwischen dem 8 h-, 16 h- und 24 h-Wert möglich. Die spezifische Aktivität von LDH in *E. coli* JM109 pAM10.1 erreicht wie bei der Expression von *fdhMV* in *E. coli* JM109 pAM149.1 ebenfalls 6 bis 8 h nach Induktion ihren maximalen Wert. Die spezifische Aktivität bei Expression von *ldh* in *E. coli* BW3110 pAM10.1 steigt auf etwa 4,5 U/mg nach 8 h Induktion und erreicht vermutlich zwischen 8 und 12 h nach Induktionsstart ein Maximum. Anschließend sinkt die spezifische Aktivität dann bis 24 h nach Induktionsstart auf ca. 3,7 U/mg.

4.1.6 Expression von *sfcA*

Das zweite für die Kofaktorregenerierung zur Verfügung stehende Gen *sfcA* für Malic Enzyme aus *E. coli* wurde unter dem Rhamnosepromotor in *E. coli* JM109 pHWG640.12 und in *E. coli* BW3110 pHWG640.12 unter den üblichen Bedingungen exprimiert (50 ml Kulturvolumen im 500 ml-Kolben, Geninduktion mit 0,2 % Rhamnose bei 30 °C). Der Expressionsvektor pHWG640.12 ist ein pACYC184-Derivat und verfügt über den L-Rhamnose induzierbaren Promotor. Das Enzym bildet ein Homotetramer, eine Untereinheit hat dabei ein Molekulargewicht von 64,2 kDa.

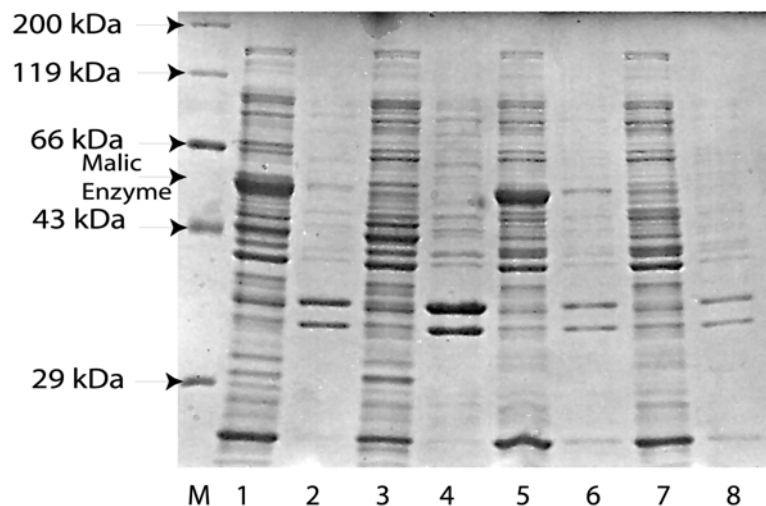


Abbildung 20: Induktion von *sfcA* in *E. coli* JM109 pHWG640.12 (6 h) und *E. coli* BW3110 pHWG640.12 (16 h) mit (Spuren 1, 2, 5, 6) und ohne (Spuren 3, 4, 7, 8) 0,2 % Rhamnose. Es wurden die löslichen (Spuren 1, 3, 5, 7) und unlöslichen Proteinfraktionen (Spuren 2, 4, 6, 8) getrennt aufgetragen. Das gebildete Protein ist durch einen Pfeil markiert, wobei das Molekulargewicht anhand des Markers hier mit 54 kDa ermittelt wurde. M: Standardmarker von Roth; 1 - 4: *E. coli* JM109 pHWG640.12; 5 - 8: *E. coli* BW3110 pHWG640.12.

Ein repräsentatives Proteingel ist dazu in Abbildung 20 dargestellt. Bei der Expression von *sfcA* in den beiden *E. coli*-Stämmen zeigten sich einige Unterschiede in Expression und Aktivität. In *E. coli* JM109 pHWG640.12 erscheint zwar die Bildung von rekombinanten Protein ähnlich (siehe Markierung in Abbildung 20), die spezifische Aktivität ist allerdings mit 23,4 U/mg geringer als in *E. coli* BW3110 pHWG640.12 (44,4 U/mg Gesamtprotein, siehe Abbildung 21).

Die Induktionskinetik in Abbildung 21 zeigt die unterschiedlichen Verläufe der spezifischen Aktivität von Malic Enzyme und das jeweilige Expressionsmaximum, das bei *E. coli* BW3110 pHWG640.12 deutlich später erscheint als bei *E. coli* JM109 pHWG640.12, bei dem das Expressionsmaximum zwischen 6 h und 8 h liegt. Verglichen mit der Expression und spezifischen Aktivität von *ldh* bzw. LDH ist die des *sfcA* bzw. Malic Enzymes zehnfach höher und sollte eine gute Grundlage für die Koexpression im Operon auf pAM5.22 und für die Kofaktorregenerierung darstellen.

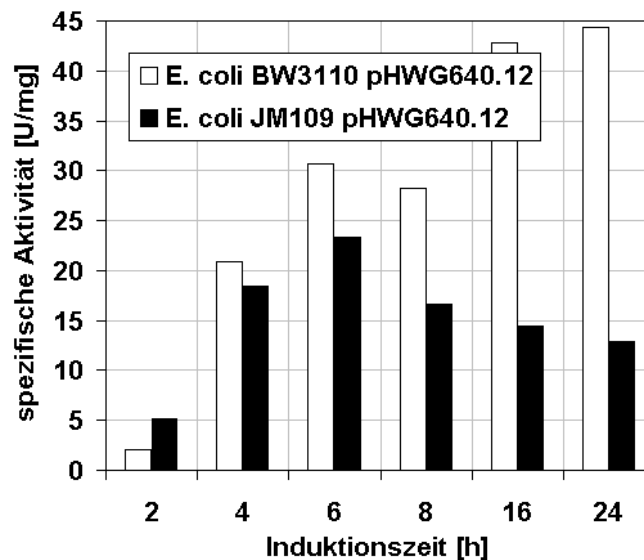


Abbildung 21: Induktionskinetik von *sfcA* in *E. coli* JM109 pHWG640.12 und *E. coli* BW3110 pHWG640.12. Die Induktion erfolgte mit Zugabe von 0,2 % Rhamnose zur Schüttelkultur und einer Induktionstemperatur von 30 °C.

4.1.7 Koexpression von Genen für die L-tert-Leucin-Synthese

Um mit ganzen Zellen reduktive Aminierungen oder Ketoreduktionen durchführen zu können, müssen die Gene der beteiligten Enzyme rekombinant koexprimiert werden. Im Fall der vorliegenden Arbeit wurde dies mittels des von Stumpp et al. (2000) beschriebenen Rhamnose-Expressionssystems in *E. coli*-Stämmen durchgeführt. Erste Expressionen wurden mit allen Genkombinationen zuerst in *E. coli* JM109 untersucht. Optimierungen folgten später in *E. coli* BW3110, der für Hochzelldichtefermen-

tationen aufgrund einer Inaktivierung des für L-Rhamnulose-Kinase codierenden Gens optimiert ist (Stumpp et al., 2000; Wilms et al., 2001). Im Gegensatz zu *E. coli* BW3110 liefert *E. coli* JM109 im Schüttelkolben in den ersten 8 h der Genexpression meist bessere Ergebnisse bezüglich der Enzymaktivitäten, während *E. coli* BW3110 sein Expressionsoptimum für viele Gene zwischen 16 h und 20 h nach der Induktion zeigt.

4.1.7.1 Koexpression von *fdhCB* und *ldh* in *E. coli*-Stämmen in Schüttelkulturen

Die Koexpression von *fdhCB* und *ldh* als Ein- und Zwei-Plasmid-System (pAM92.1 bzw. pAM3.25/pAM10.1) erfolgte in *E. coli* JM109 und *E. coli* BW3110. Es wurden sowohl die spezifischen Enzymaktivitäten als auch die Menge gebildeten Proteins im SDS-Gel nach Induktion der Gene bei Anzucht im Schüttelkolben verglichen. Aufgrund des sehr ähnlichen Molekulargewichts von FDH-CB und LDH (40,3 kDa bzw. 39,9 kDa) lassen sich beide Proteine sehr schlecht auftrennen und erscheinen bei Koexpression der Gene als eine Bande, die zudem eine *E. coli*-eigene Proteinbande überlagert.

Die Zellen wurden für den Expressionsvergleich 2 h bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert (50 ml LB-Medium, 500 ml Kolben), dann mit 0,2 % Rhamnose induziert und bei 30 °C weiter inkubiert. Nach bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und die spezifische Aktivität ermittelt. Ein Vergleich beider Plasmid-systeme hinsichtlich der Genexpression ist in den folgenden Abbildungen gezeigt.

Abbildung 22 zeigt dazu den direkten Vergleich nach 6 h Induktion der beiden Gene *fdhCB* und *ldh* in *E. coli* JM109 und nach 16 h Induktion in *E. coli* BW3110 unter dem Rhamnosepromotor. Die ungeraden Spuren zeigen die Zellrohextrakte der induzierten und die geraden Spuren die Zellrohextrakte der nichtinduzierten Kulturen. Abbildung 22 links zeigt die löslichen Bestandteile der Zellrohextrakte, Abbildung 22 rechts zeigt die unlöslichen Bestandteile. Es kann gezeigt werden, dass die Expression der auf zwei Plasmiden koexprimierten Gene (Markierung durch Pfeil bei 40 kDa) in *E. coli* JM109 pAM3.25 / pAM10.1 und *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 deutlich höher (Spuren 1 und 3) ist und etwa der zweifachen Menge an rekombinanten Protein im Vergleich zur Expression der Gene als Operon (Spuren 5 und 7) entspricht. In Abbildung 22 A ist dabei auch zu erkennen, dass durch die geringere Expression eines der Gene die Abtrennung von der *E. coli*-eigenen Proteinbande bei ca. 40 kDa zustande kommt. Es kann allerdings nur anhand von Aktivitätstests festgestellt werden, welches und wie gut ein Gen exprimiert ist. Die Aktivitäten der Enzyme FDH-CB und LDH aus Koexpression in *E. coli* JM109 und *E. coli* BW3110 mit Ein- und Zweiplasmid-System wurden in Induktionskinetiken verfolgt. Daraus und im Vergleich mit den Ergebnissen in Abbildung 22 kann ge-

geschlossen werden, dass die Expression von *ldh* mit pAM92.1 nicht optimal verläuft. In Abbildung 23 ist dazu die Induktionskinetik anhand der spezifischen Aktivitäten von LDH in den verschiedenen Expressionsstämmen bei Koexpression mit *fdhCB* gezeigt. Wird das Zweiplasmidsystem für die Koexpression induziert, erreicht die spezifische Aktivität von LDH Werte zwischen 1,6 und 2,1 U/mg, bei Induktion des Einplasmidsystems wird im Vergleich dazu etwa 1/10 der spezifischen LDH-Aktivität erreicht, was mit der Expressionsanalyse im SDS-Gel in Abbildung 22 korreliert.

Die Induktionskinetik von *fdhCB* bei Koexpression mit *ldh* in den verschiedenen Expressionsstämmen ist in Abbildung 24 gezeigt. Wie auch aus der vorhergehenden Abbildung bei LDH ersichtlich ist, sind die spezifischen Aktivitäten von FDH bei Induktion von *E. coli* JM109 pAM92.1 etwas niedriger und erreichen bei Induktion von *E. coli* BW3110 pAM92.1 nur maximal 25 % der Aktivität im Vergleich zu den Zweiplasmidsystemen.

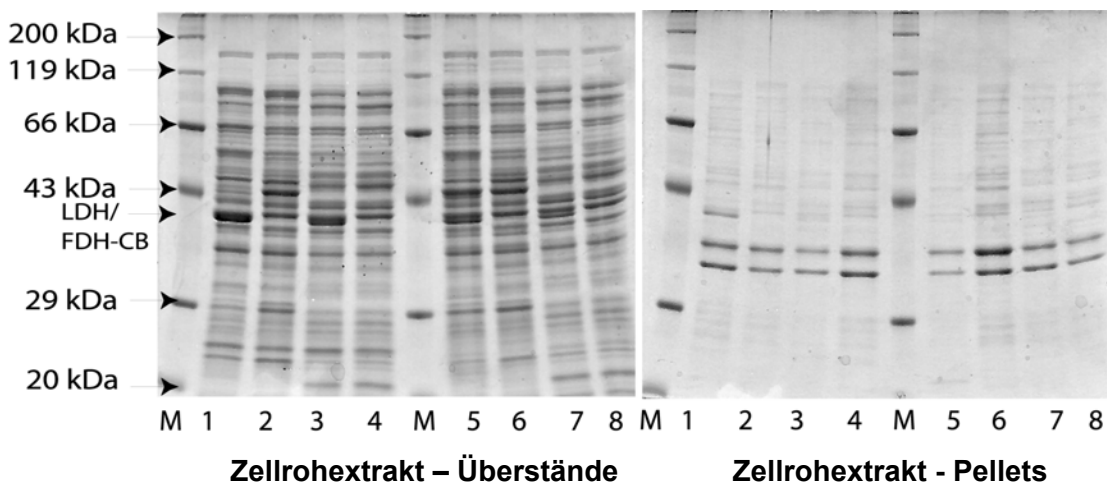


Abbildung 22: Koexpression von *ldh* und *fdhCB* in *E. coli* JM109 und *E. coli* BW3110 unter einem gemeinsamen Rhamnosepromotor (pAM92.1) oder auf zwei Plasmiden unter jeweils einem eigenen Rhamnosepromotor (pAM3.25 / pAM10.1). Die Induktionszeit der aufgetragenen Proben entspricht 6 h für die Expression in *E. coli* JM109 und 16 h für die Expression in *E. coli* BW3110. Die ungeraden Spuren zeigen jeweils Rohextrakte von induzierten Zellen, die gerade zeigen Rohextrakte von nichtinduzierten Zellen. M: Standardmarker Roth; 1 + 2: *E. coli* JM109 pAM3.25 / pAM10.1; 3 + 4: *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1; 5 + 6: *E. coli* JM109 pAM92.1; 7 + 8: *E. coli* BW3110 pAM92.1.

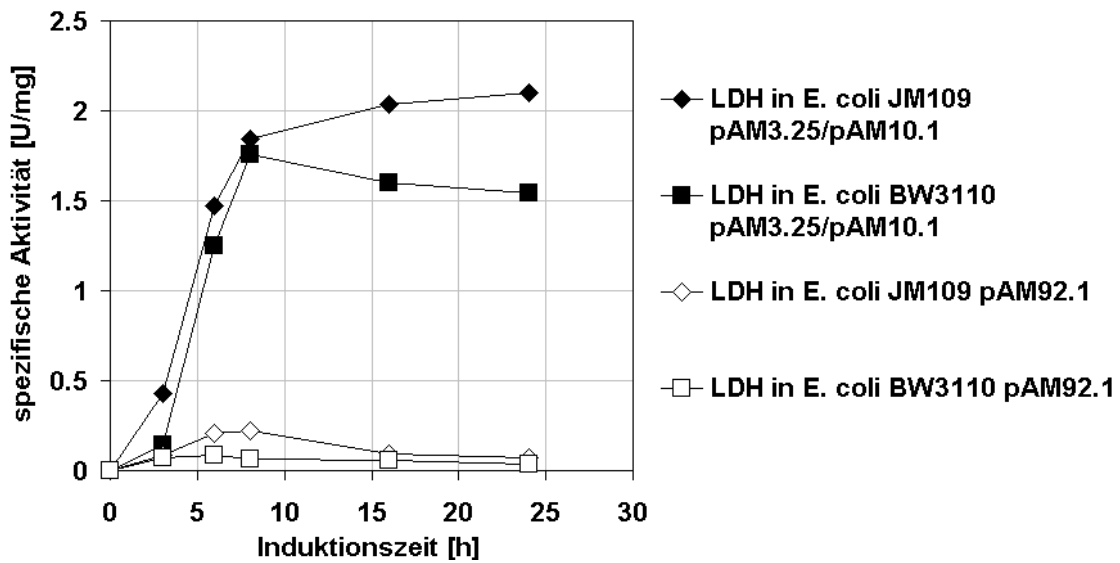


Abbildung 23: Induktionskinetik von *ldh* bei Koexpression mit *fdhCB* in verschiedenen Expressionsstämmen (siehe Legende). Gezeigt werden die spezifischen Aktivitäten von LDH. Die Induktion wurde bei 30 °C in 500 ml-Schüttelkolben bei 50 ml-Kulturvolumen durchgeführt.

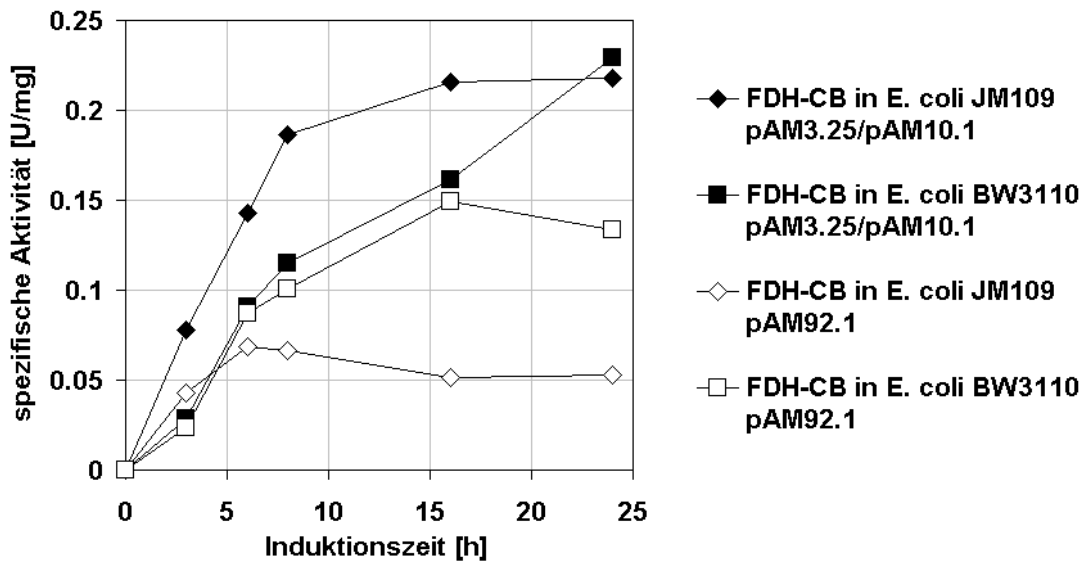


Abbildung 24: Induktionskinetik von *fdhCB* bei Koexpression mit *ldh* in verschiedenen Expressionsstämmen (siehe Legende). Gezeigt werden die spezifischen Aktivitäten von FDH-CB. Die Induktion wurde bei 30 °C in 500 ml-Schüttelkolben bei 50 ml-Kulturvolumen durchgeführt.

Der deutliche Unterschied zwischen der Expression und den Aktivitäten von *ldh* bzw. LDH im Einplasmidsystem gegenüber dem Zweiplasmidsystem wurde nicht erwartet. Die Position im Operon von *ldh* als zweites Gen im Operon sollte nicht dazu führen, dass das rekombinante Protein 90 % seiner Aktivität verliert (vergleiche Abbildung

25, Koexpression von *ldh* mit *sfcA* als Operon). Daher wurde vermutet, dass durch die Neuamplifikation von *ldh* für die Klonierung in pAM92.1 Fehler in die DNA-Sequenz eingebaut wurden, die zu einer schlechteren Transkription des Gens bzw. einer Fehlfaltung des Proteins führten. Basierend auf dieser Annahme wurde *ldh* auf pAM92.1 von beiden Seiten ansequenziert, um Fehler in der DNA-Sequenz zu finden. Die Sequenzierung zeigte mehrere Fehler in der Basen- und resultierend in der Aminosäuresequenz (Daten nicht aufgeführt), sodass auf eine weitere Arbeit mit diesem Stamm als Ganzzellkatalysator verzichtet wurde.

4.1.7.2 Koexpression von *sfcA* und *ldh* in *E. coli*-Stämmen als Schüttelkultur

Die Koexpression von *sfcA* und *ldh* erfolgte für die Herstellung von Ganzzellkatalysatoren sowohl in *E. coli* JM109 als auch in *E. coli* BW3110 (für eventuelle Fermentationen). Beide Gene standen in Form eines Operons hinter dem Rhamnosepromotor auf dem pBR322-Derivat pAM5.22 zur Verfügung, wobei das Gen des Malic Enzyme *sfcA* aufgrund der höheren spezifischen Aktivität des Enzyms an zweiter Stelle im Operon stand.

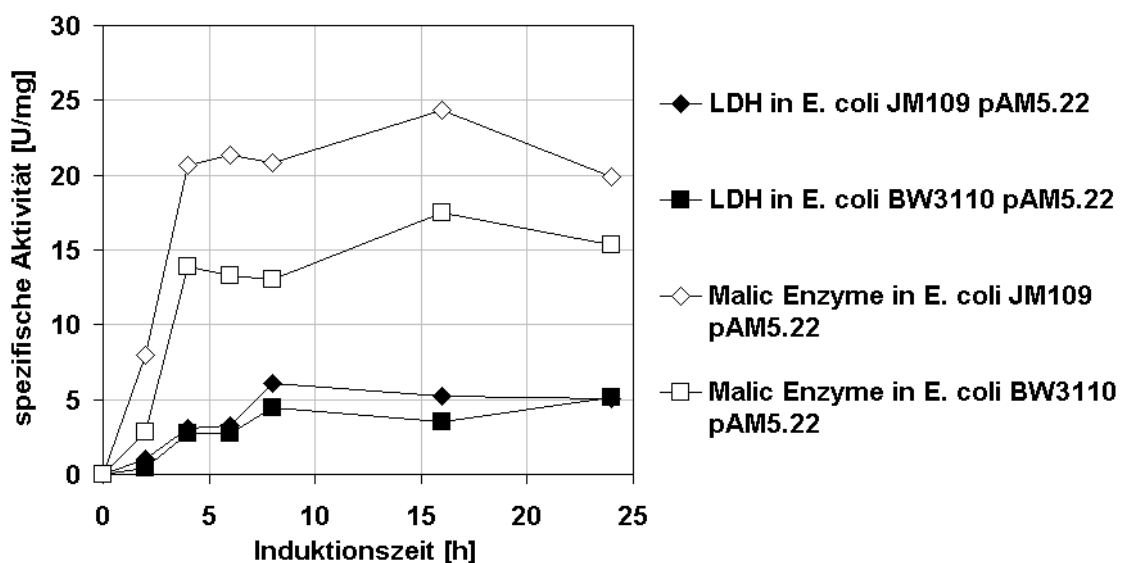


Abbildung 25: Vergleich der Koexpression von *sfcA* und *ldh* als Operon in *E. coli* JM109 pAM5.22 und *E. coli* BW3110 pAM5.22 anhand der spezifischen Aktivitäten. Die Induktion erfolgte mit 0,2 % Rhamnose bei 30 °C.

Vergleicht man die Expression von *ldh* in beiden *E. coli*-Derivaten, wird in *E. coli* JM109 pAM5.22 vergleichsweise mehr aktives Protein gebildet. Die Unterschiede zwischen den spezifischen Aktivitäten in beiden Expressionsstämmen liegen zwischen 12 % (4 h Induktion) und 60 % (2 h Induktion). Die Expression von *sfcA* an zweiter Stelle des Operons zeigt größere Unterschiede in den spezifischen Aktivitä-

ten über den gesamten Expressionsverlauf, nämlich zwischen 25 % (24 h Induktion) und 60 % (2 h Induktion, siehe Abbildung 25). Die spezifische Aktivität von Malic Enzyme ist trotz zweiter Stelle von *sfcA* in der Transkriptionsreihenfolge sowohl im Expressionsstamm *E. coli* BW3110 pAM5.22 als auch in *E. coli* JM109 pAM5.22 mindestens mehr als dreimal so hoch wie die spezifische Aktivität von LDH. Im Gegensatz zu FDH-CB sollte somit aufgrund der höheren spezifischen und Volumenaktivität von Malic Enzyme die Kofaktorregenerierung mit diesem Enzym und die gesamte Biotransformation (Reduktion von α -Ketosäuren, reduktive Aminierungen) schneller verlaufen.

4.1.8 Katalyseparameter für die Herstellung von L-*tert*-Leucin

Für die Herstellung von L-*tert*-Leucin mit Ganzzellkatalysatoren aus dem Substrat Tri-methylpyruvat (TMP) mussten zuerst die Reaktionsparameter bestimmt werden. Dazu wurden Umsetzungen in verschiedenen pH- und Temperaturbereichen durchgeführt.

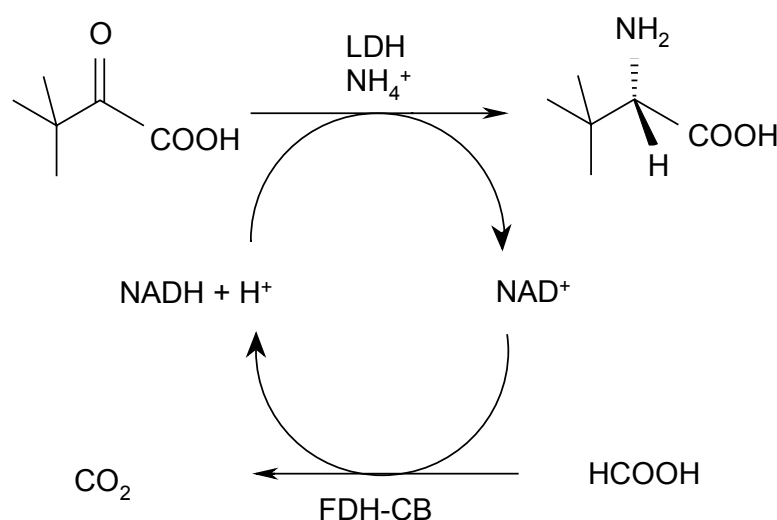


Abbildung 26: Schema der Umsetzung von TMP zu L-*tert*-Leucin mit Kofaktorregenerierung mit dem LDH/ FDH-CB-Ganzzellkatalysator.

4.1.8.1 Bestimmung von pH- und Temperatur-Optimum für die TMP-Umsetzung

Das Temperaturoptimum und das pH-Optimum für die Ganzzellkatalyse von TMP zu L-*tert*-Leucin wurden mit Rhamnose induzierten Zellen (*E. coli* JM109 pAM3.25 / pAM10.1, *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 bzw. *E. coli* JM109 pAM5.22) aus Schüttelkolbenanzucht im STAT Titrino 718 ermittelt. Die Reaktionsansätze enthielten 300 mM TMP sowie 450 mM Natriumformiat bzw. Äpfelsäure und 1 g Biofeuchtmasse. Die Temperatur des Reaktionsansatzes wurde durch einen

Thermostaten und der pH-Wert bei Bedarf durch Titration mit 1 M HCl konstant gehalten. Es wurden Kinetiken erstellt und die Endumsätze bestimmt. Die Ergebnisse dazu sind graphisch in den folgenden Abbildungen dargestellt. Abbildung 27 zeigt jeweils die Umsetzung von TMP durch die Ganzzellkatalysatoren bei verschiedenen pH-Werten, Abbildung 28 bei verschiedenen Temperaturen.

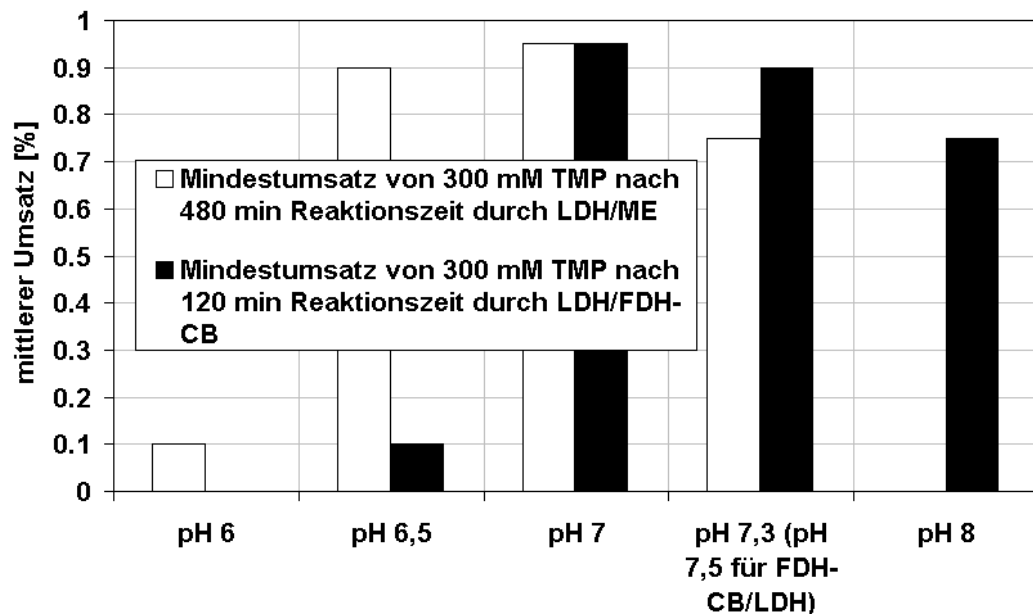


Abbildung 27: Vergleich der Umsetzung von 300 mmol/l Trimethylpyruvat mit den Ganzzellkatalysatoren *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 (LDH/FDH-CB) und *E. coli* JM109 pAM5.22 (LDH/Malic Enzyme) bei verschiedenen pH-Werten.

Für beide Ganzzellkatalysatorsysteme erwies sich pH 7 als optimal für eine Umsetzung des Modellsubstrates TMP. Der Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 (LDH/FDH-CB-Katalysator) ist jedoch erwartungsgemäß im neutralen bis leicht basischen pH-Bereich deutlich effizienter als im sauren Bereich, da FDH-CB mit sinkendem pH-Wert schnell an Aktivität verliert. Mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* JM109 pAM5.22 (LDH/Malic Enzyme-Katalysator) kann auch noch bei pH 6,5 eine hohe Umsetzung von TMP zu L-*tert*-Leucin von ca. 90 % erreicht werden. Vergleicht man die Reaktionszeiten, wurden die fast vollständigen Umsetzungen zu verschiedenen Zeitpunkten erreicht. Während beim LDH/FDH-CB-Katalysator schon nach 2 h die Reaktion fast vollständig abgelaufen war, benötigte der Malic Enzyme/LDH-Katalysator die vierfache Zeit.

Trotz der Erkenntnisse zum pH-Optimum beider Katalysatoren wurden auch Versuche ohne pH-Regulierung bei verschiedenen Anfangs-pH-Werten durchgeführt, da durch eine pH-Regulierung auch eine Verdünnung des Mediums erreicht wird. Dabei erwiesen sich die Anfangs-pH-Werte pH 6,8 - 7 für das LDH/FDH-CB-System und pH

6 - 6,2 für das System Malic Enzyme/LDH als optimal, da hier Umsätze von > 97 % erreicht wurden. Der pH-Wert stieg dabei während der Reaktion kontinuierlich an bis auf pH 8,5 beim LDH/FDH-CB-Ganzzellkatalysator und pH 7,5 - 8 bei LDH/Malic Enzyme-Katalysator. Die Ursache für den Anstieg des pH-Wertes ist von Kaup et al. (2004) aufgeführt. Aus dem verwendeten Na-Formiat wird dabei unter Abgabe der Reduktionsäquivalente an NAD^+ NaOH und CO_2 gebildet. Bei Kaup et al. (2004) korrelierte dabei die D-Mannitol-Formation mit dem Anstieg des pH-Wertes. Diese Beobachtung könnte auch auf die L-*tert*-Leucin-Synthese übertragbar sein. Der Anstieg des pH-Wertes zeigt hier gleichzeitig auch die Aktivität von FDH-CB und Malic Enzyme, sodass schon dadurch ermittelt werden kann, ob und wie schnell die Reaktion abläuft.

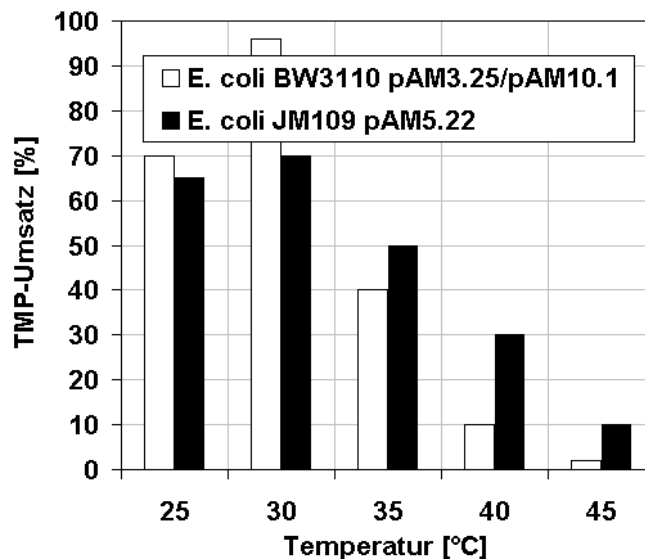


Abbildung 28: Temperaturverhalten der Ganzzellkatalysatoren LDH/FDH-CB (*E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1) und LDH/Malic Enzyme (*E. coli* JM109 pAM5.22). Die Temperatur wurde dabei mit einem Thermostaten geregelt. Die pH-Werte der Ansätze wurden zu Beginn auf pH 7 bzw. pH 6 mit 25 % NH_3 bzw. 100 % HCOOH eingestellt und nicht geregelt. Es wurden 1 g Biofeuchtmasse in 15 ml Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Probenahme erfolgte nach 3 h.

Für Abbildung 28 (Temperaturverhalten der beiden Ganzzellkatalysatoren) wurden die Proben nach jeweils 180 min genommen und die zu diesem Zeitpunkt erzielten Umsetzungen bestimmt. Die höchste Umsetzung im ungepufferten Reaktionsmedium erfolgte dabei mit dem LDH/FDH-CB-Ganzzellkatalysator. Die Zellen *E. coli* BW3110 pAM3.25 / 10.1 stammen aus einer Hochzelldichtefermentation (siehe Kapitel 4.1.8.2), die Zellen *E. coli* JM109 pAM5.22 aus Schüttelkolbenanzucht.

Für beide Katalysatoren erwies sich 30 °C als Temperaturoptimum. Resultierend aus diesen Ergebnissen wurden die weiteren Untersuchungen wie folgt durchgeführt:

Umsetzungen von TMP zu L-*tert*-Leucin mit dem LDH/FDH-CB-Ganzzellkatalysator starteten mit einem Anfangs-pH-Wert zwischen pH 6,8 und 7 bei 30 °C und Umsetzungen mit LDH/Malic Enzyme zwischen pH 6 und 6,2. Beide Reaktionen liefen anschließend ohne Regulation des pH-Wertes ab.

4.1.8.2 Hochzelldichtefermentation des FDH-CB/LDH-Ganzzellkatalysators

Zur Herstellung großer Zellmengen von Ganzzellkatalysatoren wurden zwei Hochzelldichtefermentationen nach Wilms et al. (2001) zur Produktion der heterologen Proteine mit *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 durchgeführt. *E. coli* BW3110 ist für eine Fermentation mit Rhamnose induzierbaren Vektoren optimiert, da bei diesem Stamm im Gegensatz zu *E. coli* W3110 das für die L-Rhamnulose-Kinase codierende Gen *rhaB* inaktiviert wurde. Damit wird vermieden, dass der Induktor Rhamnose abgebaut wird. Wie bereits in Kapitel 3.2.11 beschrieben, teilte sich die Fermentation in eine Batch- und eine Fedbatchphase, wobei die Zellen in der Batchphase bis zur einer $OD_{600} = 50$ kultiviert wurden und anschließend gleichzeitig mit Beginn der Fedbatchphase die Induktion der Genexpression mit Rhamnose erfolgte. Rhamnose wurde dabei direkt zum Batchmedium und anschließend weiterhin exponentiell mit Feed I zugegeben. Die Fermentation erfolgte bis auf die Vorkulturen ohne Antibiotika, da das verwendete pBR322-Derivat pAM3.25 durch eine *cer*-Site, die eine Multiplimerbildung von Plasmiden verhindert (Colloms et al., 1990), stabilisiert ist. Die Stabilität von pAM10.1 wurde vorausgesetzt, da pACYC184-Derivate gewöhnlich äußerst stabil sind.

Tabelle 30: Zusammenfassung der Fermentationsergebnisse. Die spezifischen Aktivitäten entsprechen denen bei Zellernte.

Fermentation	August 2003	Juli 2004
Fermentationsstamm (<i>E. coli</i>)	BW3110 pAM3.25/10.1	BW3110 pAM3.25/10.1
spezifische Aktivität FDH-CB	0,123 U/mg	0,105 U/mg
spezifische Aktivität LDH	0,565 U/mg	1,59 U/mg
Gesamtvolumen	12,8 l	13,6 l
Enzymeinheiten FDH-CB (gesamt)	76716 U	45294 U
Enzymeinheiten LDH (gesamt)	352307 U	690673 U
Induktionszeit	22h	25h

Das Ziel der Fermentationen war es, eine genügend große Zellmenge für weitere Ganzzellkatalysen bereitzustellen, um die Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten. Dabei sollten die Enzymaktivitäten in den Zellen im Bereich eines

Schüttelkolbenexperimentes oder höher liegen. Die aus den Fermentationen zusammengestellten Ergebnisse sind in Tabelle 30 abgebildet. Die Ausbeute an Zellen war bei beiden Fermentationen aufgrund der Kapazität der Schneckenzentrifuge gleich mit ca. 1,45 kg Zellen. Wie in der Tabelle gezeigt wird, konnten bei der Fermentation von *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 in beiden Fällen hohe Enzymmengen hergestellt werden, wobei die Enzymeinheiten von LDH fast verdoppelt und die spezifische Aktivität bei der zweiten Fermentation sogar fast verdreifacht werden konnten. Die Enzymeinheiten von FDH-CB erreichten den Wert der ersten Fermentation nicht, was aber die Funktionalität des Katalysators nicht signifikant beeinträchtigte.

4.1.9 Optimierung der reduktiven Aminierung von TMP zu L-tert-Leucin

4.1.9.1 Erhöhung der Substratkonzentration

Die Optimierung der reduktiven Aminierung von TMP wurde ebenfalls im STAT Titri-no durchgeführt, wobei speziell die Erhöhung der TMP-Konzentration und des Umsatzes betrachtet werden sollten. Vor allem sollte die Produktmenge gegenüber der Zellmenge maximiert werden, die Substratkonzentration sollte mindestens 500 mmol/l betragen, um die Biokatalyse wirtschaftlich zu machen und später ein Upscaling durchführen zu können.

Die Prozessoptimierung wurde ausschließlich mit *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 durchgeführt, da sich schon in den Vorversuchen abzeichnete, dass mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM5.22 schon bei TMP-Konzentrationen von 300 mmol/l zwischen 15 und 40 % weniger Umsatz erzielt wurden als mit FDH-CB als kofaktorregenerierendem Enzym. Die Zellkonzentration wurde bei allen Versuchen mit 1 g Biofeuchtmasse / 15 ml-Ansatz konstant gehalten, als Standardtemperatur wurde weiterhin bei 30 °C gearbeitet mit einem Anfangs-pH-Wert zwischen pH 6,8 und 7.

Zuerst wurde die Konzentration des TMP in 100 mmol-Schritten erhöht und die Umsetzung betrachtet. Natriumformiat als Substrat wurde dabei immer in 2,5-fachem bis dreifachem Überschuss zugegeben, da auch Konzentrationen von Natriumformiat höher als 2 mol/l nicht limitierend sind. Dabei zeigte sich deutlich, dass bei Konzentrationen höher als 300 mmol/l die prozentuale Ausbeute an L-tert-Leucin geringer wurde. So wurden bei 400 mmol/l TMP-Konzentration nur noch 83 % des Substrates umgesetzt im Vergleich zu 95 % bei 300 mmol/l Anfangskonzentration. Die maximale L-tert-Leucin-Konzentration mit 410 mmol/l wurde bei einer Anfangskonzentration von 800 mmol/l TMP erreicht. Die Probenahmen erfolgten nach 3 h. In Abbildung 29

sind die maximalen Umsetzungen bei gegebenen Substratkonzentrationen nochmals aufgetragen.

Eine höhere Umsetzung von TMP konnte auch bei längeren Reaktionszeiten nicht erreicht werden. Aufgrund des Reaktionsverlaufes bei höheren TMP-Konzentrationen und der maximalen Substratumsetzung von 350 bis 400 mmol/l konnte von einer Inhibierung von LDH oder FDH durch TMP oder dem Verlust des Kofaktors (Kaup et al., 2004; Chenault, 1995) ausgegangen werden, wodurch eine Regenerierung des NAD^+ nicht mehr gewährleistet sein würde. Kaup et al. (2004) geben für die Herstellung von D-Mannitol an, dass nahezu vollständige Umsetzungen ohne Kofaktorzugabe bis 300 mM Substratkonzentration möglich sind. Es wurden daher zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen, um auch hohe Umsatzraten bei 900 mmol/l TMP zu erreichen: einmal durch Zugabe von NAD^+ und einmal durch Zudosierung des Substrates. Auf die beiden Möglichkeiten soll in den folgenden zwei Kapiteln genauer eingegangen werden.

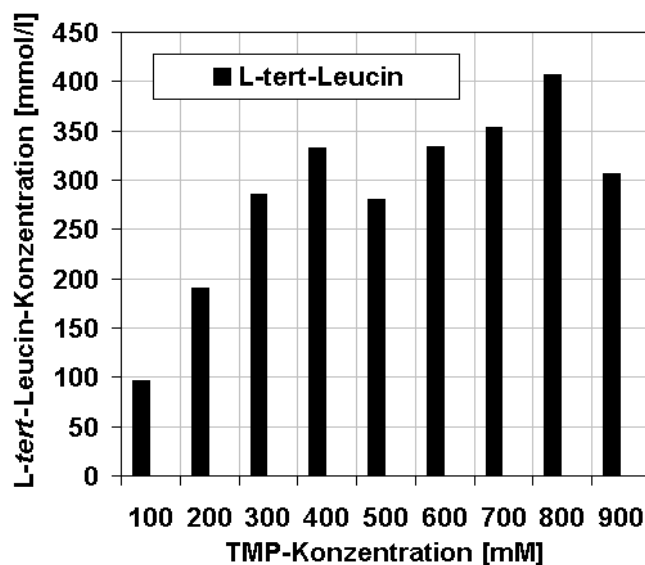


Abbildung 29: Umsetzung von TMP zu L-*tert*-Leucin durch *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 bei verschiedenen Anfangskonzentrationen nach 3 h Reaktion (Mittelwerte aus jeweils drei Versuchen). Die Reaktionsansätze mit 15 ml Gesamtvolumen bestanden jeweils aus einer bestimmten Konzentration TMP, der 2,5-fachen Konzentration Natriumformiat, 1 g Biofeuchtmasse (Fermentation vom August 2003) in Wasser. Es erfolgte keine Pufferung oder Regulation des pH-Wertes, nur der AnfangspH-Wert wurde auf pH 6,8 - 7 eingestellt.

4.1.9.2 Erhöhung des TMP-Umsatzes durch NAD^+ -Zugabe

Um den Einfluss von verschiedenen NAD^+ -Konzentrationen auf die Umsetzung von TMP zu bestimmen, wurden Reaktionsansätze mit 900 mmol/l TMP gewählt, da hier

ohne Kofaktorzugabe nur rund 350 bis 400 mmol/l L-*tert*-Leucin gebildet wurden und die NAD⁺-Zugabe einen deutlichen Effekt zeigen müsste.

Durch Zugabe von NAD⁺ konnte eine vollständige Umsetzung von 900 mmol/l TMP zu L-*tert*-Leucin erreicht werden, die nach 6 h Reaktionszeit abgelaufen war (siehe Abbildung 30). Im Vergleich dazu konnten ohne NAD⁺-Zugabe nur ca. 400 mmol/l L-*tert*-Leucin nachgewiesen werden. Interessanterweise reichte schon 1 mmol/l NAD⁺ zusätzlich aus, um die Reaktion vollständig ablaufen zu lassen. Eine Ursache wäre, dass NADH und NAD⁺ bei höheren TMP-Konzentrationen stärker aus der permeabilisierten Zelle entweichen und für die Biokatalyse durch lange Diffusionswege nur begrenzt zur Verfügung stehen. Eine weitere Ursache wäre der Verlust von NADH während der Reaktion durch höhere Instabilität gegenüber Oxidationen im Vergleich zu NAD⁺, sodass die Rezyklisierung des NADH nicht mehr auf dem Anfangsniveau gehalten werden kann (siehe Kapitel 2.1.6, *turn over*-Zahlen von Kofaktoren). Beide Varianten sind allerdings realistisch, wenn man NAD⁺ als limitierenden Faktor der Reaktion betrachtet, bei dem auch eine geringe Erhöhung der Konzentration zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit beiträgt, da wieder NADH durch FDH-CB bereitgestellt werden kann, und das Reaktionsgleichgewicht bei einer Erhöhung der NADH-Menge durch Oxidation des Formiats in Richtung des Produktes L-*tert*-Leucin verschoben wird.

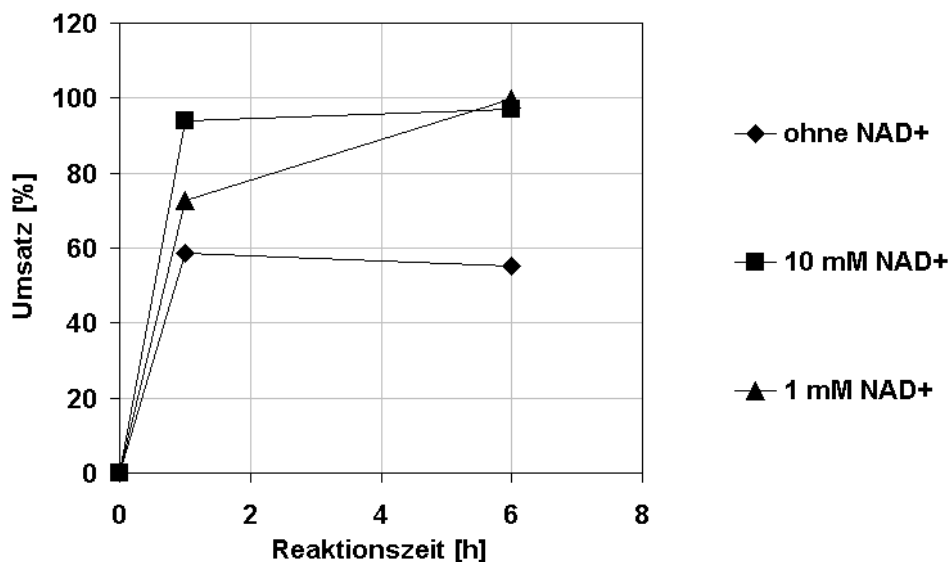


Abbildung 30: Umsetzung von 900 mmol/l TMP zu L-*tert*-Leucin mit und ohne Zugabe von NAD⁺ in verschiedenen Konzentrationen durch 1 g Zellen *E. coli* BW3110 pAM3.25/pAM10.1 bei 30°C ohne pH-Regulierung.

Trotz der geringen Konzentration an NAD⁺ für die Titroversuche, würde dies bei einem Prozess-Upscaling zu signifikanten Nebenkosten führen, zumal der Kofaktor

bei der Produktaufreinigung wahrscheinlich verloren gehen würde. Deshalb sollte noch die Variante einer Zudosierung des Substrates untersucht werden, deren Ergebnis im folgenden Kapitel ausgeführt wird.

4.1.9.3 Erhöhung des TMP-Umsatzes durch Substrat-Zudosierung

Um auf eine NAD^+ -Zugabe zur Reaktion verzichten zu können, wurde die Zudosierung von TMP in Betracht gezogen. Es kann dabei einmal der Feststoff TMP in definierten Mengen selbst bei gleichzeitiger Regulation des pH-Wertes zugegeben werden oder als gelöster Stoff bekannter Konzentration mit bekanntem, eingestellten pH-Wert. Eine kontinuierliche Zudosierung mit Festsubstanz ist schwierig durchzuführen. Die letztere Methode hat den Nachteil, dass die Biomasse bzw. der Biokatalysator durch Erhöhung des Reaktionsvolumens verdünnt wird und die Reaktionen durch Vergrößerung des Reaktionsraumes verlangsamt werden. Im Gegensatz zur einmaligen Zugabe von NAD^+ würde weiterhin die Reaktionszeit allein schon durch die schrittweise Zugabe von TMP verlängert werden.

Andererseits ist das Zudosieren einer Lösung technisch machbar. Die einfachste Form der Zudosierung ist die wiederholte Zugabe eines definierten Volumens einer hochkonzentrierten TMP-Lösung. Die theoretische maximale TMP-Konzentration, die zu jedem Zugabezeitpunkt umgesetzt werden kann, ist dadurch berechenbar. Weiterhin wurde die Zugabe in nicht pH-regulierten Ansätzen durchgeführt, da man hier den Anstieg des pH-Wertes mit der Reaktions- bzw. Umsatzgeschwindigkeit assoziieren kann (Kaup et al., 2004). Zwischen pH 6,8 und pH 7,7 erfolgt bei einer TMP-Anfangskonzentration von 300 mM der größte Anstieg des pH-Wertes. In Abbildung 31 ist ein solcher Verlauf abgebildet. Die Zugabe einer TMP-Lösung, die auf pH 7 eingestellt ist, sollte dann erfolgen, wenn die Reaktionslösung pH 7,5 erreicht hatte, so dass bei dessen Zugabe im ungepufferten Reaktionsmedium eine Absenkung des pH-Wertes erfolgen musste und die Reaktion anhand eines erneuten pH-Anstieges beobachtet werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt sollte ein Großteil des schon im Reaktionsmedium vorhandenen TMP umgesetzt sein.

Ein für die Zudosierung charakteristischer Verlauf des pH-Wertes über die Reaktionszeit wurde mittels des Titriino-pH-Meters aufgezeichnet und ist in Abbildung 32 dargestellt. In Abbildung 32 ist dabei auch zu erkennen, dass mit zunehmendem Medienvolumen die TMP-Zugabe einen immer geringeren Einfluss auf den pH-Wert hat, also die Orientierung der Zugabe am pH-Anstieg nicht mehr aussagekräftig ist. Daher wurde die Zugabe von TMP bis zur fünften Zugabe nach dem pH-Wert gerichtet und anschließend nach bestimmten Zeitintervallen durchgeführt. Weiterhin musste parallel auf die Konzentration des Natriumformiat geachtet werden, die immer höher, mindestens aber genauso hoch, sein sollte wie die des TMP. Daher wurde nach 150 min Reaktionszeit nochmals Natriumformiat zugegeben.

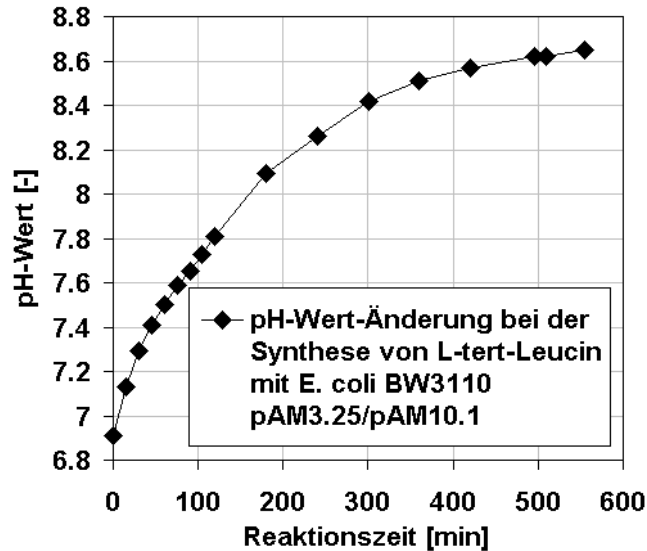


Abbildung 31: pH-Wert-Verlauf bei der Biotransformation von TMP zu L-tert-Leucin mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1. Es wurden 300 mmol/l Trimethylpyruvat in 15 ml Gesamtvolumen mit 1 g Biofeuchtmasse aus Hochzell-dichtefermentation ohne pH-Regulation umgesetzt. Die Reaktionstemperatur war 30 °C.

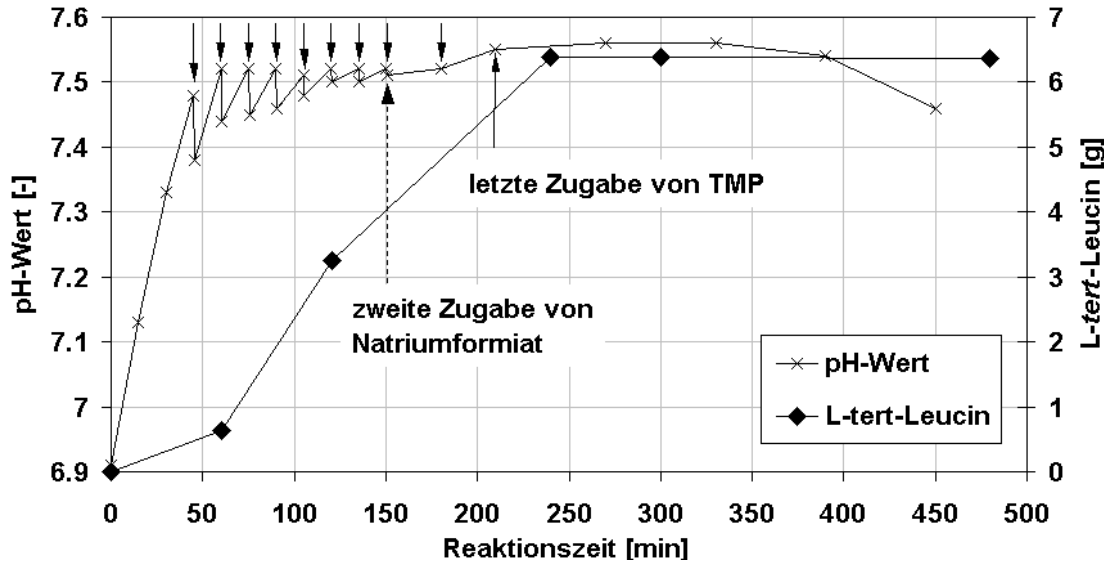


Abbildung 32: Charakteristischer pH-Wertverlauf während der Zudosierung von TMP in einem nicht pH-regulierten Reaktionsmedium. Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Zudosierung von 4,5 ml 1 M TMP pH 7 bzw. von Natriumformiat (4 ml einer 4 M Lösung pH 7) in den Reaktionsansatz an. Die Reaktion wurde mit 15 ml Reaktionsmedium und 1 g Zellen *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 gestartet, zu Beginn standen 300 mM TMP und 2,5 M Natriumformiat zur Verfügung.

Tabelle 31: Zudosierung von Trimethylpyruvat und Natriumformiat bei der Herstellung von L-*tert*-Leucin mit ganzen Zellen von *E. coli* BW3110 pAM3.25/pAM10.1.

t_{Reaktion} [min]	Gesamtvolumen [ml] nach Zugabe	Zugabe 1 M TMP [ml]	C_{TMP} [mM]	Zugabe 4 M Na-Formiat [ml bzw. g]	$C_{\text{Na-Formiat}}$ [mM]
0	15	4,5	300	2,56 g	2500
45	19,5	4,5	461,54	-	1923,08
60	24	4,5	562,5	-	1562,5
75	28,5	4,5	631,58	-	1315,79
90	33	4,5	681,82	-	1136,36
105	37,5	4,5	720	-	1000
120	42	4,5	750	-	892,86
135	46,5	4,5	774,19	-	806,45
150	55	4,5	736,36	4 ml	972,73
180	59,5	4,5	756,3	-	899,16
210	64	4,5	773,44	-	835,94

In Tabelle 31 sind die Konzentrationen (ohne Berücksichtigung des Umsatzes) und das Reaktionsvolumen in Abhängigkeit der Zeit zusammengefasst. Die Umsetzung des TMP zu L-*tert*-Leucin wurde auch hier mit SYKAM-HPLC anhand der Abnahme des TMP analysiert. Aufgrund der schwankenden TMP-Konzentrationen während der Zudosierung wurden HPLC-Messungen nur zu den Zeitpunkten 0 h, 1 h, 2 h und dann nach der letzten TMP-Zugabe bei 4 h, 5 h, 6,5 h und 8 h durchgeführt. Nach 8 h Reaktionszeit waren laut SYKAM-HPLC-Analyse mehr als 95 % des Substrates umgesetzt.

4.1.9.4 Recycling des LDH/FDH-CB-Ganzzellkatalysators

Eine wichtige Eigenschaft von Biokatalysatoren ist neben ihrer Enantioselektivität auch die Wiederverwendbarkeit der Enzyme, in diesem Fall der ganzen Zellen. Im Fall von immobilisierten Enzymen ist diese Möglichkeit gegeben, da sich das Reaktionsmedium leicht abtrennen lässt und die Enzyme auf der Trägeroberfläche regeneriert und wiederverwendet werden können. Der Verlust des Kofaktors durch Entzug der Reaktionslösung ist nicht signifikant, da dieser sowieso bei Reaktionen zugegeben werden muss. Bei dem Einsatz ganzer ruhender Zellen verbleibt der Kofaktor während der Reaktion in der Zelle und bei wiederholter Reaktion sollten die Umsetzungen reproduzierbar sein. Werden die Zellen jedoch permeabilisiert, wie bei diesen Ganzzellkatalysatoren mit Toluol, kann der Kofaktor – wie auch andere Zellinhaltsstoff-

fe – ins Reaktionsmedium übergehen und wird somit verdünnt. Bei Rezyklisierung permeabilisierter Zellen werden diese durch Filtration oder Zentrifugation von der ersten Reaktionslösung abgetrennt und verlieren somit schon einen großen Anteil des Kofaktors. Die Zelle kann zwar Substrat aufnehmen, die Enzyme haben allerdings weniger konzentrierten Kofaktor zur Verfügung, sodass die Reaktion entweder langsamer abläuft oder vollständig zum Erliegen kommt (siehe Abbildung 33).

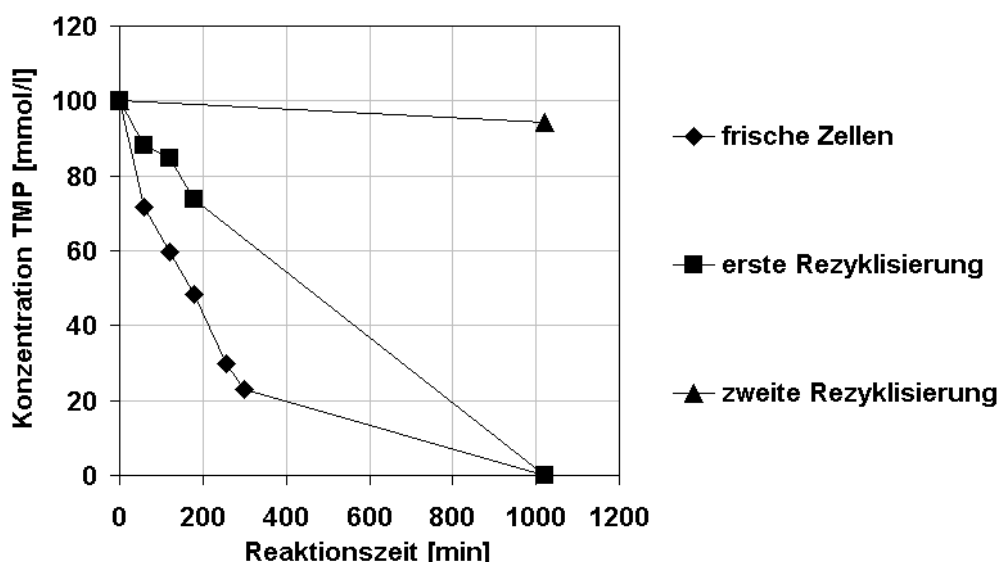


Abbildung 33: Rezyklisierungsversuche mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1. Es sollten 100 mM TMP bei 30 °C umgesetzt werden. Natriumformiat wurde in einer Konzentration von 250 mM zugegeben. Um die Zellen wieder zu verwenden, wurden sie durch Zentrifugation aus dem jeweils vorherigen Reaktionsansatz abgetrennt (10 min, 4.500 rpm, Megafuge).

Zur Untersuchung der Wiederverwendbarkeit des LDH/FDH-CB-Ganzzellkatalysators *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 wurden Umsetzungen mit 100 mmol/l TMP durchgeführt (30 °C, 15 ml Reaktionsansatz, keine pH-Regulierung, kein Puffer, 1,5 Vol. % Toluol) und die Umsetzung mittels HPLC überprüft. In Abbildung 33 sind die Versuchsergebnisse zusammengestellt. Nach Ablauf der ersten Reaktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4.500 rpm, Megafuge) abgetrennt und in einer neuen analogen Reaktionslösung resuspendiert. Mit den Zellen wurden zwei Rezyklisierungen durchgeführt. Beim ersten Einsatz mit neuen Zellen verläuft die Umsetzung linear und ist nach ca. 7 h abgeschlossen. Schon beim zweiten Einsatz erfolgte die Umsetzung des TMP zu L-*tert*-Leucin deutlich langsamer mit etwa 15 h Reaktionszeit (extrapoliert). Bei der zweiten Rezyklisierung wurden noch etwa 5 % des Substrates umgesetzt. Die geringe Anzahl der Probenahmen bei der ersten und zweiten Rezyklisierung lassen trotzdem eine gute Näherung des Reaktionsverhaltens zu. Eine Rezyklisierung der Zellen ist somit lt. Abbildung 33 nicht rentabel, allerdings

wurde aus wirtschaftlichen Gründen eine NAD⁺-Zugabe nicht in Betracht gezogen und auch nicht untersucht, obwohl diese vermutlich Effekte auf die Umsetzungen ergeben hätte. Experimente mit immobilisierten Zellen von *E. coli* JM109 pAM3.25 / pAM10.1 hatten nämlich gezeigt, dass ein mindestens 10-facher Einsatz des Ganzzellkatalysators möglich ist, wenn NAD⁺ zugegeben wird (Experimente durchgeführt von Fr. Hussmann, FAL Braunschweig, im Rahmen des BMBF-Projektes). Der Rezyklisierungsversuch wurde größtenteils bei Degussa Biokatalyse durchgeführt, deren Titratorreaktionsgefäße jedoch andere Geometrien besitzen, dadurch ein anderes Oberflächen-Volumenverhältnis entsteht und der Gasaustausch an der Phasengrenze beeinflusst wird. Die längere Reaktionsdauer hängt damit vermutlich mit den anderen Reaktionsbedingungen bezüglich des Versuchsaufbaus zusammen. Des Weiteren wurde anstelle eines Magnetrührers ein elektrisch betriebener Blattrührer eingesetzt, dessen Scherkräfte auch Einfluss auf die Zellen bzw. Enzyme und damit die Reaktionszeit haben können.

4.2 Herstellung von sekundären Alkoholen

Neben den Ganzzellkatalysatoren zur reduktiven Aminierung von α -Ketosäuren mit Kofaktorregenerierung wurden Ganzzellkatalysatoren zur Herstellung sekundärer Alkohole aus den korrespondierenden Ketonen erzeugt. Dafür standen FDHs aus *C. boidinii* und *M. vaccae* N10 zur Verfügung sowie Gene für verschiedene ADHs: ADH aus *R. erythropolis* DSM 43297 (ADH-RE, Abokitse und Hummel, 2003) und ADH aus *A. paraffineus* (ADH-AP), auf deren Klonierung und Expression in den nächsten Kapiteln eingegangen wird.

4.2.1 Klonierung von *adhRE* und *adhRE*-Derivaten

Das Gen von ADH-RE wurde auf dem Plasmid pRE-ADH zur Verfügung gestellt, auf dem ein DNA-Fragment aus einer Genbank von *R. erythropolis* DSM 43297 enthalten war. Mit PCR wurden sowohl das Wildtyp-Gen *adhRE* (Oligonukleotide s3917, s3897) als auch in der Translationsinitiationsregion veränderte Varianten davon amplifiziert (Oligonukleotide s3896, s3897). Durch diese Veränderungen zum Erzeugen von genetisch modifizierten Klonen wurde versucht, sowohl die Bildung von Einschlusskörpern bei der Expression der *adhRE*-Derivate zu verringern als auch eine höhere spezifische Aktivität zu erhalten. Die Sequenzen der für die Genamplifikation verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 32 zusammengestellt.

Die Klonierung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte über die durch die Oligonukleotide hinzugefügten *Nde*I- und *Hind*III-Restriktionsschnittstellen (siehe Tabelle 32, Markierungen) in einen Vektor mit Rhamnosepromotor (pBR322-Derivat

pJOE4580.2). Die aus diesen Klonierungen entstandenen Plasmide sind in Tabelle 33 zusammengefasst. Die Plasmide pNO9 (pBR322-Derivat) und pNO11 (pACYC184-Derivat) wurden von Degussa zur Verfügung gestellt und codieren ein *adhRE*-Gen, das an die Codon-Usage von *E. coli* angepasst und hier nur mit den ersten Basen aufgeführt ist (Schulze et al., 2006 (Deutsches Patent DE 102005008908 A1)).

Tabelle 32: Zusammenstellung der Oligonukleotide zur Amplifikation von *adhRE* und in der Translationsinitiationsregion modifizierter Derivate.

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen/Richtung
s3917	AAA AAA <u>CAT ATG</u> AAG GCA ATC CAG TAC ACG	<i>adhRE</i> -Wildtyp vorwärts
s3897	AAA AAA <u>AGC TTC</u> TAC AGA CCA GGG ACC ACA	<i>adhRE</i> -Wildtyp revers
s3896	AAA AAA <u>CAT ATG</u> AA(AG) GCN AT(ACT) CA(AG) TA(CT) ACG CGC ATC GGC GCG GAA CCC GAA	<i>adhRE</i> -Derivate vorwärts

Mit allen *adhRE*-enthaltenden Plasmiden wurden Expressionsuntersuchungen in *E. coli* JM109 durchgeführt, indem Übernachtskulturen bei 30 °C mit dem Induktor Rhamnose induziert wurden, und dann anhand der spezifischen Aktivitäten geeignete Klone für die weiteren Experimente ausgewählt. Die dazu gehörige Versuchsdurchführung ist in Kapitel 4.2.3 beschrieben.

Tabelle 33: Anfangssequenzen von *adhRE* und *adhRE*-Variationen (wt – Wildtyp, tv – in der Translationsinitiationsregion verändert, co – codonoptimiert).

Klon	Typ	Anfangssequenz 5'-3' (wenn bekannt), Bemerkungen
pAM94.4	wt	ATG AAG GCA ATC CAG TAC ACG CGC ATC
pAM83.5	tv	ATG AAA GCA ATT CAG TAC ACG CGC ATC
pAM83.7	tv	ATG AAG GC? ATT CAA TAT ACG CGC ATC
pAM83.13	tv	ATG AAG GCT ATA CAG TAC ACG CTC ATC
pAM86.6	tv	ATG AAA GCT ATT CAA TAT ACN
pAM86.9	tv	ATG AAG GCC ATA CAA TAC ACG CGC ATC
pNO9, pNO11	co	ATG AAA GCG ATC CAG TAC ACC CGT ATT GGT...
pAM82.XX, pAM83.XX, pAM86.XX	tv	weitere 39 Klone mit veränderten Translationsinitiationsregionen, die nicht ansequenziert, aber auf Aktivität getestet wurden

4.2.2 Klonierung der Gene *adhAP(A)* und *adhAP(G)*

Von *A. paraffineus* standen zwei Gene für eine ADH auf den Plasmiden HD14(A)ADHVersionpET22b und HD14(G)ADHVersionpET22b zur Verfügung, die sich nur in der 19. Base bzw. in der siebten Aminosäure unterscheiden (acg ↔ gcg). Welche von beiden Genvarianten im Wildtypgenom auftritt, ist nicht bekannt, da beide Gene durch PCR mit degenerierten Oligonukleotiden amplifiziert wurden (B.R.A.I.N. AG, nicht publiziert). Die Gensequenzen wurden patentiert (Schulze et al., 2006 (Deutsches Patent DE 102005008908 A1)). Durch die verschiedenen Basen A und G an der 19. Position ist die siebte Aminosäure in der Proteinsequenz in einem Fall Threonin (Version A) und im anderen Fall Alanin (Version G). Die ersten zehn Aminosäuren der Proteinsequenz sind in Tabelle 34 aufgeführt und der Unterschied hervorgehoben. Durch den Unterschied in der Basensequenz werden die beiden Varianten des ADH-Gens auch als *adhAP(A)* und *adhAP(G)* bezeichnet.

Die Gene wurden mittels der Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* in einen Vektor mit Rhamnosepromotor (pJOE4580.2) inseriert. Die Plasmide mit den *adhAP*-Genen wurden pAM104.12 und pAM105.2 genannt und sind in Abbildung 34 aufgeführt.

Tabelle 34: Vergleich Anfangssequenz der Proteine ADH-AP(A) und ADH-AP(G).

Protein	Sequenz (erste 10 Aminosäuren)
ADH-AP(A)	mkaiq ytrig ...
ADH-AP(G)	mkaiq yarig ...

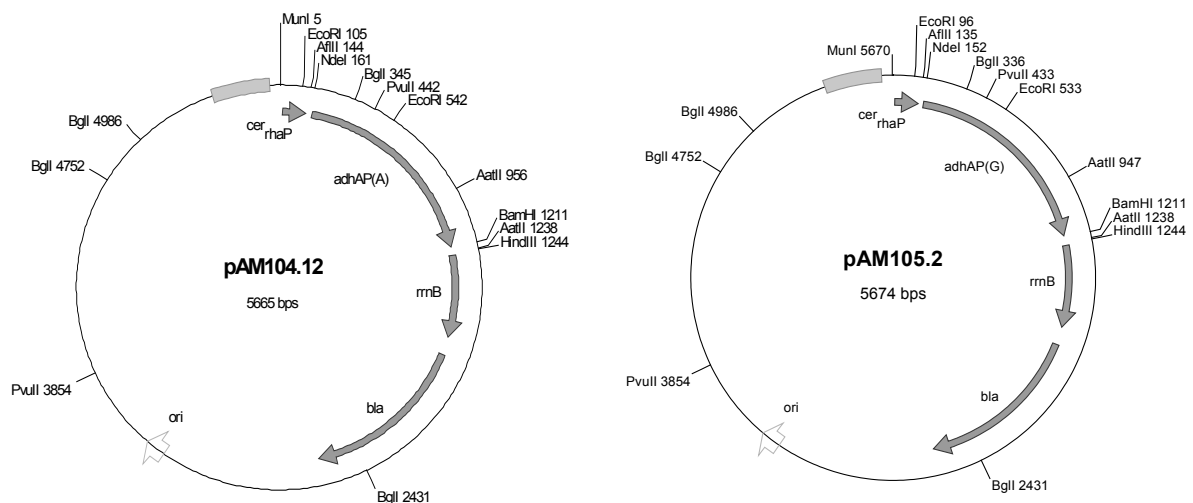


Abbildung 34: Plasmide mit den Genen *adhAP(A)* und *adhAP(G)* (pAM104.12 und pAM105.2).

Mit beiden Plasmiden wurden in verschiedenen *E. coli*-Stämmen (*E. coli* JM109, *E. coli* BW3110 und *E. coli* BL21) Untersuchungen zur Expression durchgeführt und diese mit der Expression von *adhRE* und deren Derivaten verglichen. Für die Koexpression mit *fdhCB* für die Herstellung von Ganzzellkatalysatoren wurde das Gen *adhAP(A)* aus pAM104.12 unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NdeI* und *HindIII* in ein pACYC184-Derivat (pHWG640.12) inseriert und exprimiert. Das Zielplasmid wurde als pAM121.4 bezeichnet.

4.2.3 Expression von *adhRE* und *adhRE*-Derivaten

Wie in Kapitel 4.2.1 aufgeführt, lag das Wildtyp-Gen von ADH-RE auf dem Expressionsvektor pAM94.4 vor. Die Expression von *adhRE* bei 30 °C unter dem Rhamnosepromotor in *E. coli* JM109 pAM94.4 führte, wie schon von Abokitse und Hummel (2003) für die Expression unter einem *tac*-Promotor in *E. coli* JM105 pKK223-3 beschrieben, zu einem bis zu 50 %-igen Anteil an Einschlusskörpern des rekombinant gebildeten Proteins. Zum Auffinden eines höher exprimierten *adhRE*-Gens mit einem höherem Anteil an löslichem rekombinanten Protein im Vergleich zum Wildtyp-Gen, wurden die 43 Transformanten mit der modifizierten Translationsinitiationsregion im jeweiligen Plasmid (z. B. pAM86.6) in *E. coli* JM109 über Nacht in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin mit 0,2 % Rhamnose auf einem Roller inkubiert, nach etwa 16 h 5 OD Zellen geerntet, durch Zellaufschluss mittels Ultraschallstab Zellrohextrakt hergestellt und die Volumenaktivität bestimmt (siehe Kapitel 3.2.7.5). Die Einteilung der Klone erfolgte entsprechend ihrer Volumenaktivität in die im Diagramm aufgeführten Gruppen (siehe Abbildung 35). Von 43 Klonen zeigten 21 dabei eine niedrigere Enzymaktivität im Vergleich zum Stamm mit dem Wildtypgen *E. coli* JM109 pAM94.4, 12 lagen etwa im Bereich des Vergleichsstammes und zehn waren wesentlich stärker aktiv.

Es konnten nur zwei Klone (*E. coli* JM109 pAM83.13 und *E. coli* JM109 pAM86.6) mit mehr als doppelt so hoher Volumenaktivität als *E. coli* JM109 pAM94.4 bei dieser Methode der Induktion ermittelt werden. Andere Klone zeigten weniger bis keine Aktivität, sodass hiermit gezeigt werden konnte, dass Veränderungen in der Translationsinitiationsregion eines Gens Einfluss auf seine Expression haben. Neben den in der Translationsinitiationsregion veränderten Genen wurde von Degussa ein synthetisches *adhRE*-Gen auf dem Plasmid pNO9 bereitgestellt, bei dem die Codon-Usage an *E. coli* angepasst wurde und somit bessere Expressionsergebnisse erwartet wurden (Kontaktadresse: harald.groeger@degussa.com). Das Gen wird im Folgenden als *adhRE*(co) bezeichnet, wobei „co“ für codonoptimiert steht.

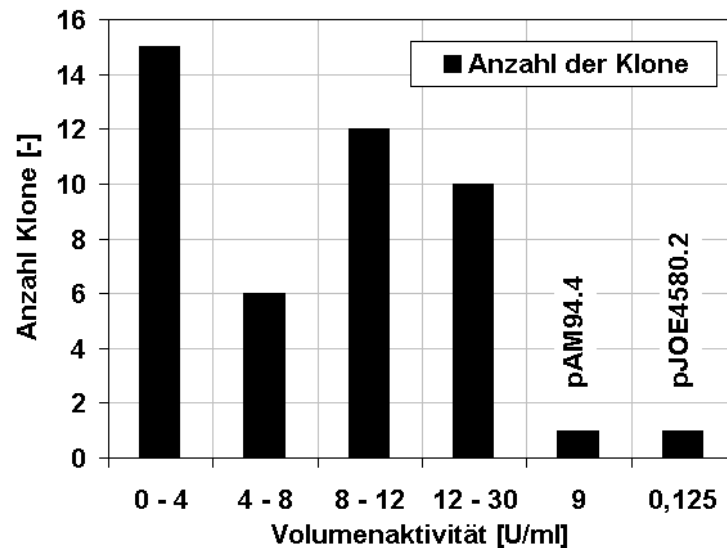


Abbildung 35: Verteilung der Volumenaktivität induzierter *adhRE*-Klone mit veränderter Translationsinitiationsregion in *E. coli* JM109. Zum Vergleich sind die mit *E. coli* JM109 pAM94.4 (Wildtypgen von *adhRE*) und *E. coli* JM109 pJOE4580.2 (*lacZ α*) erhaltenen Enzymaktivitäten angegeben.

Bei Expression der Gene im Schüttelkolben zur Ermittlung der spezifischen Aktivitäten zeigte sich, dass die hohe Volumenaktivität des Klons *E. coli* JM109 pAM83.13 nur bei Induktion im Reagenzglas erzielt wurde. Mit dem Klon *E. coli* JM109 pAM86.6 wurden bis zu 27 U/mg Protein spezifische Aktivität ermittelt (im Durchschnitt 23 U/mg), bei *E. coli* JM109 pAM83.13 nur rund 6 U/mg. Bei der Expression des synthetischen Gens *adhRE*(co) in *E. coli* JM109 pNO9 wurden bis zu 33 U/mg Gesamtprotein spezifische Aktivität (im Durchschnitt 29 U/mg) erzielt. Daher wurde dieses Plasmid pNO9 (bzw. pNO11) für die Expression des synthetischen *adhRE*-Gens in den Ganzzellkatalysatoren weiterhin verwendet. Ein repräsentatives Ergebnis der Aktivitäten, die mit verschiedenen *adhRE*-Derivaten in *E. coli* JM109 (Induktor 0,2 % Rhamnose, Schüttelkulturen, 8 h Induktion, 30 °C) erzielt wurden, ist dazu als Diagramm in Abbildung 36 dargestellt. Als Kontrolle dienten induzierte *E. coli* JM109-Zellen ohne Plasmid zur Bestimmung der Basisaktivität. Die spezifischen Aktivitäten wurden aus Probenahmen von 5 OD Zellen ermittelt. Die induzierte Kontrolle *E. coli* JM109 ohne Plasmid wurde im Diagramm in Abbildung 36 als erste Säule dargestellt, gefolgt vom Wildtypgen (*adhRE*) der ADH aus *R. erythropolis* DSM 43297. Klone mit Mutationen in *adhRE* sind nachfolgend gezeigt. Bei den Schüttelkulturen konnten ebenfalls zwei Klone mit Mutationen in der Translationsinitiationsregion von *adhRE* mit mehr als doppelt so stark exprimierten rekombinanten Enzymen im Vergleich zum Wildtypgen (*E. coli* JM109 pAM94.4) ermittelt werden - *E. coli* JM109 pAM86.6, der bereits in den Rollerkulturen hohe Aktivität gezeigt hatte, und *E. coli* JM109 pAM86.9. In Abbildung 37 sind repräsentative Gele einer SDS-PAGE abgebildet, in

denen die Zellrohextrakte getrennt nach löslichen und unlöslichen Proteinfractionen aufgetrennt wurden. Die Zellrohextrakte wurden mittels Ultraschall aus 5 OD Zellen hergestellt, welche wie in Abbildung 36 beschrieben, 9 h bei 28 °C mit Rhamnose als Schüttelkultur induziert wurden.

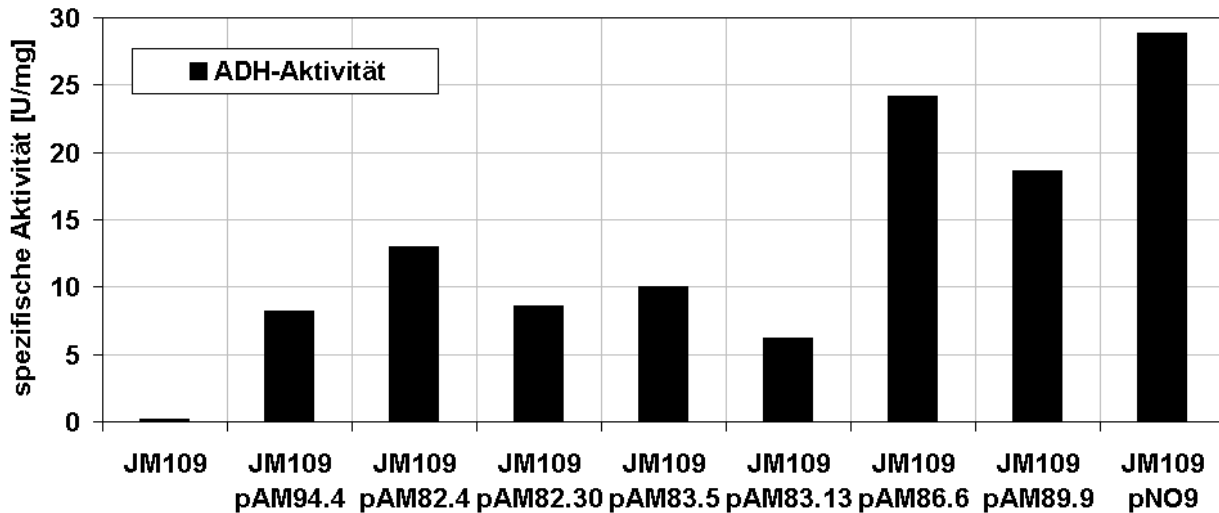


Abbildung 36: Expression von *adhRE* und *adhRE*-Derivaten unter dem Rhamnosepromotor in *E. coli* JM109 (9 h Induktion bei 28 °C) sowie als Kontrolle *E. coli* JM109 mit 0,2 % Rhamnose als Induktor. Als Substrat diente p-Chloracetophenon.

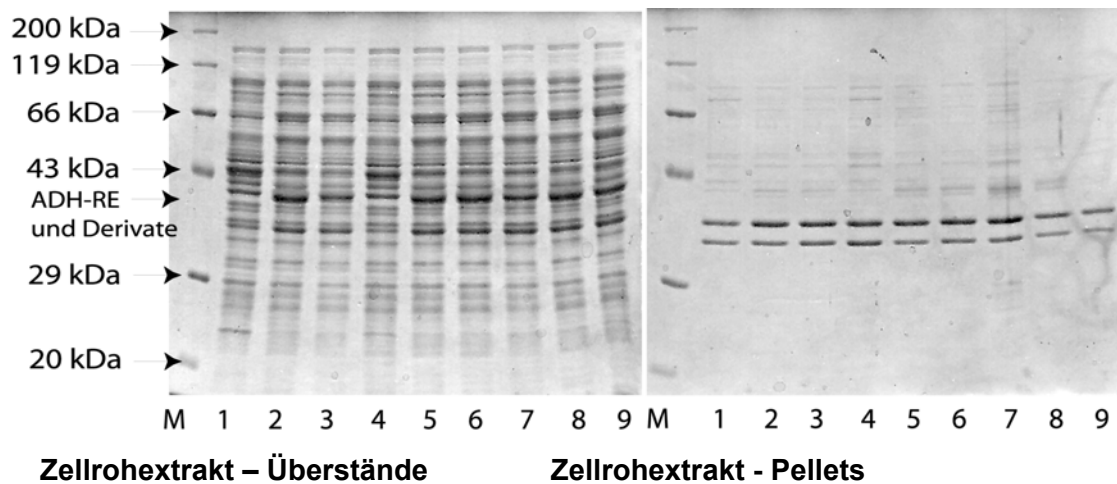


Abbildung 37: SDS-PAGE der Expression ausgewählter *adhRE*-Varianten in *E. coli* JM109 unter dem Rhamnosepromotor im Vergleich zum Wildtypgen in *E. coli* JM109 pAM94.4 und in *E. coli* JM109 ohne *adhRE* als Kontrolle (9 h Induktion bei 28 °C mit 0,2 % Rhamnose, Zugabe von 0,5 mM ZnCl₂ zur Induktion). Spuren: M: Standardproteinmarker von ROTH; 1: *E. coli* JM109; 2: *E. coli* JM109 pNO9 (*adhRE*(co)); 3: *E. coli* JM109 pAM94.4 (Wildtypgen); 4: *E. coli* JM109 pAM82.4; 5: *E. coli* JM109 pAM82.30; 6: *E. coli* JM109 pAM83.5; 7: *E. coli* JM109 pAM83.13; 8: *E. coli* JM109 pAM86.6; 9: *E. coli* JM109 pAM86.9.

Die Bildung von Einschlusskörpern bei der Expression von *adhRE* konnte trotz Änderung der Translationsinitiationsregion und Veränderung der Codon Usage im synthetisch hergestellten *adhRE*(co)-Gen in *E. coli* JM109 pNO9 bei einer Induktionstemperatur von 30 °C nicht signifikant verringert werden. Dazu wurden die Induktionsbedingungen verändert und verschiedene Expressionsstämme getestet. Bei Expression von *adhRE*(co) in *E. coli* JM109 konnte durch Absenken der Induktionstemperatur um zwei Grad auf 28 °C die Bildung von Einschlusskörpern drastisch verringert werden (vergleiche Abbildung 37, Spur 2 und Abbildung 38, Spur 2, jeweils in den Pelletfraktionen). Auch bei Expression der Genderivate von *adhRE* in den beschriebenen Vektoren in *E. coli* BW3110 bei 30 °C und 28 °C und in *E. coli* BL21 bei 22 °C wurden Einschlusskörper gebildet.

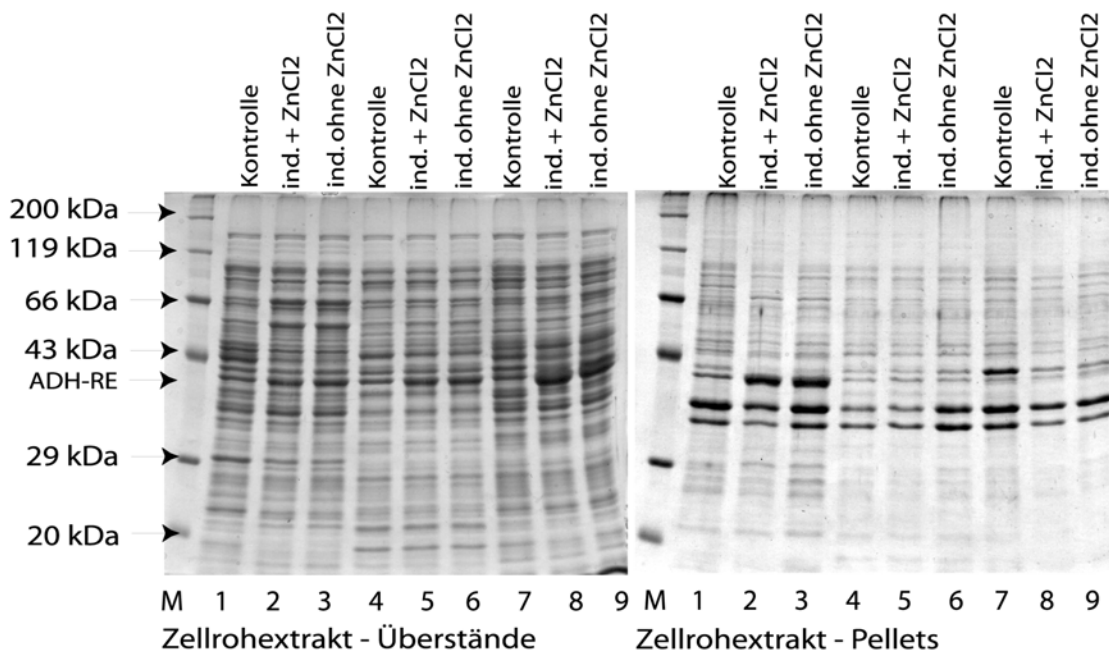


Abbildung 38: Expression von *adhRE*(co) auf dem Plasmid pNO9 in verschiedenen *E. coli*-Stämmen (Spuren 1 bis 3: *E. coli* JM109 pNO9, Spuren 4 bis 6: *E. coli* BW3110 pNO9, Spuren 7 bis 9: *E. coli* BL21 pNO9). Die Art der Induktion ist über den Spuren angegeben: Kontrolle = nicht induziert. ZnCl₂ wurde, wenn angegeben, in einer Konzentration von 0,5 mM zugegeben. *E. coli* JM109 pNO9 wurde jeweils 8 h bei 30 °C induziert, *E. coli* BW3110 pNO9 16 h bei 30 °C und *E. coli* BL21 pNO9 24 h bei 22 °C. Die Markierung der Lauflänge von ADH-RE ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

In Abbildung 38 sind dazu zwei beispielhafte SDS-Gele gezeigt, welche die Expression des synthetisch hergestellten Gens *adhRE*(co) im Plasmid pNO9 in unterschiedlichen Expressionsstämmen mit und ohne Zugabe von 0,5 mM ZnCl₂ zeigt. Die Induktionszeiten ergeben sich aus den für die Stämme typischen Expressionsmaxima mit 8 h für *E. coli* JM109 pNO9, 16 h für *E. coli* BW3110 pNO9 und 24 h für *E. coli*

BL21 pNO9. Als Kontrolle dienten nichtinduzierte Stämme, die aber ZnCl_2 im Kulturmedium enthielten (Spuren 1, 4 und 7). Die Induktion von *E. coli* JM109 pNO9 und *E. coli* BW3110 pNO9 erfolgte hier bei 30 °C, die von *E. coli* BL21 pNO9 bei 22 °C. Anhand der Proteingele kann gezeigt werden, dass ADH-RE wie auch FDH-CB und LDH identisch mit einem *E. coli*-eigenen Protein im SDS-Gel laufen (Vergleich Spuren 1 und 2). Das Laufverhalten entspricht allerdings nicht dem Molekulargewicht, da die Proteinbande bei ca. 40 kDa auftritt, ADH-RE aber nur ein Molekulargewicht von 36,2 kDa besitzt. Es kann weiterhin gezeigt werden, dass unabhängig von der Zugabe von Zinkionen etwa gleiche Mengen rekombinantes Protein gebildet wird (z. B. Spur 2 mit Zink und Spur 3 ohne Zink). Betrachtet man die Expression in den unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen, erfolgt in *E. coli* BW3110 pNO9 und *E. coli* BL21 pNO9 so gut wie keine Bildung von Einschlusskörpern, während in *E. coli* JM109 pNO9 zu etwa 50 % Einschlusskörper von ADH-RE gebildet werden.

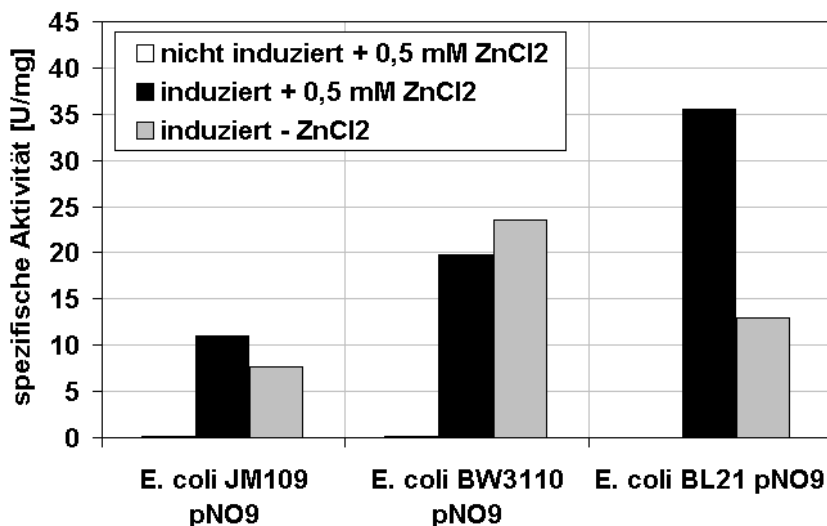


Abbildung 39: Spezifische Aktivitäten von ADH-RE nach Induktion von *adhRE(co)* in *E. coli* JM109 pNO9 (30 °C, 8 h), *E. coli* BW3110 pNO9 (30 °C, 16 h) und *E. coli* BL21 pNO9 (22 °C, 24 h) mit 0,2 % Rhamnose und mit und ohne 0,5 mM ZnCl_2 . Die Kontrolle wurde nicht mit Rhamnose induziert.

Der Einfluss von ZnCl_2 während der Induktion zeigt sich beim Vergleich der spezifischen Aktivitäten, die mit dem Substrat p-Chloracetophenon bestimmt wurden und ist in Abbildung 39 dargestellt. In *E. coli* JM109 pNO9 und *E. coli* BW3110 pNO9 hat die Zugabe von ZnCl_2 keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität, da die im LB-Medium in Form von Spurenelementen enthaltenen Zinkionen wahrscheinlich ausreichen, um in das gebildete rekombinante Protein eingebaut zu werden. In *E. coli* BL21 pNO9 zeigt sich jedoch der Einfluss der Zinkionen. Ohne Zinkchlorid wird eine spezifische Aktivität von 14 U/mg erreicht, mit Zinkchlorid dagegen > 30 U/mg Gesamtprotein. Die im Kulturmedium enthaltenen Zinkionen reichen offensichtlich

nicht aus, um das rekombinante Protein damit zu komplettieren, da in *E. coli* BL21 pNO9 wesentlich mehr ADH-RE gebildet wird als in den beiden Vergleichsstämmen. In Abbildung 39 ist somit auch gezeigt, dass bei Induktion von *adhRE*(co) in *E. coli* JM109 pNO9 und *E. coli* BW3110 pNO9 aufgrund der geringeren Expression im Vergleich zu *E. coli* BL21 pNO9 auf zusätzliche Zugabe von ZnCl_2 verzichtet werden kann.

4.2.4 Expression von *adhAP*(A) und *adhAP*(G)

Die Expression von *adhAP*(A) und *adhAP*(G) wurde in *E. coli* JM109 und *E. coli* BL21 untersucht, wobei die Gene auf den Plasmiden pAM104.12 (*adhAP*(A)) und pAM105.2 (*adhAP*(G)) vorlagen. Im Vordergrund stand zuerst die Ermittlung des höher exprimierbaren Gens und des Stammes mit der höchsten spezifischen Aktivität. Die Geninduktion erfolgte mit und ohne 0,2 % Rhamnose sowie mit und ohne Zugabe von 0,5 mM ZnCl_2 zur Untersuchung des Zinkbedarfs für die Expression. Die Induktionszeit betrug für *E. coli* JM109 8 h bei 30 °C und für *E. coli* BL21 24 h bei 22 °C mit den jeweiligen Plasmiden. Die spezifische ADH-Aktivität wurde mit p-Chloracetophenon wie bei den Untersuchungen mit ADH-RE ermittelt.

In Abbildung 40 sind dazu die Gele einer SDS-PAGE mit den Zellrohextrakten von induzierten (mit und ohne Zugabe von 0,5 mM ZnCl_2) und nichtinduzierten *E. coli* JM109 und *E. coli* BL21 mit pAM104.12 bzw. pAM105.2 gezeigt. Die Induktion von *adhAP*(A) führt unabhängig von der Zugabe von ZnCl_2 zu wesentlich mehr Protein als die von *adhAP*(G) (siehe Markierung durch Pfeil in Abbildung 40). Im Vergleich zwischen den beiden Expressionsstämmen *E. coli* JM109 und *E. coli* BL21 zeigt sich weiterhin, dass unter den genannten Induktionsbedingungen ADH-AP in *E. coli* JM109 zum überwiegenden Teil als Einschlusskörper produziert wird, während in *E. coli* BL21 die Bildung von Einschlusskörpern gar nicht oder nur minimal stattfindet. Neben dem Vergleich der Expression anhand von SDS-PAGE wurden auch die spezifischen Aktivitäten von ADH-AP(A) und ADH-AP(G) verglichen (siehe Abbildung 41). Das in geringeren Mengen produzierte Enzym ADH-AP(G) hat ebenfalls die geringere spezifische Aktivität in beiden Expressionsstämmen. Wie auch bei Expression von *adhRE*(co) in *E. coli* JM109 pNO9 kann bei Expression von *adhAP*(A,G) in *E. coli* JM109 kein signifikanter Unterschied bei der Induktion mit oder ohne Zink festgestellt werden. Bei Expression in *E. coli* BL21 zeigt sich dagegen, dass die Zugabe von 0,5 mM Zinkchlorid die spezifische Enzymaktivität mehr als verdoppeln kann (*E. coli* BL21 pAM104.12) und die im Kulturmedium enthaltenen Spuren von Zink offensichtlich nicht mehr für alle Enzyme ausreichen. ADH-RE (siehe Abbildung 39) und ADH-AP zeigen in den untersuchten Expressionsstämmen ähnlich hohe spezifische Enzymaktivität und dadurch neben der hohen Sequenzidentität beider Proteine auch hier die familiäre Ähnlichkeit.

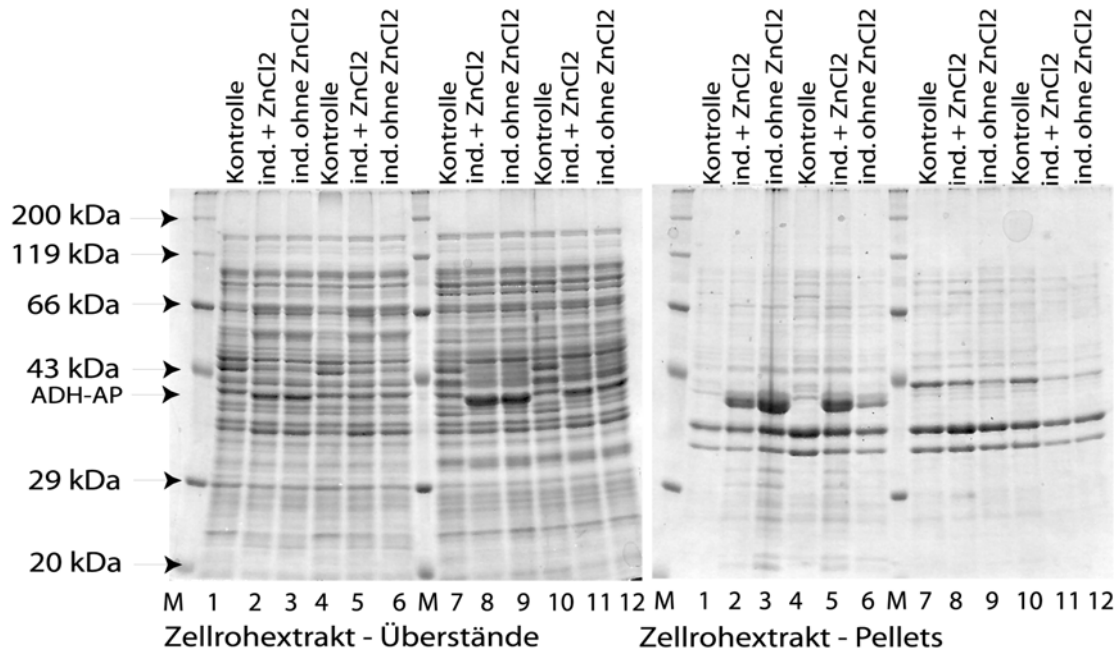


Abbildung 40: SDS-Page mit Zellrohextrakten von nichtinduzierten und induzierten Zellen von den *E. coli*-Stämmen JM109 und BL21 mit den rekombinanten Genen *adhAP(A)* auf pAM104.12 und *adhAP(G)* auf pAM105.2. Die Induktionszeit betrug 8 h für *E. coli* JM109 plus Plasmid bei 30 °C und 24 h für *E. coli* BL21 plus Plasmid bei 22 °C. Kontrolle = nicht induziert. ZnCl₂ wurde, wenn angegeben, in einer Konzentration von 0,5 mM zugegeben. Spuren: M: Standardmarker von Roth, 1-3: *E. coli* JM109 pAM104.12, 4 - 6: *E. coli* JM109 pAM105.2, 7 - 9: *E. coli* BL21 pAM104.12, 10 - 12: *E. coli* BL21 pAM105.2.

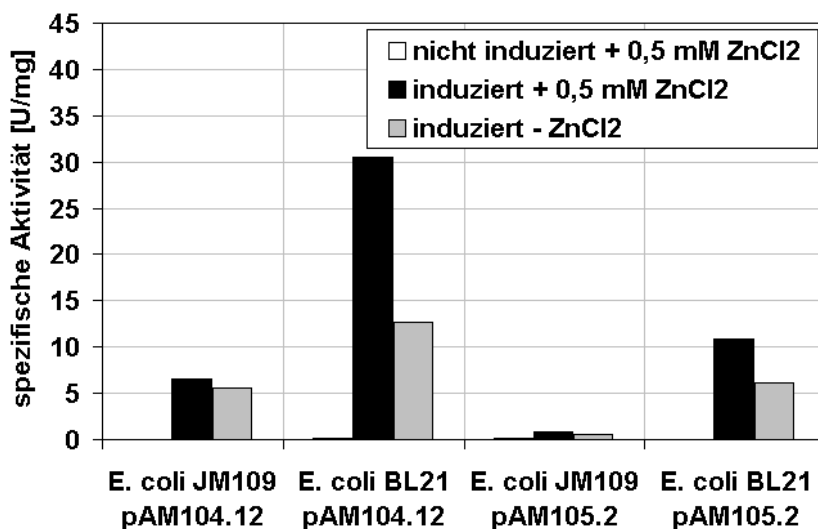


Abbildung 41: Spezifische Aktivitäten von ADH-AP(A) und ADH-AP(G) nach Expression von *adhAP(A)* und *adhAP(G)* in *E. coli* JM109 (8 h bei 30 °C) und *E. coli* BL21 (24 h bei 22 °C) mit und ohne Zugabe von ZnCl₂ zur Induktion.

Für den Einsatz in den Ganzzellkatalysatoren zur Reduktion von p-Chloracetophenon wurde *adhAP(A)* aufgrund der höheren Expression und spezifischen Aktivität von ADH-AP(A) im Vergleich zu ADH-AP(G) verwendet. Für die Koexpression mit *fdhCB* auf pAM3.25 wurde *adhAP(A)* in dem pACYC184-Derivat pHWG640.12 inseriert (Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI*) und das Plasmid als pAM121.4 bezeichnet.

4.2.5 Koexpression von *fdhCB*, *fdhMV* und *sfcA* mit *adhRE(co)* bzw. *adhAP(A)*

Um die Kofaktorregenerierung bei der Umsetzung von p-Chloracetophenon zu p-Chlorphenylethanol sicher zustellen, wurde *adhRE(co)* (vorliegend auf pNO11, Herstellung nicht publiziert) jeweils mit *fdhCB* (auf pAM3.25) und *fdhMV* (auf pAM149.1) in *E. coli* BW3110 koexprimiert. Bei der Koexpression zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Genen der beiden FDHs. Während sich bei *fdhMV* in *E. coli* BW3110 pAM149.1 / pNO11 die spezifische Aktivität um ca. 25 % gegenüber der Einzelexpression in *E. coli* BW3110 pAM149.1 verringerte, trat bei *fdhCB* durch Koexpression mit *adhRE(co)* in *E. coli* BW3110 pAM3.25/pNO11 eine bis zu 85 % geringere spezifische Aktivität im Vergleich zur Einzelexpression in *E. coli* BW3110 pAM3.25 auf (die spezifischen Aktivitäten lagen hier zwischen 0,15 U/mg und 0,18 U/mg). Bei der Koexpression von *fdhCB* und *adhRE(co)* in *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 bei 30 °C traten Einschlusskörper auf. Durch die Expression von *adhRE(co)* auf einem pACYC184-Derivat (pNO11) verringerte sich die spezifische Aktivität um ca. 50 % gegenüber der Expression auf dem pBR322-Derivat pNO9 und lag zwischen 4,5 U/mg und 6 U/mg Gesamtprotein. In Abbildung 42 sind die Zellrohextrakte von induzierten und nichtinduzierten *E. coli* BW3110-Zellen mit *adhRE(co)* und koexprimierter *fdhCB* bzw. *fdhMV* mit SDS-PAGE dargestellt. Die Unterscheidung zwischen FDH-MV (44 kDa) und ADH-RE (36,2 kDa) sollte dabei relativ einfach sein, allerdings konnte im Vergleich zur Einzelexpression von *fdhMV* kein signifikanter Unterschied im Proteinmuster gefunden werden (vergleiche mit Abbildung 10). Die schmale Bande unterhalb der intensiven Proteinbande von FDH-MV in Spur 3 taucht ebenfalls bei Einzelexpression von *fdhMV* auf, erscheint allerdings auf gleicher Höhe wie ADH-RE. Die Unterscheidung von FDH-CB und ADH-RE ist wie im Fall von LDH (39,9 kDa) und FDH-CB schwieriger, da beide Proteinmonomere trotz unterschiedlichem Molekulargewicht (40,3 kDa bzw. 36,2 kDa) ein ähnliches Laufverhalten im Gel haben.

Die Koexpression von *sfcA* und *adhRE(co)* in *E. coli* BW3110 pHWG640.12 / pNO9 wurde ebenfalls als Zwei-Plasmid-System durchgeführt, wobei *sfcA* auf pHWG640.12 und *adhRE(co)* auf pNO9 jeweils unter dem Rhamnosepromotor exprimiert wurden. Mit *sfcA*, mit dem einzeln exprimiert bis zu 40 U/mg (Gesamtprotein) spezifische

Aktivität erreicht werden, wurden bei Koexpression mit *adhRE*(co) noch spezifische Aktivitäten zwischen 9 U/mg und 15 U/mg erreicht. Die spezifischen Aktivitäten von ADH-RE koexprimiert mit *sfcA* in *E. coli* BW3110 pHWG640.12/pNO9 sanken auf 5 U/mg bis 12 U/mg Protein. Es zeigte sich, dass trotz geringerer Kopienzahl des pACYC184-Derivates pHWG640.12 mit *sfcA* die Aktivität des Malic Enzyme immer noch bis zu 40 % höher war als die von ADH-RE und wie im Fall des LDH/Malic Enzyme-Ganzzellkatalysators *E. coli* BW3110 pAM5.22 (siehe Kapitel 4.1.7.2) ein deutlicher Überschuss an kofaktorregenerierendem Enzym vorliegt.

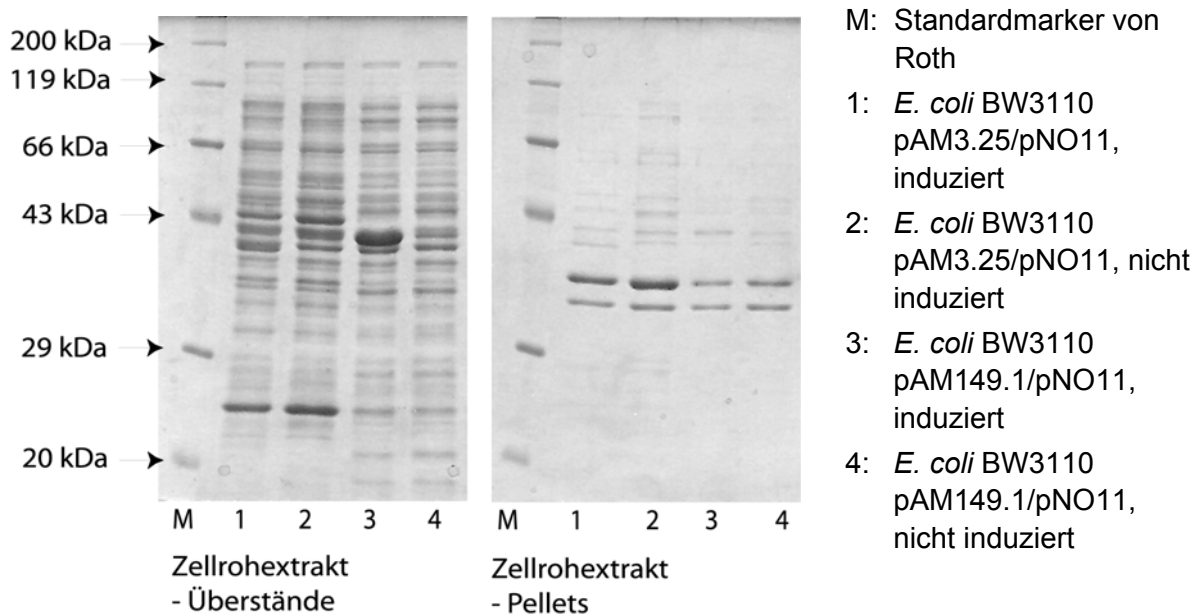


Abbildung 42: Koexpression von *fdhCB* bzw. *fdhMV* mit *adhRE*(co) in *E. coli* BW3110 pAM3.25/pNO11 bzw. *E. coli* BW3110 pAM149.1/pNO11, SDS-Page von Proben nach 16 h Induktion mit 0,2% Rhamnose bei 30 °C als Schüttelkultur.

Neben der Koexpression von *adhRE* in *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 bzw. *E. coli* BW3110 pHWG640.12/pNO9 wurden *fdhCB* (pAM3.25) und *sfcA* (pHWG640.12) auch mit *adhAP*(A) (pAM121.4 bzw. pAM104.12) in *E. coli* BW3110 koexprimiert. Die spezifischen Aktivitäten nach 16 h Induktion bei 30 °C sind in Abbildung 43 gezeigt. Signifikant niedrig ist, wie schon erwähnt, die spezifische Aktivität der ADH-RE bei Koexpression von *adhRE*(co) auf pNO11 mit *fdhCB* im Vergleich zur Koexpression mit *sfcA*. Bei Koexpression von *fdhCB* mit *adhAP*(A) in *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM121.4 wurde jeweils mehr als die doppelte Aktivität der Formiat- und Alkoholdehydrogenase im Vergleich zur Koexpression von *fdhCB* und *adhRE*(co) in *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 unter gleichen Bedingungen ermittelt (Schüttelkultur, 30 °C, 16 h Induktion).

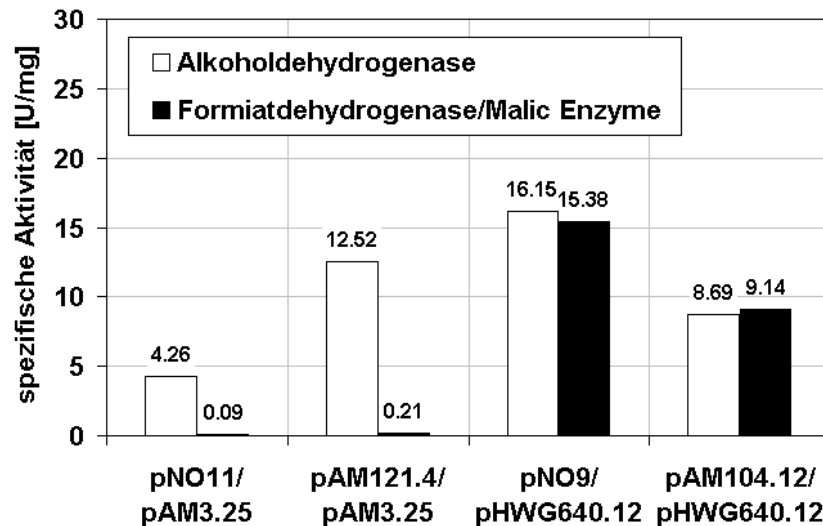


Abbildung 43: Koexpression von *fdhCB* bzw. *sfcA* und *adhRE(co)* bzw. *adhAP(A)* in *E. coli* BW3110 als Zwei-Plasmid-Systeme mit dem Rhamnosepromotor. pNO11 und pNO9 codieren *adhRE(co)*, pAM3.25 codiert *fdhCB*, pHWG640.12 codiert *sfcA* und pAM104.12 und pAM121.4 codieren *adhAP(A)*. Die Expression bzw. Induktion der Gene in *E. coli* BW3110 wurde bei 30 °C durchgeführt. Die Probenahme erfolgte nach 16 h mit 5 OD Zellen.

4.2.6 Hochzelldichtefermentation des Ganzzellkatalysators *E. coli* BW3110 pAM3.25/pNO11 nach Wilms et al. (2001)

Wie schon beim Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25/pAM10.1 für die Herstellung von L-*tert*-Leucin wurde auch mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 eine Hochzelldichtefermentation durchgeführt, um für die weiteren Experimente Zellen mit konstanten Eigenschaften verwenden zu können. Aus den Erfahrungswerten der bisherigen Fermentationen und den Schüttelkolbenversuchen wurden für FDH-CB bis zu 0,17 U/mg und für ADH-RE bis zu 6 U/mg Gesamtprotein erwartet. Die Fermentation lief analog zu denen des LDH/FDH-CB-Ganzzellkatalysators *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 ab (siehe Kapitel 4.1.8.2). Die Vorkulturen wurden mit Antibiotika bei 30 °C angezogen und dann die Batchphase der Fermentation ebenfalls bei 30 °C ohne Antibiotikum durchgeführt. Die Induktion der Genexpression sowie der Start der Fedbatchphase mit exponentieller Zufütterung von Feed I und Feed II erfolgte nach 24 h Batchkultivierung. Die Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt die Glucose des Batchmediums verbraucht und eine optische Dichte von 30 bei 600 nm erreicht. Während der Induktionszeit wurden jede zweite Stunde Proben genommen, die Zellen aufgeschlossen und die spezifischen Aktivitäten bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 44 und Abbildung 45 dargestellt. Es werden die Verläufe der Fermentation bezüglich der optischen Dichte und der spezifischen Aktivitäten beider Enzyme

fischen Aktivitäten beider Enzyme gezeigt. Die Zelldichte stieg dabei während der exponentiellen Zufütterung bis 16 h nach Induktionsstart nahezu linear, um dann gegen Ende der Fermentation bis zum 20 h-Wert exponentiell anzusteigen. Danach wurde das Wachstum wieder geringer, da sich die pH-Regelung destabilisierte. Der pH-Wert sank in den letzten zwei Stunden der Induktion bis auf pH 6,4 ab. Die spezifische Aktivität von FDH-CB war höher als erwartet und erreichte ca. 0,3 U/mg Gesamtprotein gegen Mitte der Fedbatchphase. Die Aktivität veränderte sich dann bis zum Abbruch der Fermentation nicht mehr signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte die spezifische Aktivität von ADH-RE einen ungewöhnlichen Verlauf. Sie nahm bis ca. 6 h nach Induktion zu bis auf ca. 0,3 U/mg, um dann abzusinken und erst nach 10 h Induktionszeit wieder anzusteigen. Erst in den letzten vier Stunden der Fermentation gab es einen exponentiellen Anstieg der Aktivität der ADH-RE.

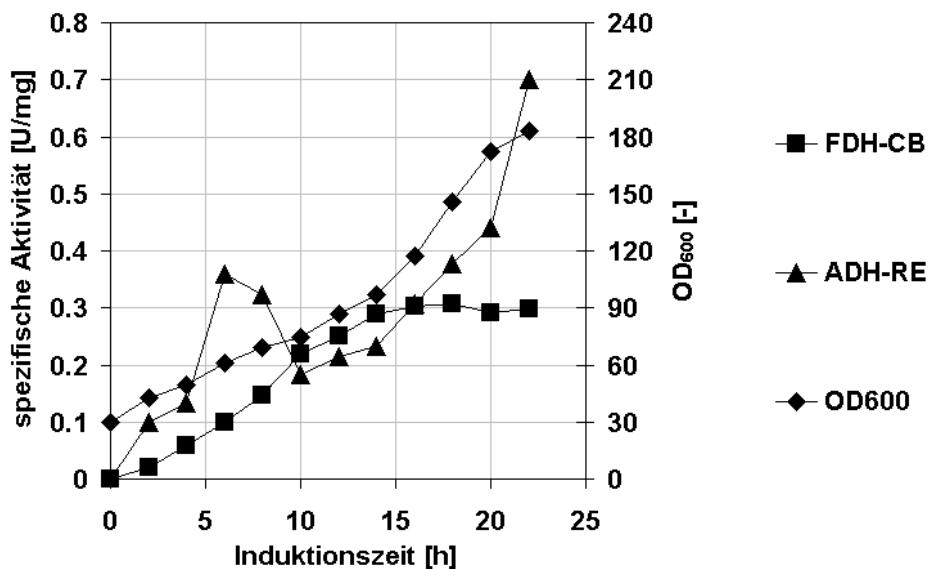


Abbildung 44: Ergebnis der Hochzelldichtefermentation von *E. coli* BW3110 pAM3.25/pNO11. Verlauf der Fermentation: Zunahme der optischen Dichte der Biomasse sowie der spezifischen Aktivitäten von FDH-CB und ADH-RE (Sekundärachse).

Eine der Ursachen der niedrigen ADH-Aktivität kann Plasmidverlust sein, der allerdings aufgrund der stabilisierenden *cer*-Site nicht auftreten dürfte (Collom et al., 1990; Wilms et al., 2001). Derivate des pACYC184-Plasmides sind jedoch in der Regel auch ohne Zugabe von Antibiotikum stabil, sodass eine zusätzliche *cer*-Region das Gegenteil bewirken könnte. Der Einbau der *cer*-Region könnte aber auch zu nah am Plasmidreplikationsursprung erfolgt sein, sodass im Allgemeinen die Replikation geringer ist und ohne Selektionsdruck noch stärker abnimmt. Eine weitere Möglichkeit für die unerwartet geringe spezifische ADH-Aktivität könnten des weiteren Interaktionen zwischen den Synthesen beider unter dem Rhamnosepromotor kontrollierten Enzyme sein.

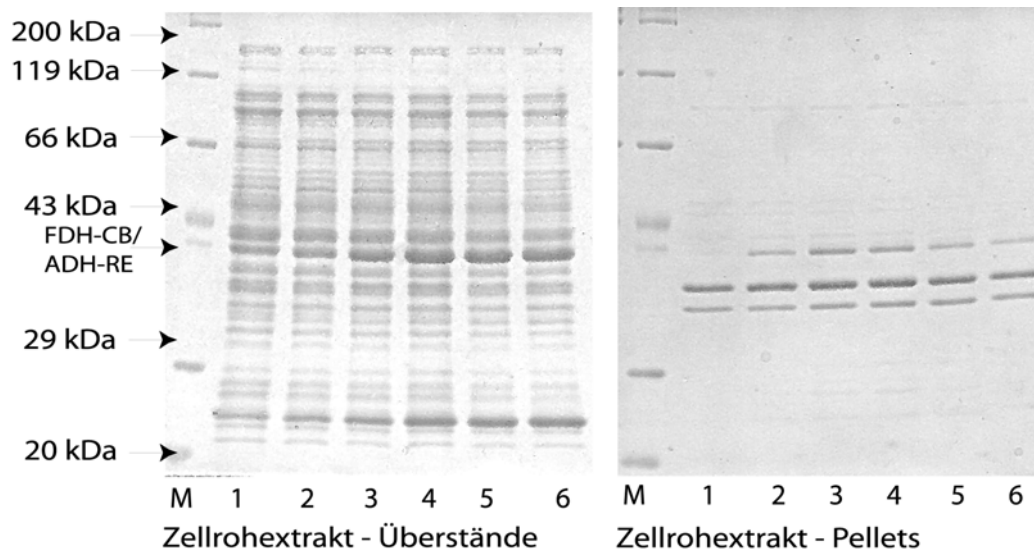


Abbildung 45: SDS-PAGE von Proben der Hochzelldichtefermentation (Probennahmen während der Induktionsphase) von *E. coli* BW3110 pAM3.25/pNO11. SDS-Gele: M: Standardmarker von ROTH; 1: 2 h Induktion; 2: 6 h Induktion; 3: 10 h Induktion; 4: 14 h Induktion; 5: 18 h Induktion; 6: 22 h Induktion. (a) lösliche Proteinfraction, b) unlösliche Proteinfraction).

Um einen Plasmidverlust ausschließen zu können, wurde von der nach 12 h entnommenen Biomasse eine Verdünnung von 10^{-8} angefertigt und davon 100 μ l auf einer LB₀-Platte ausplattiert. Auf dieser Platte konnten 25 Kolonien gezählt werden, das entspricht $2,5 \times 10^{10}$ Zellen pro ml Fermentationsbrühe. Alle 25 Kolonien wurden nochmals auf LB-Platten überimpft, die entweder kein Antibiotikum, Ampicillin oder Chloramphenicol in den üblichen Konzentrationen enthielten. Das Ergebnis war aufgrund der vorliegenden Daten nicht überraschend: 9 der 25 Kolonien, das heißt 36 %, besaßen keine Resistenz gegen Chloramphenicol und hatten vermutlich das Plasmid pNO11, das *adhRE*(co) codiert, verloren. Die Ampicillinresistenz war bei allen Kolonien erhalten geblieben. Zudem gab es auch Anhaltspunkte für eine Temperaturschwankung während der Fermentation, da ADH-RE zum Teil als Einschlusskörper gebildet wurde, dessen Menge erst gegen Ende der Fermentation – also mit steigender Aktivität – wieder abnahm (siehe Abbildung 45, Zellrohextrakt - Pellets).

Die spezifischen Aktivitäten der beiden Enzyme lagen zum Fermentationsabbruch bei 0,3 U/mg für die FDH und 0,7 U/mg für die ADH, die damit weniger als 10 % der erwarteten Aktivität erreichte. In Abbildung 45 wurden die Rohextrakte aus jeweils 10 OD Zellen der Probennahmen nach 2 h, 6 h, 10 h, 14 h, 18 h und 22 h der Induktionsphase der Fermentation mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dargestellt. Lösliche und unlösliche Proteinfractionen sind getrennt abgebildet. In der Abbildung der unlöslichen Proteinbestandteile ist die Bildung von Einschlusskörpern zu erkennen, jedoch nicht, zu welchem Enzym sie gehören, da beide Enzyme ähnliche Molekulargewichte

haben (FDH-CB: 40,3 kDa, ADH-RE: 36,2 kDa) und schlecht auftrennbar sind. Die Zellausbeute lag bei mehr als 1,4 kg Biofeuchtmasse nach der Zellernte. Die Biomasse wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

4.2.7 Stabilitätsuntersuchungen zum Plasmid pNO11

Anhand der Fermentationsdaten und der zuvor durchgeführten Schüttelkolbenversuche konnte gezeigt werden, dass *adhRE* auf pNO11 nicht zuverlässig exprimiert wurde bzw. das Plasmid ohne Antibiotikazugabe instabil war und verloren ging. Bei Koexpression von *adhRE* mit *sfcA* sollte das Problem nicht auftreten, da *adhRE* auf einem pBR322-Derivat (pNO9) und nicht auf einem modifizierten pACYC184-Derivat codiert war.

Zur Stabilitätsuntersuchung wurde *adhRE* von pNO11 zuerst in das pACYC184-Derivat pHWG640.12 mit *NdeI/HindIII* inseriert, indem das Gen des Malic Enzyme (*sfcA*) von pHWG640.12 ersetzt wurde. Das Zielplasmid wurde als pAM160.1 bezeichnet. Mit pAM160.1 wurde *adhRE*(co) sowohl einzeln als auch mit *fdhCB* koexprimiert und mit den Expressionsdaten von pNO11 verglichen (siehe Abbildung 46). Die Expressionsversuche wurden in *E. coli* BW3110 durchgeführt, da dieser Stamm für die Fermentation des Ganzzellkatalysators verwendet wurde. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivitäten von ADH-RE einzeln (*E. coli* BW3110 pNO11 bzw. *E. coli* BW3110 pAM160.1) und mit *fdhCB* koexprimiert (*E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 bzw. *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1) wurden die Zellen mit den jeweiligen Plasmiden dazu in 50 ml LB-Medium mit Antibiotika 16 h mit 0,2 % Rhamnose bei 30 °C induziert, 5 OD Zellen entnommen und die spezifischen Aktivitäten bestimmt. Dabei wurden schon bei der Einzelexpression von *adhRE* deutliche Unterschiede sichtbar. Während mit pNO11 eine spezifische Aktivität etwa 13,5 U/mg Gesamtprotein erreicht wurde, konnte mit pAM160.1 eine spezifische Aktivität von 28,3 U/mg ermittelt werden. Eine derartige Verbesserung der ADH-RE-Aktivität konnte auch bei Koexpression mit *fdhCB* gezeigt werden. In Kombination mit pAM3.25 konnte mit dem aus pNO11 gebildeten Genprodukt ADH-RE eine spezifische Aktivität von etwa 4,5 U/mg erreicht werden, während mit pAM160.1 etwa 16 U/mg erreicht wurden. Einen Unterschied gab es auch bei den spezifischen Aktivitäten von FDH-CB. Diese konnten von 0,1 U/mg auf 0,2 U/mg gesteigert werden. In Abbildung 46 ist das Ergebnis graphisch dargestellt. Die Steigerung der ADH-RE-Aktivität durch Insertion von *adhRE*(co) in ein anderes pACYC184-Derivat lässt vermuten, dass bei der Plasmidkonstruktion von pNO11 der Abstand der *cer*-Region vom Replikationsursprung nicht beachtet und zu gering angesetzt wurde, wodurch es zu Problemen bei der Plasmidreplikation kommt. Das drückt sich auch in der langsameren Vermehrung von *E. coli* BW3110 mit dem Plasmid pNO11 und besonders mit pAM3.25 und pNO11 gemeinsam unter Selektionsbedingungen aus.

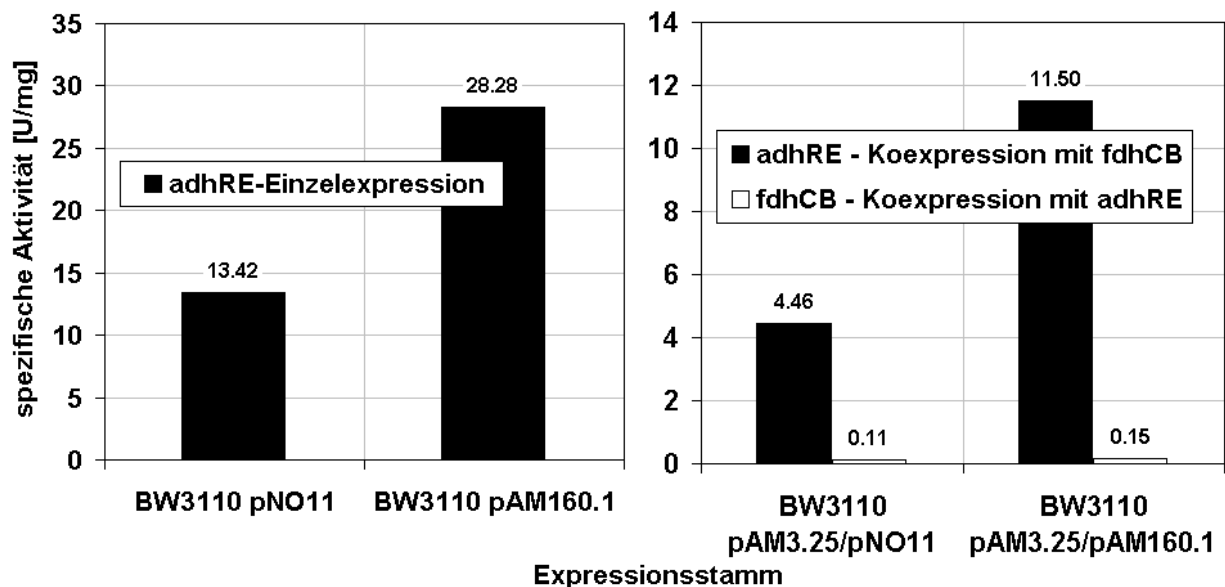


Abbildung 46: Unterschiede in der Expression von *adhRE*(co), das in zwei unterschiedlichen pACYC184-Derivaten inseriert war, mit und ohne Koexpression von *fdhCB* in pAM3.25 in *E. coli* BW3110. Die Induktionszeit betrug jeweils 16 h bei 30 °C.

Aufgrund der höheren spezifischen Aktivitäten wurden ebenfalls Zellen von *E. coli* BW3110 pAM3.25/pAM160.1 für Ganzzellumsetzungen von p-Chloracetophenon eingesetzt und die Ausbeuten der Biokatalysen miteinander verglichen, wobei keine Hochzelldichtefermentation mehr durchgeführt wurde, sondern die Zellen von *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 für die Ganzzellkatalysen als Schüttelkulturen gezüchtet wurden.

4.2.8 Stabilität Enzyme ADH-RE, FDH-CB, FDH-MV und Malic Enzyme gegenüber p-Chloracetophenon und p-Chlorphenylethanol

Bei der Herstellung von sekundären Alkoholen aus den korrespondierenden Ketoverbindungen findet die Biokatalyse unter stark inhibierenden und denaturierenden Bedingungen für Proteine statt. Das äußert sich in der Bildung eines weißen Niederschlags oder der Bildung weißlichen Schleims während der Reaktion. Ein Einfluss auf die an der Biokatalyse beteiligten Enzyme ist daher nicht auszuschließen. Speziell bei FDH-CB ist eine Intoleranz gegenüber sekundären Alkoholen bekannt. In Vorversuchen, die in 1 ml Gesamtvolumen in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen im Überkopfröller bei 30 °C durchgeführt wurden, konnte schon beobachtet werden, dass im Gegensatz zur *L-tert*-Leucin-Herstellung vollständige Umsetzungen bei Substratkonzentrationen > 200 mmol/l schwierig zu erreichen sind. Daher wurden mit allen beteiligten Enzymen Stabilitätstests bei verschiedenen p-Chloracetophenon-

und p-Chlorphenylethanol-Konzentrationen durchgeführt. Die entsprechenden Gene wurden dazu einzeln in *E. coli* BW3110 (*E. coli* BW3110 pAM3.25, *E. coli* BW3110 pNO9, *E. coli* BW3110 pHWG640.12, *E. coli* BW3110 pAM149.1) exprimiert und die Zellen jeweils in 10 OD-Aliquots in 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5 aufgeschlossen. Die im Rohextrakt enthaltenen Enzymeinheiten (U/l) waren vergleichbar mit den bei Degussa eingesetzten Enzymmengen an aufgereinigtem Enzym für die Biokatalysen. Zum löslichen Proteinanteil des Rohextraktes wurden p-Chloracetophenon oder p-Chlorphenylethanol in den Konzentrationen 100 mmol/l, 300 mmol/l und 600 mmol/l zugegeben und die Proben bei 30 °C im Überkopfröhrer inkubiert. Als Kontrollen dienten Rohextrakte ohne Zugabe einer organischen Verbindung.

Die Inkubation mit p-Chloracetophenon in den Konzentrationen 100 mM, 300 mM und 600 mM führte bei allen Enzymen zu einem vergleichsweise langsamen Verlust der spezifischen Aktivität bzw. der Volumenaktivität. Drastischer war dagegen der Unterschied zwischen den Enzymstabilitäten bei Inkubation mit p-Chlorphenylethanol in verschiedenen Konzentrationen. Für die Aktivitätstests wurden jeweils 5 - 50 µl Proben entnommen und laut Messprotokoll untersucht.

In Abbildung 47 sind die Ergebnisse der Stabilitätstests mit p-Chloracetophenon mit den Enzymen Malic Enzyme und FDH-CB dargestellt. Diese zeigen, dass eine p-Chloracetophenon-Konzentration von 100 mmol/l die FDH-Aktivität in den ersten sechs Stunden nicht negativ beeinflusst, während höhere Konzentrationen schon nach zwei Stunden zu Aktivitätsverlusten führen. Bereits bei 300 mmol/l besitzt das Enzym nach 6 h nur noch 20 % seiner Anfangsaktivität. Bei Koexpression der Gene, bei denen die spezifische Aktivität der Zellen weit geringer ist als bei Einzelexpression, wäre FDH-CB damit nahezu inaktiv. Malic Enzyme verliert bereits bei allen getesteten Konzentrationen des ADH-Substrates nach 3 h an Aktivität und nach 6 h Inkubation konnten nur noch 40 % der Aktivität der Kontrolle ohne ADH-RE-Substrat ermittelt werden. Der selbe Test wurde auch mit ADH-RE gemacht, wobei *adhRE* durch *E. coli* BW3110 pNO9 exprimiert wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 48 und Abbildung 49 dargestellt und zeigt, dass das Enzym zwar gegenüber seinem Substrat stabil, aber gegenüber seinem Produkt instabil ist.

Malic Enzyme sowie FDH-CB und FDH-MV wurden ebenfalls auf Stabilität gegenüber dem ADH-Produkt p-Chlorphenylethanol in den gleichen Konzentrationen und unter den gleichen physikalischen Bedingungen wie mit p-Chloracetophenon getestet. Bei FDH-CB (Abbildung 50) und Malic Enzyme (Abbildung 52) zeigte sich bereits nach einer Stunde Inkubation ein mindestens 25 %-iger Verlust der spezifischen Aktivität und eine komplette Inaktivierung nach spätestens vier Stunden Inkubation. Je höher die Konzentration von p-Chlorphenylethanol war, umso schneller erfolgte die Enzyminaktivierung.

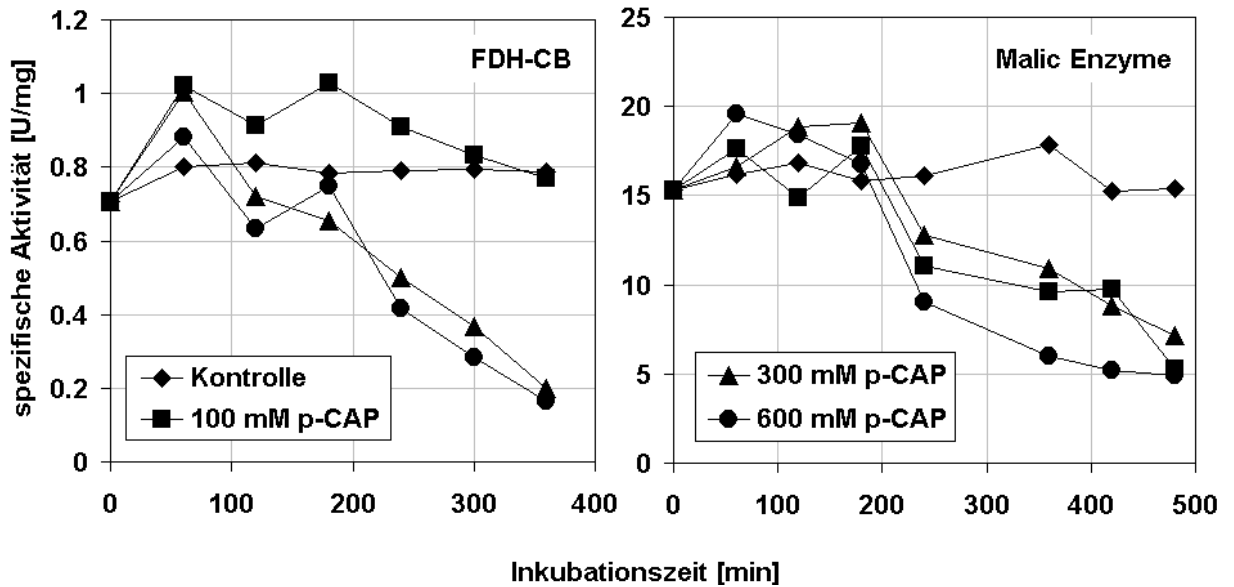


Abbildung 47: Stabilität von FDH-CB und Malic Enzyme, dargestellt anhand der Ermittlung der spezifischen Restaktivität gegenüber verschiedenen Konzentrationen des ADH-Substrates p-Chloracetophenon im Vergleich zu einer Kontrolle ohne p-Chloracetophenon. Es wurden Zellrohextrakte von 10 OD Zellen aus *E. coli* BW3110 pAM3.25 und *E. coli* BW3110 pHWG640.12 verwendet. Die Inkubation wurde bei 30 °C in 1 ml Reaktionsvolumen im Überkopffroller durchgeführt. Die Probennahme erfolgte stündlich.

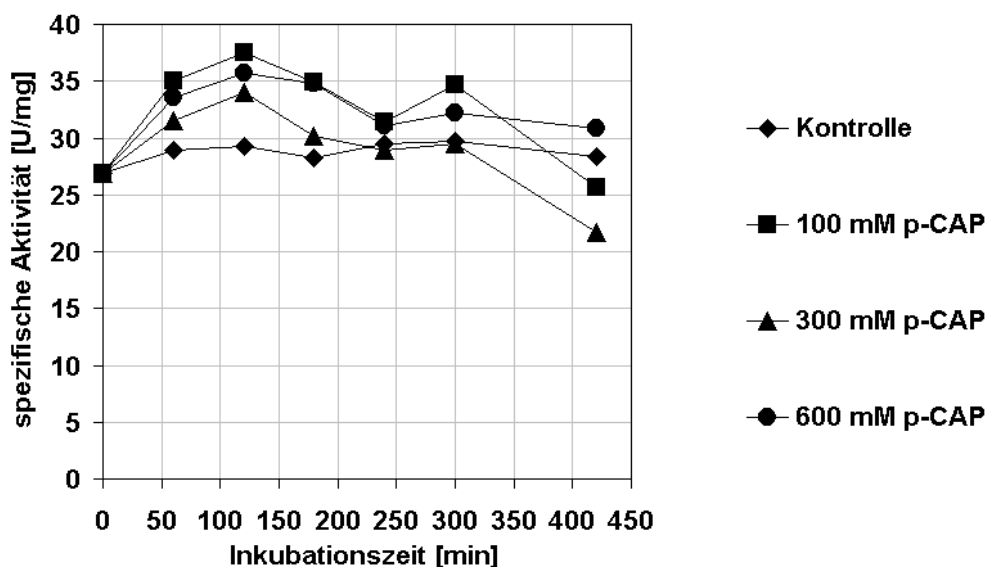


Abbildung 48: Stabilitätstest von ADH-RE (im Zellrohextrakt von induziertem *E. coli* BW3110 pNO9) mit p-Chloracetophenon in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen (1 ml Reaktionsvolumen) bei 30 °C im Überkopffroller.

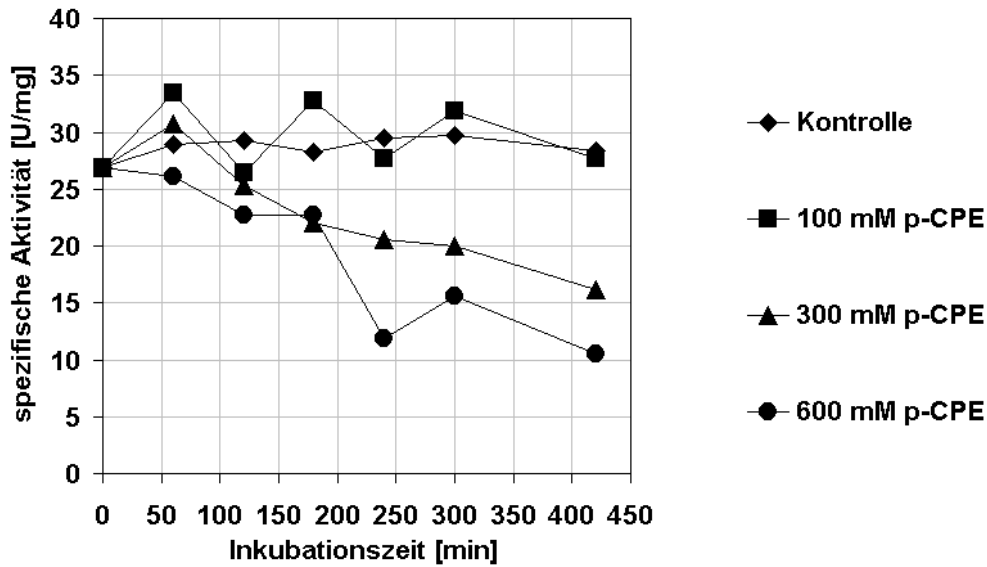


Abbildung 49: Stabilitätstest von ADH-RE (mit Zellrohextrakt von induziertem *E. coli* BW3110 pNO9) mit p-Chlorphenylethanol in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen (1 ml Reaktionsvolumen) bei 30 °C im Überkopffroller.

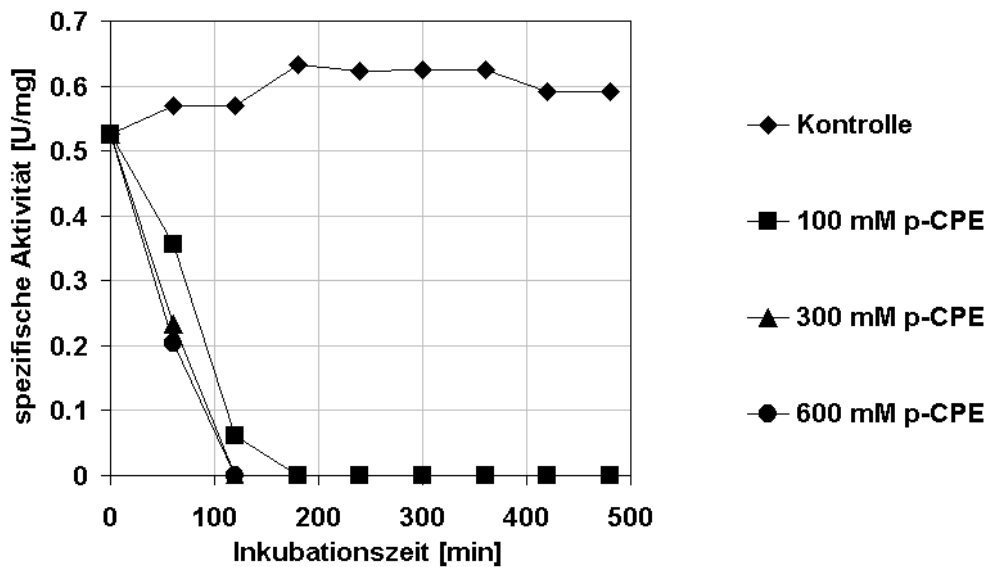


Abbildung 50: Stabilität von FDH-CB (Zellrohextrakt aus induzierten Zellen von *E. coli* BW3110 pAM3.25) bei unterschiedlichen p-Chlorphenylethanol-Konzentrationen in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen (1 ml Reaktionsvolumen) bei 30 °C im Überkopffroller.

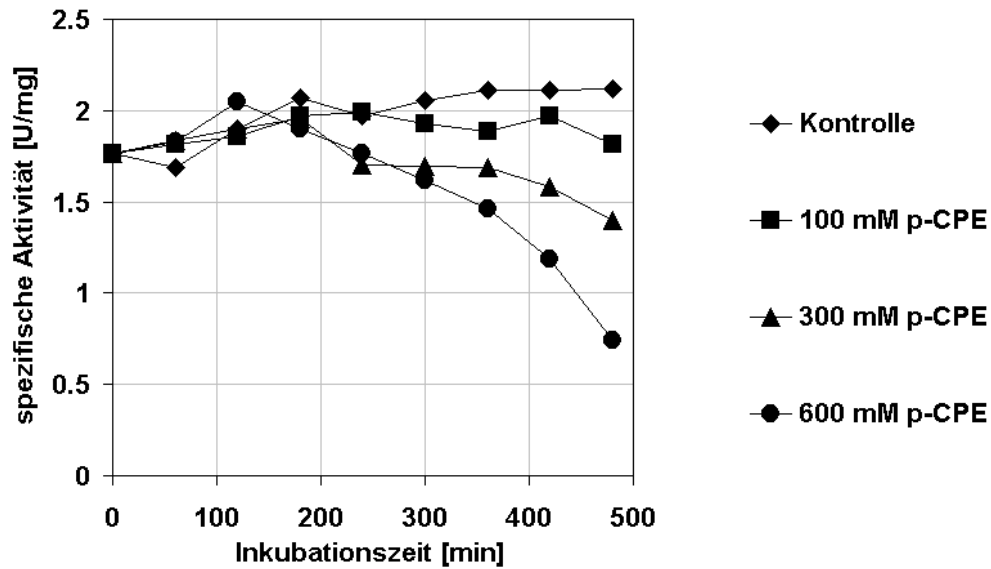


Abbildung 51: Stabilität von FDH-MV (Zellrohextrakt aus induzierten Zellen von *E. coli* BW3110 pAM149.1) bei unterschiedlichen p-Chlorphenylethanol-Konzentrationen in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen (1 ml Reaktionsvolumen) und 30 °C im Überkopffroler.

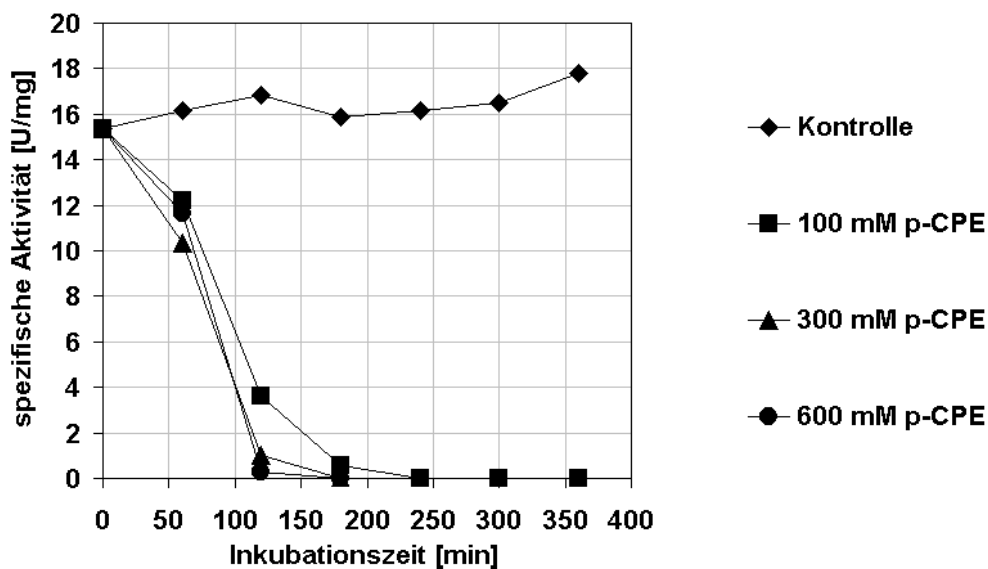


Abbildung 52: Stabilität von Malic Enzyme (Zellrohextrakt aus induzierten *E. coli* BW3110 pHWG640.12) gegenüber dem Produkt p-Chlorphenylethanol in verschiedenen Konzentrationen bei 30 °C in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen (1 ml Reaktionsvolumen).

Trotz der schnellen Inaktivierung von FDH-CB (Abbildung 50) durch das Produkt sollte selbst bei höheren p-Chloracetophenon-Konzentrationen ein beträchtlicher Umsatz erreicht werden, da zumindest die Reaktionsgeschwindigkeiten zu Reakti-

onsbeginn gleich sein sollten, wenn FDH-CB noch nicht durch das Reaktionsprodukt p-Chlorphenylethanol inaktiviert ist. Um dies zu untersuchen, wurde eine Substratkonzentration von 200 mmol/l gewählt und Na-Formiat wieder im fünffachen Überschuss zugegeben (1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäße, 1 ml Reaktionsvolumen, 30 °C, Überkopfröller). Als Biokatalysator wurden Zellen von *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 aus Schüttelkulturen eingesetzt. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit 1,5 Vol. % Toluol in der Reaktionslösung. Nach 8 h waren 67 mmol/l p-Chloracetophenon und nach 22 h 75 mmol/l p-Chloracetophenon umgesetzt, das heißt, bezogen auf das umgesetzte Substrat blieb die Menge gebildetes p-Chlorphenylethanol nach der 8 h-Probennahme etwa gleich, was auf eine Inaktivierung der Enzyme hindeutet. Da innerhalb der ersten 8 h der Reaktion die Zellen verklumpen, wurde vermutet, dass die Art der Reaktionsansätze nicht optimal für Biotransformationen ist, bei denen die Ganzzellkatalysatoren denaturiert werden. Vor allem die starke Verklumpung des Zellproteins während der Reaktion könnte neben der Enzyminaktivierung auch zu einer stark eingeschränkten Diffusion von Substraten und Kofaktoren zu den Enzymen führen. In Kapitel 4.2.9 wird daher genauer auf die Optimierung der Umsetzungen von p-Chloracetophenon zu p-Chlorphenylethanol mit verschiedenen Ganzzellkatalysatoren eingegangen.

4.2.9 Reaktionsoptimierung

4.2.9.1 Zugabe von NAD⁺ zum Reaktionsansatz und Erhöhung des Reaktionsvolumens

In den Vorversuchen in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen konnte gezeigt werden, dass durch das Reaktionsprodukt p-Chlorphenylethanol eine Denaturierung des Zellproteins erfolgte. Da sowohl bei Umsetzungen von p-Chloracetophenon mit dem FDH-CB/ADH-RE-Ganzzellkatalysator als auch mit dem FDH-MV/ADH-RE-Ganzzellkatalysator gleiche Umsatzergebnisse erreicht wurden, könnte die limitierte Diffusion der Substrate zu den Enzymen in den verklumpten Zellen eines der wichtigsten Probleme bei der Reaktionsdurchführung sein.

Ein erster Schritt war die Zugabe von NAD⁺ zum Reaktionsansatz in einer Endkonzentration von 5 mmol/l zu Beginn der Reaktion, um einen deutlichen Effekt in der Reaktionsbeschleunigung und Erhöhung des Substratumsatzes des p-Chloracetophenon erkennen zu können. In 1,5 ml-Eppendorfgläsern konnte jedoch bei einer Substratkonzentration von 200 mmol/l p-Chloracetophenon die Produktbildung nur auf 140 mmol/l verdoppelt werden (Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11: 100 g/l Biofeuchtmasse aus induzierter Schüttelkultur, 30 °C Reaktionstemperatur, Pufferung mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, 1 M Natriumformiat).

at). Nach etwa 8 h Reaktion wurde kaum noch Produkt gebildet und eine starke Verklumpung des Zellproteins beobachtet.

Um eine bessere Durchmischung der Reaktionsansätze zu erreichen, wurden größere Ansätze mit 10 ml Reaktionsvolumen gewählt, bei denen die Durchmischung mit Magnetrührern gesteuert wurde (siehe Abbildung 53).

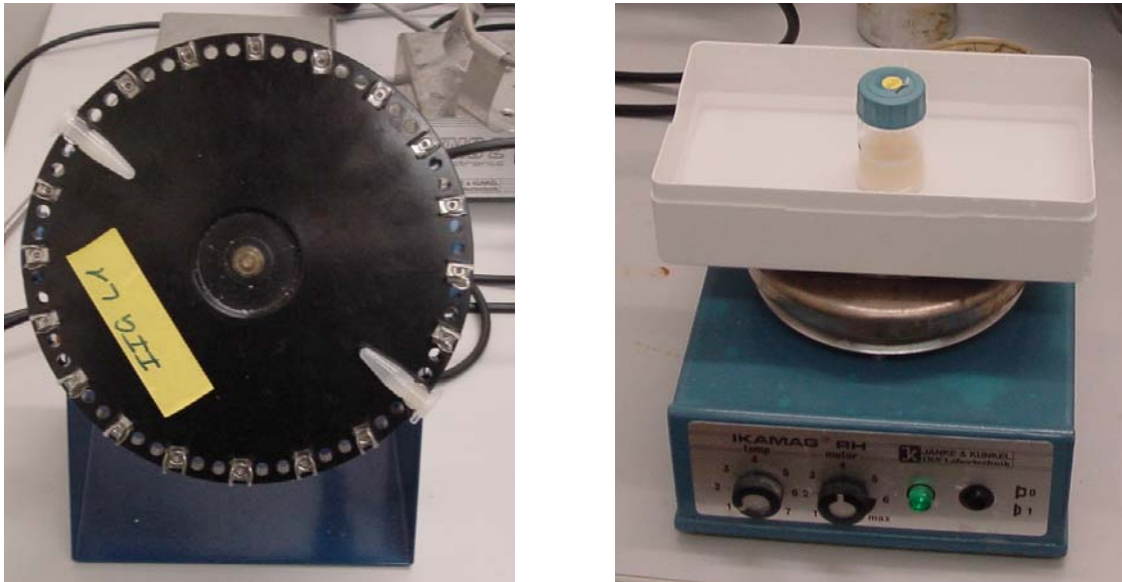


Abbildung 53: Alter und neuer Versuchsaufbau zur Herstellung von p-Chlorphenylethanol mit ganzen Zellen.

Für den Startversuch wurde eine Substratkonzentration von 250 mmol/l p-Chloracetophenon gewählt, die Konzentration von Natriumformiat lag bei 1,25 mol/l. Die Zellkonzentration wurde auf 100 g/l Biofeuchtmasse festgelegt, die Reaktionstemperatur lag bei 30 °C, der Anfangs-pH-Wert bei pH 7. Die Temperierung und Stabilisierung der Temperatur im Wasserbad erfolgte mittels Heizplatte und gekoppelter Temperaturmesssonde. Das Wasserbad mit den Reaktionsgefäßen wurde auf die Heizplatte mit Magnetrührfunktion gestellt, durch die auch die Rührgeschwindigkeit gesteuert wurde (550 rpm). Je Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25/pNO11 und *E. coli* BW3110 pAM149.1/pNO11 wurden zwei Ansätze gestartet. Zu jeweils einem wurde nach vier Stunden Reaktionszeit 10 mmol/l NAD^+ zugegeben, während der andere Ansatz als Kontrolle ohne NAD^+ -Zugabe diente. Das Ergebnis war signifikant und ist in Abbildung 54 gezeigt. Bei NAD^+ -Zugabe gab es keine Unterschiede am Ende der Produktbildung, es wurde mit beiden Ganzzellkatalysatoren bei Zugabe von 10 mM NAD^+ ein nahezu vollständiger Umsatz erreicht. Kleine Unterschiede zeigen sich nur in der Geschwindigkeit der Umsetzungen, wobei der Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM149.1 / pNO11 p-Chloracetophenon erwartungsgemäß etwas schneller

umsetzt. Wurde kein NAD^+ zugegeben, konnte mit beiden Ganzzellkatalysatoren kein Vollumsatz erreicht werden. Mit FDH-MV als kofaktorregenerierendes Enzym wurden etwa 160 mmol/l p-Chlorphenylethanol gebildet, mit FDH-CB etwa 135 mmol/l. Ohne NAD^+ -Zugabe war das Reaktionsende bzw. Reaktionsgleichgewicht bereits nach ca. 5 h erreicht.

Abbildung 54 zeigt dazu die Diagramme der Biotransformation von 250 mmol/l p-Chloracetophenon zu p-Chlorphenylethanol. Der Zeitpunkt der NAD^+ -Zugabe ist bei den Reaktionsverläufen durch einen starken Anstieg der Produktkonzentration zwischen 4 h und 5 h Reaktionszeit zu erkennen, während bei den Kontrollen ohne NAD^+ -Zugabe kaum noch eine Änderung der Produktkonzentration stattfindet. Die Produktbildung des Ganzzellkatalysators FDH-CB/ADH-RE verläuft, wie erwähnt, langsamer als die des Ganzzellkatalysators FDH-MV/ADH-RE, doch die Ausbeute liegt mit 244 mmol/l p-Chlorphenylethanol etwa im Bereich von der Ausbeute des Ganzzellkatalysators FDH-MV/ADH-RE.

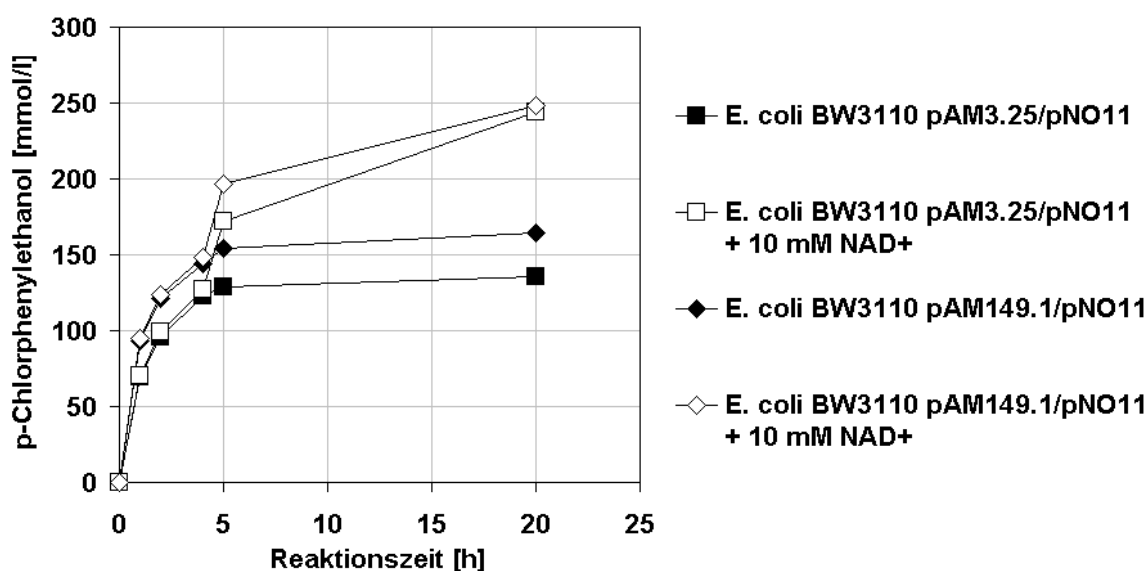


Abbildung 54: Umsetzung von 250 mmol/l p-Chloracetophenon mit den Ganzzellkatalysatoren FDH-CB/ADH-RE (*E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11) und FDH-MV/ADH-RE (*E. coli* BW3110 pAM149.1 / pNO11) mit und ohne Zugabe von 10 mmol/l NAD^+ nach 4 h Reaktion. Die Messung der Proben erfolgte mittels HPLC.

In Abbildung 55 ist das Ergebnis einer weiteren Untersuchung gezeigt, in der überprüft wurde, ob die Zugabe von Toluol zur Reaktion notwendig ist. Aus den Vorversuchen war bekannt, dass sich die Reaktionsausbeute um bis zu 20 % steigern ließ, wenn man die Zellen mit 1,5 Vol.-% Toluol permeabilisierte. Der Effekt erklärt sich vermutlich dadurch, dass die Enzyme bei der unvorteilhaften Durchmischung im Eppendorfgefäß schneller an ihre Substrate gelangen, bevor die Zellproteine verklumpen und der Stofftransport gestört wird. Bei einer Durchmischung mit

Magnetrührer wurde angenommen, das Toluol nicht nötig sei, da die Durchmischung homogener ist. Um dies zu bestätigen, wurde mit dem Ganzzellkatalysator FDH-MV/ADH-RE eine Umsetzung von 250 mmol/l p-Chloracetophenon im 10 ml-Maßstab mit und ohne Permeabilisierung durch Toluol durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass p-Chloracetophenon als organisches Solvens schon ausreichend permeabilisierend wirkt und Toluol nicht notwendig ist, um bei zusätzlicher Zugabe von 10 mM NAD⁺ einen nahezu vollständigen Umsatz zu erreichen.

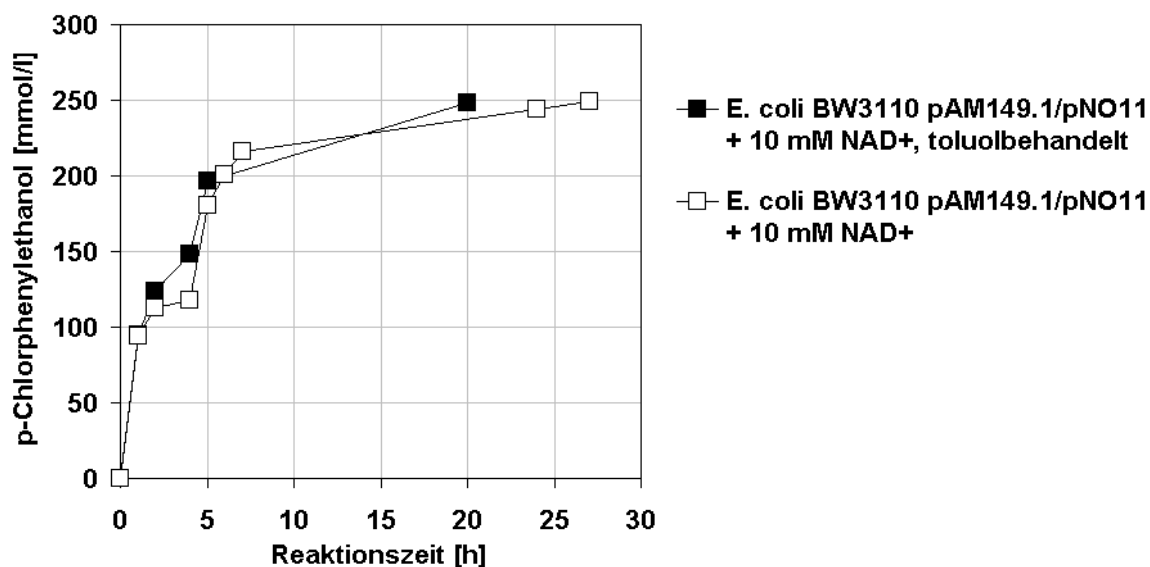


Abbildung 55: Umsetzung von 250 mmol/l p-Chloracetophenon mit dem Ganzzellkatalysator FDH-MV/ADH-RE (*E. coli* BW3110 pAM149.1 / pNO11) mit Zugabe von 10 mmol/l NAD⁺ nach 4 h Reaktion. Zu einem Reaktionsansatz wurden zu Beginn 1,5 Vol.-% Toluol zugegeben, die andere Reaktion wurde ohne Zugabe von Toluol durchgeführt. Die Messung der Proben erfolgte mittels HPLC.

4.2.9.2 Optimierung von Zellmenge und NAD⁺-Konzentration zur Umsetzung von p-Chloracetophenon mit Ganzzellkatalysatoren

Neben der Tatsache, dass die Zugabe von NAD⁺ offensichtlich für die vollständige Ketoreduktion von 250 mmol/l p-Chloracetophenon notwendig war, musste die optimale Konzentration des Kofaktors ermittelt werden, bei der ein Umsatz maximal ist. Weiterhin sollte die Zellkonzentration gesenkt werden, die mit 100 g/l sehr hoch ist. Daher wurden Versuchsreihen mit verschiedenen Zell- und NAD⁺-Konzentrationen durchgeführt. Bei Ansätzen ohne NAD⁺-Zugabe wurde als Kontrolle zuvor gezeigt, dass die Zugabe des Kofaktors notwendig ist. Die getesteten Zell- und NAD⁺-Konzentrationen sind in Tabelle 35 zusammengefasst. Die Versuchsreihe wurde mit Zellen aus der Hochzelldichtefermentation von *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 und *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 (nur 50 g/l und 25 g/l Zellen) durchgeführt.

Tabelle 35: Optimierungsversuche zur Umsetzung von p-CAP mit den Ganzzellkatalysatoren *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 und *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1.

Zellkonzentration	(100 g/l), 50 g/l, 25 g/l
NAD⁺-Konzentration	kein NAD ⁺ , 0,1 mmol/l, 1 mmol/l, 5 mmol/l, (10 mmol/l)

Der Reaktionsansatz unterschied sich allerdings von den in Kapitel 4.2.9.1 beschriebenen Versuchen. Die Temperierung der Reaktionslösungen konnte nicht analog durchgeführt werden. Daher wurde vor Reaktionsstart Wasser auf 31 °C erwärmt, in eine Plastikschaale gefüllt und diese im 30 °C-Brutraum auf einen Magnetrührblock gestellt. Zwischen Magnetrührblock und „Wasserbad“ wurde noch eine leere Petrischale positioniert, damit die vom Motor des Magnetrührers erzeugte Wärme nicht auf das Wasserbad übertragen wurde. Die Messungen der Substratumsetzungen wurden mit SYKAM-HPLC durchgeführt, während Messungen bei Degussa mit HPLC durchgeführt wurden (Kontaktadresse: harald.groeger@degussa.com).

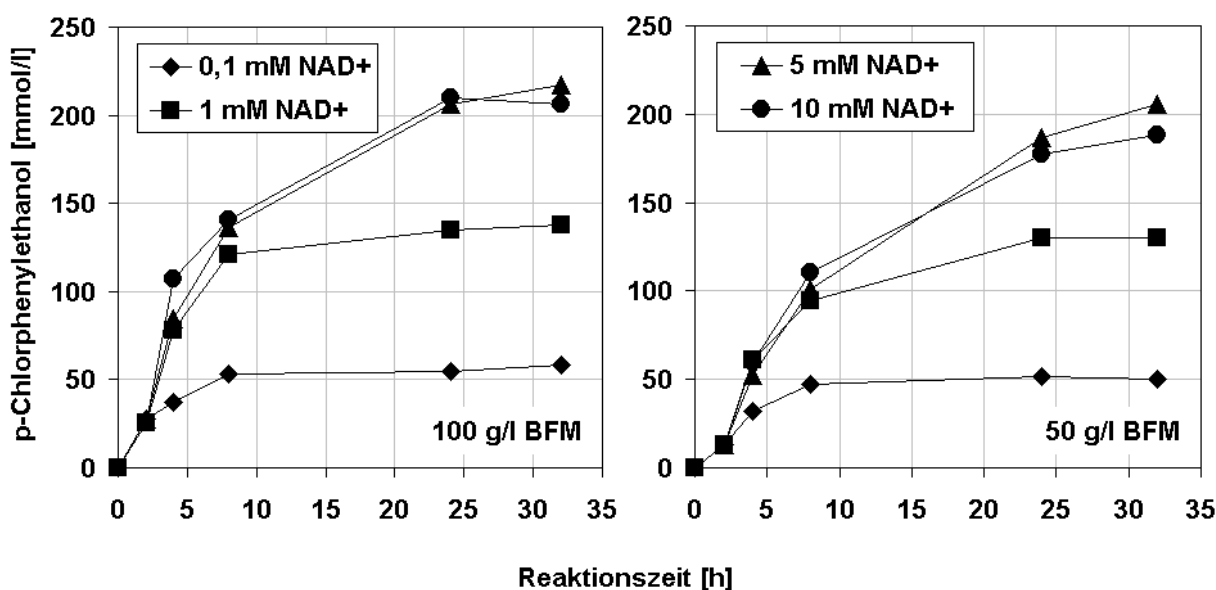


Abbildung 56: Ermittlung des Reaktionsoptimums bezüglich der NAD⁺-Konzentration für die Umsetzung von 250 mmol/l p-Chloracetophenon mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 in Zellkonzentrationen von 50 g/l und 100 g/l bei 30 °C über einen Zeitraum von 32 h. Die Messungen der p-Chlorphenylethanolkonzentrationen erfolgten mit HPLC (SYKAM).

In Abbildung 56 ist das Ergebnis der Reaktionsoptimierung für den Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 in den Konzentrationen 50 g/l und 100 g/l Biofeuchtmasse im Reaktionsansatz bei 30 °C über einen Verlauf von 24 h gezeigt. Es stellte sich schnell heraus, dass eine Zellkonzentration von 100 g/l tatsächlich nicht

notwendig ist und mit 50 g/l nahezu die gleiche Produktausbeute von p-Chlorphenylethanol erzielt werden kann. Es gibt weiterhin klare Unterschiede zwischen den verwendeten NAD^+ -Konzentrationen. Mit 0,1 mM und 1 mM NAD^+ wird zum Teil weniger als die Hälfte des eingesetzten p-Chloracetophenon umgesetzt. Bei Zugabe von 5 mM und 10 mM NAD^+ gibt es zum Reaktionsende keinen signifikanten Unterschied in der Produktausbeute. Ebenso ist eine Kofaktorkonzentration von 10 mmol/l nicht nötig, da mit 5 mmol/l zum Teil bessere Ergebnisse erzielt wurden als mit der doppelt so hohen Konzentration (siehe Abbildung 56). Für die Versuchsreihen wurden Reaktionskinetiken aufgenommen mit Probenentnahmen zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h, 8 h, 24 h und 32 h. Die Zugabe von NAD^+ zur Reaktionslösung erfolgte 15 min nach Reaktionsstart.

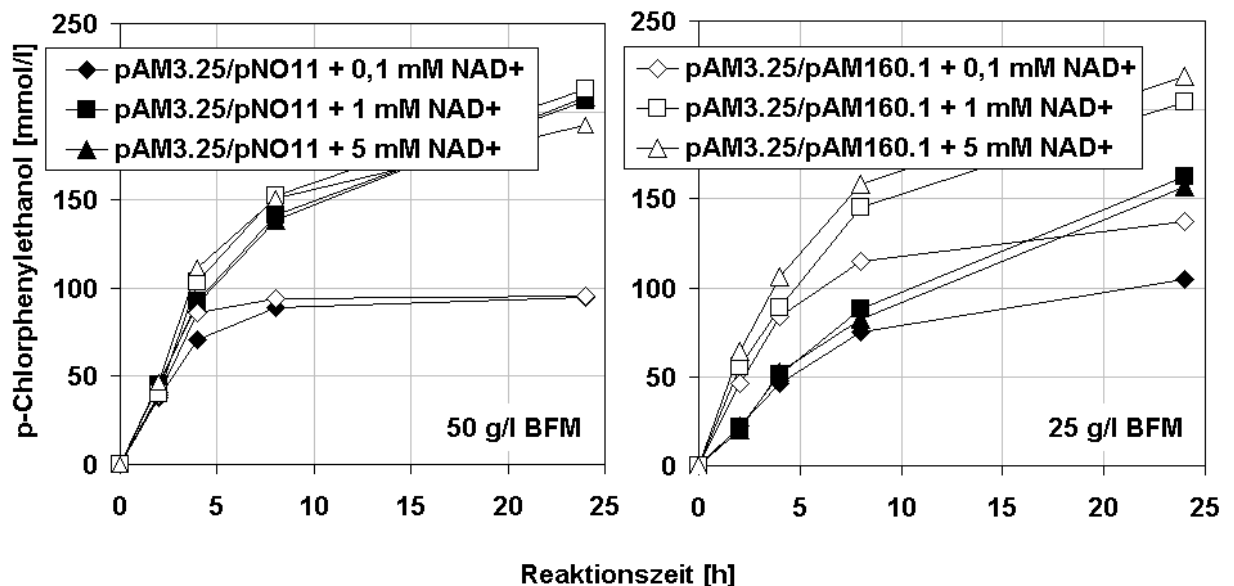


Abbildung 57: Vergleich der Ganzzellkatalysatoren *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 und *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 bei der Umsetzung von 250 mmol/l p-Chloracetophenon mit 50 g/l und 25 g/l Biofeuchtmasse und Zugabe von NAD^+ in verschiedenen Konzentrationen zum Reaktionsansatz nach 15 min Reaktionszeit (10 ml-Reaktionsansätze, 30 °C, Durchmischung mit Magnetührer).

Nach diesen Versuchen zur Optimierung der NAD^+ -Konzentration lag auch der Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 vor. Aufgrund der mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 erzielten Ergebnisse bei 100 g/l Biofeuchtmasse und den höheren Enzymaktivitäten von rekombinanter FDH-CB und ADH-RE in *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 wurden noch Biomassekonzentrationen von 50 g/l und 25 g/l sowie die NAD^+ -Konzentrationen 0,1 mM, 1 mM und 5 mM bei der Umsetzung von 250 mM p-Chloracetophenon überprüft. Natriumformiat wurde im fünffachen Überschuss im Vergleich zur p-

Chloracetophenonkonzentration zugegeben. Die Reaktionstemperatur lag aufgrund des Versuchsaufbaus bei 28 °C. Die Ergebnisse sind in Abbildung 57 gezeigt. Hier zeigt sich die verbesserte Umsetzung von p-Chloracetophenon mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 bei der eingesetzten Zellkonzentration von 25 g/l Biofeuchtmasse. Hier werden mit 1 und 5 mM NAD⁺ nahezu identische Produktausbeuten mit 205 mmol/l bzw. 220 mmol/l p-Chlorphenylethanol erzielt, während der Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 nur Ausbeuten bei gleichen Zell- und NAD⁺-Konzentrationen von 160 mmol/l erreicht. Im Gegensatz dazu konnten bei 50 g/l Zellen beider Ganzzellkatalysatoren noch ähnliche Umsätze bei 1 mM und 5 mM NAD⁺ erzielt werden.

Einen signifikanten Unterschied gab es bei der Umsetzung beider Ganzzellkatalysatoren (50 g/l BFM) von 500 mmol/l und 750 mmol/l p-Chloracetophenon mit dem fünffachen Überschuss Natriumformiat und 1 mM bzw. 5 mM NAD⁺ in der Reaktionslösung bei 30 °C (gepufferte Lösung durch 0,1 M KPP pH7). Die Reaktion wurde nach 24 h abgebrochen und die Umsetzung zu diesem Zeitpunkt bestimmt. Mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 wurden bei 500 mmol/l p-Chloracetophenon Ausgangskonzentration mehr als 85 % (430 mmol/l) umgesetzt, während mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 nur Ausbeuten von etwa 45 % (223 mmol/l) erzielt wurden (jeweils bei Zugabe von 5 mM NAD⁺ zur Reaktionslösung nach 20 min Reaktionszeit). Bei der Umsetzung von 750 mmol/l p-Chloracetophenon erzielte der Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 ebenfalls die höheren Umsätze zu etwa 300 mmol/l p-Chlorphenylethanol im Gegensatz zu 45 mmol/l mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11. Hier ist der Unterschied zwischen den Endumsätzen von p-Chloracetophenon mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 bezüglich der zugegebenen NAD⁺-Konzentration geringer. Vermutlich ergeben sich durch die hohe Konzentration der organischen Phase mehrere Einflüsse auf das Reaktionsverhalten, die sowohl die Denaturierung des Zellproteins, die Diffusionslimitierung und die Inaktivierung der an der Umsetzung beteiligten Enzyme betreffen. Das Ergebnis ist in Abbildung 58 gezeigt.

Die Unterschiede zwischen den Produktausbeuten der verschiedenen Ganzzellkatalysatoren (*E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1, *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 und *E. coli* BW3110 pAM149.1 / pNO11) macht sich speziell unter limitierenden Bedingungen bemerkbar, die charakterisiert sind durch hohe Substrat-, niedrige Zell- und niedrige NAD⁺-Konzentrationen. Hier spielen die unterschiedlichen Expressionsvektoren für *adhRE*(co) – pNO11 und pAM160.1 – eine entscheidende Rolle, da durch höhere ADH-RE-Aktivität mehr Substrat umgesetzt wird. Da der Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM149.1/pNO11 aufgrund der sehr spät zur Verfügung stehenden FDH aus *M. vaccae* N10 nur unzureichend untersucht wurde, sollten auch

hier Abhängigkeiten der p-Chloracetophenonumsetzung untersucht und ein weiterer Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM149.1 / pAM160.1 gebildet werden, der aufgrund der hohen Aktivität von FDH-MV und von ADH-RE die vergleichsweise höchsten Umsätze erreichen sollte.

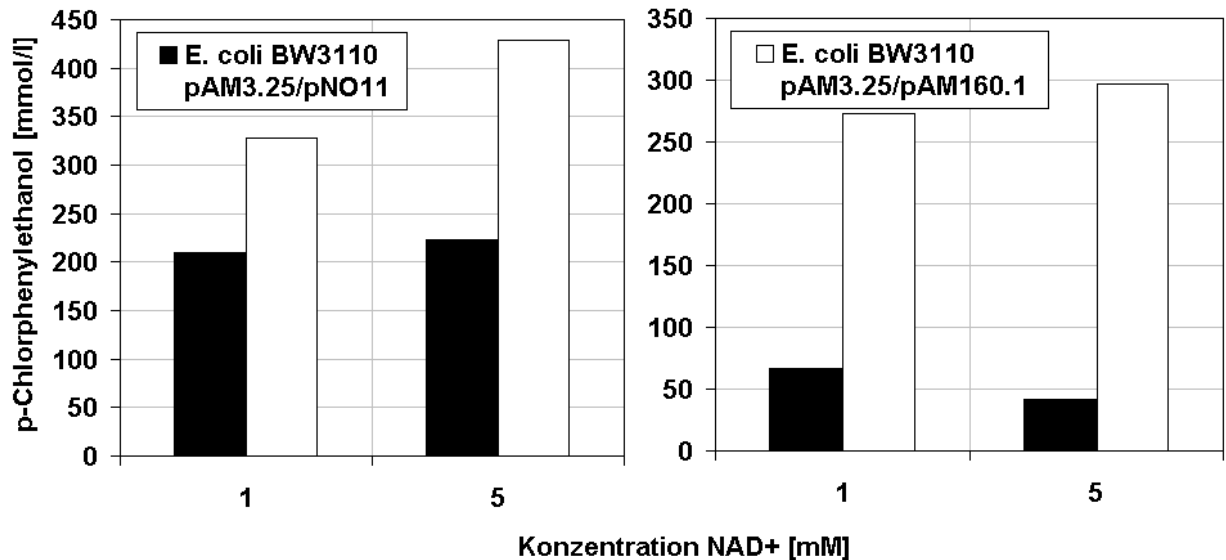


Abbildung 58: Umsetzung von 500 mmol/l (A) und 750 mmol/l (B) p-Chloracetophenon mit den Ganzzellkatalysatoren *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 und *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 nach 24 h bei 28 °C. Es wurden 50 g/l BFM eingesetzt. Die NAD⁺-Zugabe erfolgte nach 20 min Reaktionszeit.

4.2.10 Umsetzung von p-Chloracetophenon mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM121.4

Im Gegensatz zu den Umsetzungen von p-Chloracetophenon mit den ADH-RE/FDH-Ganzzellkatalysatoren *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11, *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 und *E. coli* BW3110 pAM149.1 / pNO11 wurden mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM121.4 nur Vorversuche in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen durchgeführt. Daher sind keine Aussagen zu Reaktionen im 10 ml-Maßstab mit optimierter Durchmischung möglich. Aus den Versuchen im 1,5 ml-Maßstab ergab sich wie auch bei den Ganzzellkatalysatoren mit ADH-RE ein generell maximaler Umsatz von etwa 75 bis 80 mmol/l p-Chloracetophenon bei einer Ausgangskonzentration von p-Chloracetophenon von 100 mmol/l verbunden mit einer starken Verklumpung der Biomasse. Daher müssten mit diesen Ganzzellkatalysatoren nochmals Untersuchungen unter limitierenden Bedingungen durchgeführt werden, um Unterschiede zu den ADH-RE/FDH-Ganzzellkatalysatoren herauszuarbeiten.

4.2.11 Umsetzung von p-Chloracetophenon mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pHWG640.12 / pNO9

Mit Malic Enzyme und ADH-RE wurden ebenfalls Umsetzungen von p-Chloracetophenon in einer Konzentration von 100 mmol/l durchgeführt. Jedoch wurden schon hier deutlich schlechtere Ergebnisse bei den Produktausbeuten mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pHWG640.12 / pNO9 erzielt. In den Vorversuchen, die im Überkopffroller durchgeführt wurden, konnten anstelle der bei den FDH/ADH-RE-Ganzzellkatalysatoren erzielten 75 bis 80 mmol/l Produkt p-Chlorphenylethanol nur 50 mmol/l bis 60 mmol/l erzielt werden. L-Malat wurde wie Natriumformiat in fünffachem Überschuss zugegeben. Die Reaktionslösungen wurden mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7 gepuffert. Da der Malic Enzyme/ADH-RE-Ganzzellkatalysator mit Malic Enzyme als kofaktorregenerierendes Enzym ebenfalls vergleichsweise schlechter abschnitt als die FDH/ADH-RE-Ganzzellkatalysatoren und Parallelen zum Malic Enzyme/LDH-Ganzzellkatalysator *E. coli* JM109 pAM5.22 gezogen werden konnten, wurde auf eine Optimierung der Reaktionen mit dem Malic Enzyme/ADH-RE-Ganzzellkatalysator verzichtet.

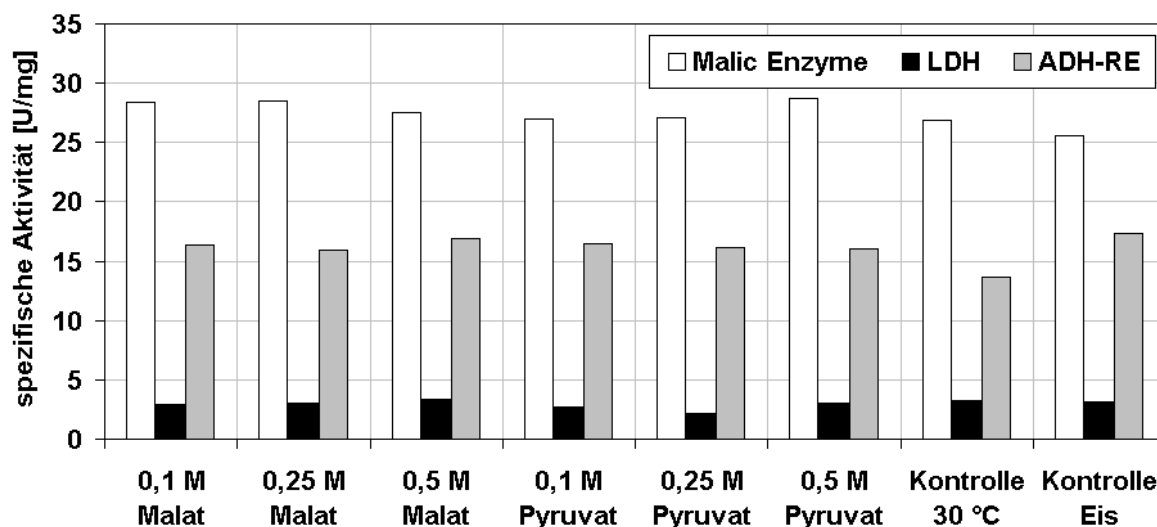


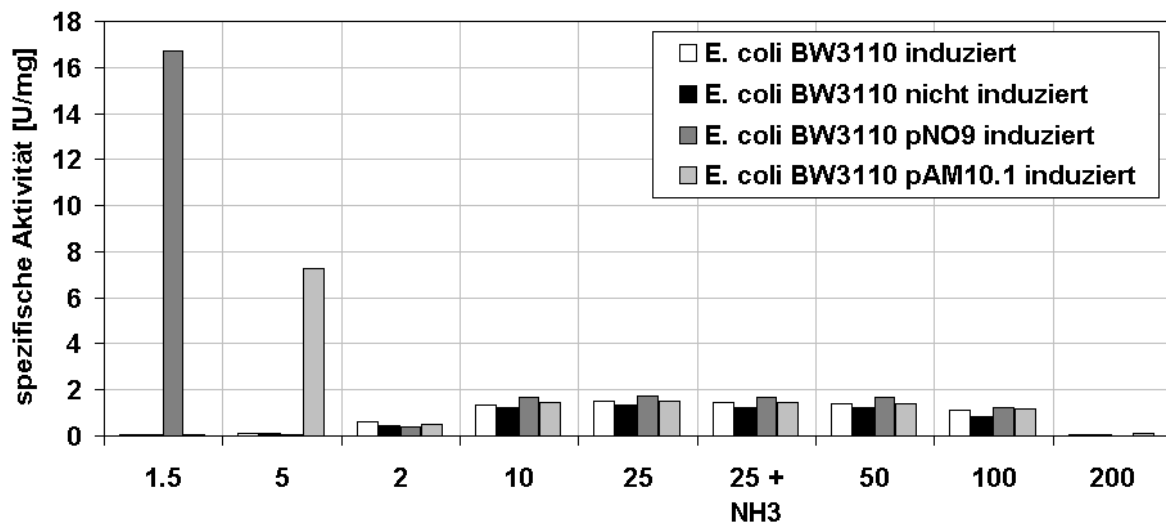
Abbildung 59: Stabilitätstests von Malic Enzyme, ADH-RE und LDH mit Pyruvat und L-Malat in verschiedenen Konzentrationen. Die Expression der Gene wurde in *E. coli* BW3110 pHWG640.12 (*sfcA*), *E. coli* BW3110 pNO9 (*adhRE(co)*) und *E. coli* BW3110 pAM10.1 (*ldh*) durchgeführt (16 h Induktion mit 0,2 % Rhamnose, 30 °C, Schüttelkultur). Die Zellrohextrakte mit den rekombinanten Proteinen wurden mittels Ultraschall hergestellt. Eingesetzt für den Stabilitätstest wurde der lösliche Proteinanteil.

Jedoch wurden zur Untersuchung der Ursache der geringen Produktausbeuten mit dem Malic Enzyme/ADH-RE-Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pHWG640.12 / pNO9 Enzymstabilitätstests durchgeführt, wobei Zellrohextrakte mit

einzelnen exprimierten Genen von Malic Enzyme (*E. coli* BW3110 pHWG640.12), ADH-RE (*E. coli* BW3110 pNO9) bzw. LDH (*E. coli* BW3110 pAM10.1) mit verschiedenen Konzentrationen Pyruvat und L-Malat bei 30 °C im Thermoschüttler (Eppendorf, 500 rpm) für 1 h inkubiert wurden (siehe Abbildung 59). Die Expression der genannten Gene in *E. coli* BW3110 wurde bei 30 °C und 16 h Induktion durchgeführt. Anschließend wurden die für die Enzyme spezifischen Aktivitätstests durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.7.5). Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Pyruvat und Malat, die bei 30 °C und auf Eis inkubiert wurden. Das Ergebnis ist in Abbildung 59 in Form der spezifischen Enzymaktivitäten dargestellt und zeigt, dass alle getesteten Enzyme bei den eingesetzten Konzentrationen von Pyruvat bzw. L-Malat stabil sind. Daher wird eine Inaktivierung durch diese Komponenten in der Reaktion ausgeschlossen.

Da Inaktivierungen der an den Umsetzungen direkt beteiligten Enzyme durch Malat und Pyruvat ausgeschlossen werden können, könnten geringere Umsetzungen als mit FDH als kofaktorregenerierendes Enzym nur dann auftreten, wenn eine weitere NADH-verbrauchende Reaktion ablaufen würde, die in Konkurrenz zur Ketoreduktion von p-Chloracetophenon oder zur reduktiven Aminierung von Trimethylpyruvat steht. Als geeignetes Substrat könnte dafür Pyruvat dienen. Zum einen könnten ADH-RE und LDH mit Pyruvat NADH-abhängige Reaktionen zu Milchsäure bzw. Alanin katalysieren, zum anderen könnte ein drittes Enzym – Lactatdehydrogenase - für die Reduktion von Pyruvat verantwortlich sein. *E. coli* besitzt selbst drei Lactatdehydrogenasen, von denen zwei membrangebundene Flavoproteine sind, die Reaktionen der Atmungskette katalysieren und aerobes Wachstum auf Milchsäure ermöglichen. Die dritte Lactatdehydrogenase LdhA liegt löslich im Zytoplasma vor und ist verantwortlich für die Herstellung von Milchsäure aus Pyruvat, die wiederum NADH-abhängig ist. LdhA ist unter allen Wachstumsbedingungen mit einer Basalaktivität präsent und kann bei anaeroben Wachstum und niedrigem pH-Wert die 10-fache Aktivität erreichen (Bunch et al., 1997, Jiang et al., 2001). Um zu untersuchen, ob ADH-RE und LDH unspezifische Reaktionen mit Pyruvat eingehen oder LdhA die Umsetzungen beeinflusst, wurden die Stämme *E. coli* BW3110, *E. coli* BW3110 pNO9 und *E. coli* BW3110 pAM10.1 16 h bei 30 °C mit 0,2 % Rhamnose induziert. Eine Schüttelkultur von *E. coli* BW3110 wurde als Kontrollansatz nicht induziert. Von allen Kulturen wurden Zellrohextrakte aus 10 OD Zellen angefertigt und diese mit den Substraten p-Chloracetophenon (1,5 mmol/l, Standardtest für ADH-RE), α -Ketoisocaproat (5 mmol/l, Standardtest für LDH) und Pyruvat in verschiedenen Konzentrationen getestet. Pyruvat wurde dazu aus einer 1 M Lösung (pH 7,1) in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer verdünnt. Als Kofaktorlösung wurde NADH des LDH-Aktivitätstests verwendet (50 μ l einer 20 mM Lösung). Alle Reaktionen wurden bei 30 °C durchgeführt. In Abbildung 60 ist das Ergebnis aufgeführt.

Die ersten beiden Spalten (1,5 und 5) zeigen die spezifischen Aktivitäten der verschiedenen Stämme mit p-Chloracetophenon bzw. α -Ketoisocaproat. Nachfolgend sind die spezifischen Aktivitäten mit verschiedenen Pyruvatkonzentrationen aufgetragen. Spalte 6 (25 + NH_3) zeigt die spezifischen Aktivitäten bei 25 mmol/l Pyruvat mit 73,5 mmol/l NH_3 . NH_3 wurde zugegeben, um die Reaktion von LDH mit Pyruvat zu Alanin zu zeigen. Alle anderen Tests mit Pyruvat als Substrat wurden ohne NH_3 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass alle Stämme unabhängig davon, ob sie induziert wurden und ob sie über rekombinante Proteine verfügen, Pyruvat in einer NADH-abhängigen Reaktion umsetzen können und etwa die gleiche spezifische Aktivität für dieses Substrat besitzen. Höhere Pyruvatkonzentrationen als 100 mmol/l konnten aufgrund der starken Extinktion von Pyruvat selbst nicht mehr zuverlässig bei 340 nm gemessen werden. Da auch die Zugabe von Ammoniak zur Reaktion (Spur 6) keine Erhöhung der spezifischen Aktivität zur Folge hat, kann vermutet werden, dass ADH-RE und LDH Pyruvat nicht umsetzen und die Reaktion von LdhA durchgeführt wird. Bunch et al. (1997) geben die Basalaktivität von LdhA in *E. coli* LCB320 bei anaerober Kultivierung mit 0,96 U/mg für eine Testlösung mit 30 mmol/l Pyruvat an. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für Zellen aus der stationären Wachstumsphase von *E. coli* BW3110 von 1,3 bis 1,7 U/mg sind damit vergleichbar.



Konzentration der Substrate p-CAP, KIC und Pyruvat

Abbildung 60: Test von *E. coli* BW3110 (induziert mit 0,2 % Rhamnose/nicht induziert) mit und ohne rekombinante Proteine auf Aktivität mit dem Substrat Pyruvat, dass in Ganzzellkatalysen mit Malic Enzyme als kofaktorregenerierendes Enzym entsteht. Die Reaktionen wurden jeweils bei 30 °C durchgeführt. Die ersten beiden Spalten zeigen die spezifischen Aktivitäten mit p-Chloracetophenon (1,5 mmol/l) und α -Ketoisocaproat (KIC, 5 mmol/l), alle anderen die spezifischen Aktivitäten bei verschiedenen Pyruvatkonzentrationen.

Für die Ganzzellkatalysen könnte die LdhA-Aktivität einen großen Einfluss haben. Laut Abbildung 60 entspricht die spezifische Aktivität von LdhA (bei 25 mmol/l Pyruvat) etwa 1/5 der von LDH und 1/10 der von ADH-RE. Das würde für die Ganzzellkatalysen mit Malic Enzyme als kofaktorregenerierendes Enzym bedeuten, dass bis zu 25 % (LDH hat bei Koexpression mit Malic Enzyme eine spezifische Aktivität von etwa 3 U/mg) bzw. 10 % des regenerierten NADH in einer Konkurrenzreaktion verbraucht werden und nicht mehr der gewünschten Ketoreduktion zur Verfügung stehen. Mit der gezeigten Inaktivierung von Malic Enzyme durch p-Chloracetophenon und p-Chlorphenylethanol gekoppelt, könnte dies zusätzlich eine mögliche Erklärung für die geringeren Umsetzungen mit diesem kofaktorregenerierenden Enzym bei der Herstellung von p-Chlorphenylethanol sein.

4.3 ADHF1 aus *P. fluorescens* DSM 50106 - Expression, Aufreinigung und Enzymstabilität

Das Gen für ADHF1 aus *P. fluorescens* DSM 50106 lag auf dem Plasmid pJOE4016.7 vor, einem pBR322-Derivat, und war C-terminal mit einem Histag fusioniert, der die Aufreinigung des rekombinanten Proteins erleichtern sollte. Die Expression von *adhF1* erfolgte ebenfalls unter dem Rhamnosepromotor. Anhand der spezifischen Aktivitäten gegenüber den in Hildebrandt et al. (2002) und Riermeier et al. (2002) postulierten Substraten sollte das Enzym als Referenz und Positivkontrolle bei der Suche nach neuen ADHs im *S. coelicolor*-Genom dienen. Jedoch gab es Probleme bei Expression und Substratspezifität. Bei Expressionen, die länger als 16 h andauerten, konnte wenig bis kein Protein mehr nachgewiesen werden. Spezifische Aktivitäten bezüglich Cyclohexanon und p-Chloracetophenon, die anhand der Abnahme von NADH im Photometer bestimmt werden, waren im Bereich der Aktivitäten des Expressionsstammes *E. coli* JM109 ohne rekombinantes Protein. Es konnten bei diesen Substraten keine Aktivitäten ermittelt werden. Darum wurden zuerst Untersuchungen zur Expression des Gens *adhF1* und anschließend zur Substratspezifität von ADHF1 durchgeführt.

4.3.1 Expressionsvektoren mit *adhF1*

Das Gen *adhF1* lag wie bereits beschrieben im Plasmid pJOE4016.7 inseriert vor. Im Verlauf der Induktionsuntersuchungen mit *adhF1* entstanden weitere Expressionsvektoren, die in Tabelle 36 zusammengefasst sind.

Tabelle 36: Expressionsvektoren mit *adhF1* mit Rhamnosepromotor.

Gen	Amplifikation mit	Restriktion mit	Klonierungsvektor	Zielpiasmid	Tag (C-terminal)
<i>adhF1</i> -med	s4040/s4042	<i>NdeI/HindIII</i>	pJOE4580.2	pAM130.3	-
<i>adhF1</i> -long	s4041/s4042	<i>NdeI/HindIII</i>	pJOE4580.2	pAM131.3	-
<i>adhF1</i>	-	<i>NdeI/BamHI</i>	pJOE4042.1	pAM138.2	Strep-Tag
<i>adhF1</i>	-	<i>NdeI/BamHI</i>	pJOE5066.1	pAM141.1	Biotinylierungssequenz
<i>adhF1</i>	-	<i>NdeI/BamHI</i>	pJOE4056.2	pAM142.1	eGFP
<i>adhF1</i> (wt)	s4078/s4079	<i>NdeI/HindIII</i>	pJOE4056.2	pAM144.1	-

```

1  gtggccccg cttcgacatg gcgcttcaag cgggtcaccg ggcagtttgc actcaaggac
   v a r f d m a l q a g h p a v c t q g
   l w p a s t w r f k r v t r q f a l k d

61  tatgcggtcg acctgttgcc cctcaactgcg ccgccccgtc cggccacggc gccccactcc
   l c g r p v a p h c a a p s g h g a p l
   y a v d l l p l t a p p r p a t a p h s

121  acggcagaag gcagcctctc atgaagtcat tcaacggccg cgtggcgggcg attacggcg
   h g r r q p l m k s f n g r v a a i t g
   t a e g s l s -

```

gtg mögliches Startcodon für *adhF1*-long

atg mögliches Startcodon für *adhF1*-med

atg publiziertes Startcodon für *adhF1*

agaa gg Ribosomenbindestelle für *adhF1*

Abbildung 61: Anfangssequenzen von *adhF1*-long, *adhF1*-med und *adhF1* und C-terminale Region von *fmo* mit farbig markierter Proteinsequenz (grün für FMO, rot für ADHF1, blau für den N-Terminus von ADHF1-med und goldfarben für den N-Terminus von ADHF1-long). Die Startcodons der Gene sowie die Konsensussequenz für eine Ribosomenbindestelle für *adhF1* sind farbig markiert.

Eine mögliche Ursache für die Instabilität des Proteins könnte darin liegen, dass für das Gen ein falscher Genstart postuliert wurde. Im gleichen Leseraster liegen stromaufwärts zwei weitere Startcodons, die allerdings im Gen einer putativen Flavinbindenden Monoxygenase (*fmo*) lokalisiert sind (Hildebrandt et al., 2002). Das publizierte Startcodon von *adhF1* überlappt mit dem Stopcodon von *fmo*. Es wurden daher zwei weitere Versionen des Gens isoliert, die Gene *adhF1-med* und *adhF1-long*, die durch PCR amplifiziert wurden (Oligonukleotide s4040/s4042 bzw. s4041/s4042). Diese sind in die Anfangssequenz um 123 bp bzw. 138 bp länger als *adhF1*. Sie wurden in Plasmide ohne Tag-Sequenz inseriert. Das Startcodon „gtg“ wurde bei s4041 durch „atg“ ersetzt. Die Anfangssequenz mit den jeweiligen Startcodons ist in Abbildung 61 dargestellt. Im Gegensatz zu der zunächst postulierten Gensequenz von *adhF1* konnte jedoch bei den stromaufwärts verlängerten Genen keine Shine-Dalgarno-Sequenz bzw. Ribosomenbindestelle gefunden werden. Um auszuschließen, dass die Instabilität von ADHF1 durch den C-terminalen Tag verursacht würde, wurde das Gen erneut mit PCR amplifiziert (Oligonukleotide s4078/s4079). Als DNA-Template wurde chromosomale DNA von *P. fluorescens* DSM 50106 verwendet. Um die Expression von *adhF1* mit anderen Tags zu untersuchen und weitere Möglichkeiten für die Aufreinigung von ADHF1 zu erhalten, wurde *adhF1* C-terminal mit Strep-Tag (pAM138.2), C-terminal mit Biotinylierungssequenz (pAM141.1) und C-terminal mit eGFP (pAM142.1) fusioniert. Als Expressionsstamm wurde zuerst *E. coli* JM109 gewählt und dieser mit allen in Tabelle 36 gezeigten Vektoren transformiert.

4.3.2 Expression von *adhF1* in *E. coli* JM109 pJOE4016.7 und anderen *E. coli*-Stämmen

Zur Induktion von *adhF1* wurde *E. coli* JM109 pJOE4016.7 zuerst 2 h bei 37 °C inkubiert, dann die Kultur mit 0,2 % Rhamnose induziert und bei 30 °C weiter inkubiert. Aufgrund der geringen Zelldichte wurde die erste Probe nach 4 h genommen und dann die Expression weiterhin stündlich verfolgt. Die spezifische Aktivität von ADHF1 wurde mit 2-Hexanol als Substrat unter Zugabe von NAD⁺ als Kofaktor bestimmt. Der Verlauf ist in Abbildung 62 gezeigt. Das Expressionsmaximum liegt dabei zwischen 5 h und 7 h nach Induktion mit Rhamnose. Nach 16 h bis 20 h Induktion sinkt die spezifische Aktivität gegen Null.

Für den Abfall der spezifischen Aktivität wurden verschiedene Gründe in Betracht gezogen. Zum einen könnte die mRNA des Gens eine kurze Halbwertszeit haben, sodass die Expression nur über einen kurzen zeitlichen Abschnitt erfolgt, was allerdings die Abnahme der spezifischen Aktivität nicht erklärt. Weiterhin könnte das gefaltete Protein ADHF1 selbst von *E. coli*-Proteasen schnell abgebaut werden und zum dritten könnte eine instabile Proteinfaltung zum schnelleren Abbau des Proteins

führen. Um das letztere auszuschließen, wurde pJOE4016.7 mit drei unterschiedlichen Chaperonen, die auf Plasmiden kommerziell erhältlich sind, kombiniert. Das Plasmid pKJE7 besitzt dabei die Gene *dnaK*, *dnaJ* und *grpE*, die einen Chaperonkomplex bilden. Auf pGro7 werden die Gene *groES* und *groEL*, die ebenfalls einen Chaperonkomplex bilden, unter einem Arabinosepromotor exprimiert, und pTf16 trägt das Gen *tig* („trigger factor“, TF). Alle genannten Plasmide führten zur Verbesserung der Expression von Genen, jedoch nicht jedes Chaperon wirkte bei jedem Gen (Nishihara et al., 2000). Die Proteine DnaK, DnaJ und GrpE spielen *in vivo* eine Rolle bei der Hitzeschockantwort. Die Hitzeschockproteine schützen andere Enzyme vor Hitzeinaktivierung bzw. renaturieren bereits denaturierte Proteine. Bei rekombinant exprimierten Genen werden Fehlfaltungen und Agglomerate korrigiert. TF verhindert ebenfalls Fehlfaltungen und hat eine Rolle als Katalysator für Proteinfaltung wie auch GroES und GroEL. Bei Koexpression der einzelnen Chaperongene mit *adhF1* konnte jedoch keine Stabilisierung von ADHF1 erreicht werden. Das Enzym war ebenfalls nach 16 h bis 20 h nicht mehr mit Aktivitätstests nachweisbar.

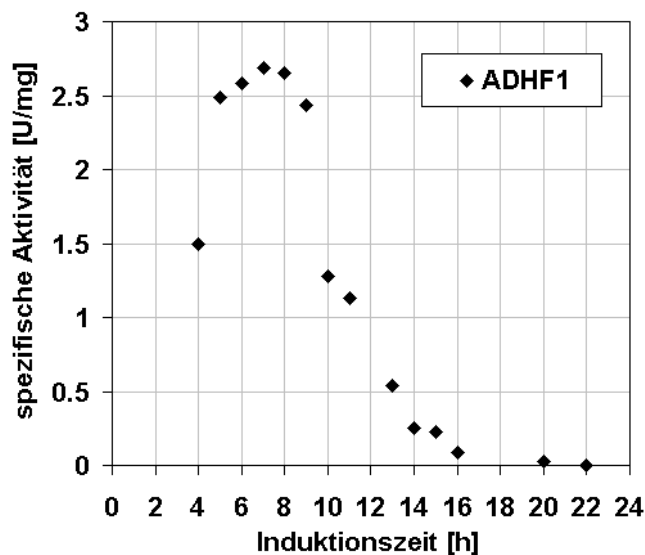


Abbildung 62: Induktionskinetik von *adhF1* in *E. coli* JM109 pJOE4016.7 in einer Schüttelkultur bei 30 °C. Als Substrat wurden 10 mM 2-Hexanol verwendet und 50 µl einer 40 mM NAD⁺-Lösung.

Weiterhin wurde die Expression von *adhF1* in verschiedenen *E. coli*-Stämmen getestet, bei denen RNaseE (*E. coli* BL21 StarTM (DE3) pLysS One Shot[®]), sowie der Sigmafaktor σ^S (*E. coli* RH90), das Gen *rssB* (*E. coli* AM106), das für die Regulation von σ^S verantwortlich ist, und schließlich die Protease ClpP1 ausgeschaltet worden (*E. coli* AM125). *E. coli* RH90, *E. coli* AM106 und *E. coli* AM125 sind Derivate von *E. coli* MC4100, die Mutationen im σ^S -Gen oder in Genen zeigen, die den σ^S -Abbau regulieren (Becker et al., 1999; Hengge-Aronis, 2002; Weichart et al., 2003; Pruteanu

und Hengge-Aronis, 2002; Zhang et al., 1998; Colland et al., 2000). Der σ^S -Faktor (RpoS) ist eine Untereinheit der RNA-Polymerase, der für die Adaption der *E. coli*-Zellen von der exponentiellen Wachstumsphase zur Stationärphase sowie für Stresssituationen verantwortlich ist und über 100 Gene kontrolliert. In der Stationärphase werden zum Beispiel eine Reihe von Proteasen abgebaut, die nicht mehr benötigt werden. Da ADHF1 ebenfalls in der Stationärphase verschwindet, wurde hier ein Zusammenhang vermutet.

Mit den Stämmen *E. coli* MC4100 pJOE4016.7, *E. coli* RH90 pJOE4016.7 und *E. coli* AM125 konnten etwas höhere spezifische Aktivitäten erzielt werden (bis zu 3 U/mg im Vergleich zu 1,6 U/mg in *E. coli* JM109 pJOE4016.7), allerdings verschob sich das Expressionsmaximum im Vergleich zur Expression von *adhF1* in *E. coli* JM109 pJOE4016.7 von 5 - 6 h auf 8 h. Anschließend verringerte sich die spezifische Aktivität von 3 U/mg auf 0,3 U/mg nach 24 h Induktion. Somit konnte auch hier keine langfristige Verbesserung der Enzymstabilität erreicht werden. In Abbildung 63 sind die Induktionskinetiken von *E. coli* JM109, *E. coli* MC4100 und deren Derivaten mit pJOE4016.7 anhand der spezifischen Aktivitäten von ADHF1 mit dem Substrat 2-Hexanol gezeigt. Daher wurde vermutet, dass die Instabilität von ADHF1 nichts mit den durch σ^S hervorgerufenen Veränderungen in der Stationärphase zu tun hat. Ebenso wenig wird ADHF1 von ClpP1 abgebaut noch von der Lon-Protease, die in *E. coli* BL21 Star™ (DE3) pLysS One Shot® fehlt (Daten hier nicht aufgeführt).

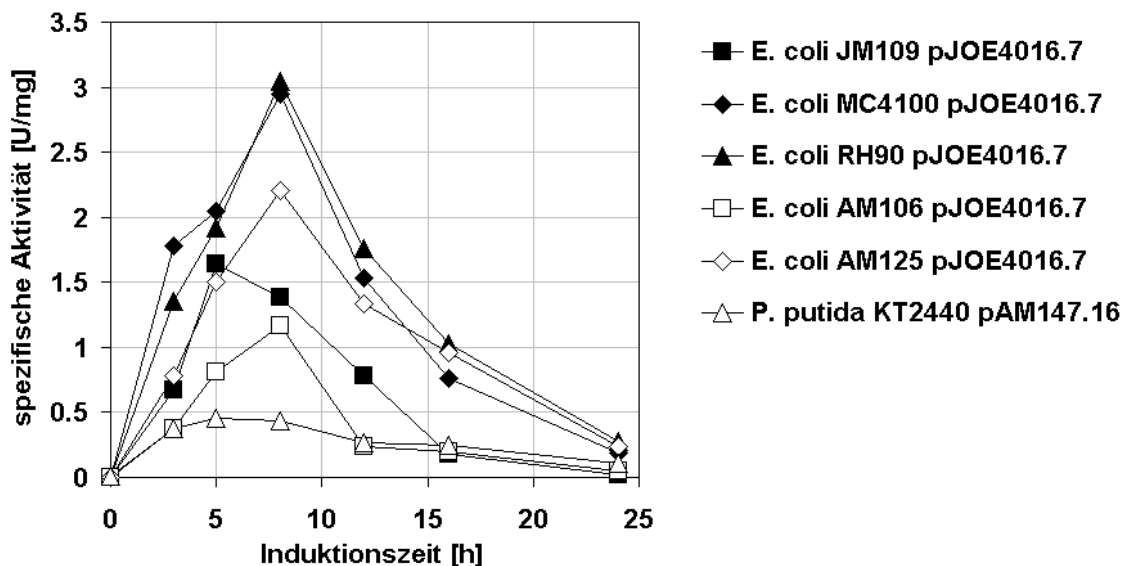


Abbildung 63: Induktionskinetik von *adhF1* in verschiedenen mit 0,2 % Rhamnose induzierten *E. coli*-Stämmen mit dem Plasmid pJOE4016.7 (siehe Diagramm), ermittelt bei 30 °C Induktionstemperatur über einen Zeitraum von 24 h. Die spezifische Aktivität wurde aus Zellrohextrakten ermittelt.

4.3.3 Expression von *adhF1* in *E. coli* JM109 mit unterschiedlichen Expressionsvektoren

Die Expression von *adhF1* auf pJOE4016.7 in anderen Stämmen als *E. coli* JM109 brachte keine Verbesserung in der Stabilität des Enzyms. Um den Verlust der Enzymaktivität von ADHF1 besser untersuchen zu können, wurden C-terminale Fusionen von *adhF1* hergestellt, um das Protein leichter in der Zelle zu detektieren und um es durch Affinitätstests chromatographisch auch in geringen Mengen noch nachweisen zu können. Die für die Untersuchung von *adhF1* mit verschiedenen C-terminalen Tags hergestellten Vektoren sind bereits in Tabelle 36 zusammengestellt. Auch hier wurden wie in Kapitel 4.3.2 Induktionskinetiken aufgestellt. Die Expression von *adhF1* als Fusion mit eGFP in *E. coli* pAM142.1 führte zu wenig löslichem Protein und einem hohen Anteil an Einschlusskörpern. Bei Expression von *adhF1* in *E. coli* JM109 pJOE4016.7, *E. coli* JM109 pAM138.2 (Strep-Tag), *E. coli* JM109 pAM141.1 (Biotinylierungssequenz) und *E. coli* pAM144.1 (kein Tag) lieferten die Induktionskinetiken übereinstimmende Werte. Bis sechs Stunden nach der Induktion mit Rhamnose erfolgte ein Anstieg der Proteinmenge und der spezifischen Aktivität bis zu 2,4 U/mg (pJOE4016.7) mit 2-Hexanol als Substrat, danach zuerst ein rapider Abfall der Aktivität (zwischen 10 h und 12 h Induktion) und etwas langsamer die Menge an ADHF1, wie mittels SDS-Gel-Analyse zu erkennen war.

In Abbildung 64 sind dazu beispielhaft Zellrohextrakte von induzierten *E. coli* JM109-Zellen mit den verschiedenen Expressionsvektoren mit *adhF1* mit SDS-Page dargestellt. Die gebildeten ADHF1-Derivate sind dabei sowohl bei den löslichen als auch bei den unlöslichen Fraktionen der Zellrohextrakte gut erkennbar und ermöglichen eine einfache Unterscheidung der Proben von der ebenfalls mit Rhamnose gewachsenen Kontrolle *E. coli* JM109 ohne Plasmid. Die Bildung von Einschlusskörpern konnte bei allen gebildeten ADHF1-Derivaten beobachtet werden, speziell aber bei der ADHF1-eGFP-Fusion in *E. coli* JM109 pAM142.1 (siehe Abbildung 64, Spur 6, unlösliche Proteinfractionen), bei dem auch die durch eGFP erwartete Fluoreszenz in der induzierten Kultur ausblieb. Die Bildung von Einschlusskörpern ist bei den anderen ADHF1-Derivaten wesentlich geringer (siehe Abbildung 64, Spuren 4, 5, 7, 8 der unlöslichen Proteinfractionen). Mit den N-terminal verlängerten ADHF1-Derivaten (*E. coli* JM109 pAM130.3 und *E. coli* JM109 pAM131.3) konnte keine Enzymaktivität oder Proteinbande im SDS-Gel nachgewiesen werden, sodass vermutet wird, dass die in der DNA-Sequenz von *P. fluorescens* DSM 50106 weiter vor dem Gen von *adhF1* im Leserahmen liegenden ATG/GTG-Codons nicht dem Startcodon entsprechen.

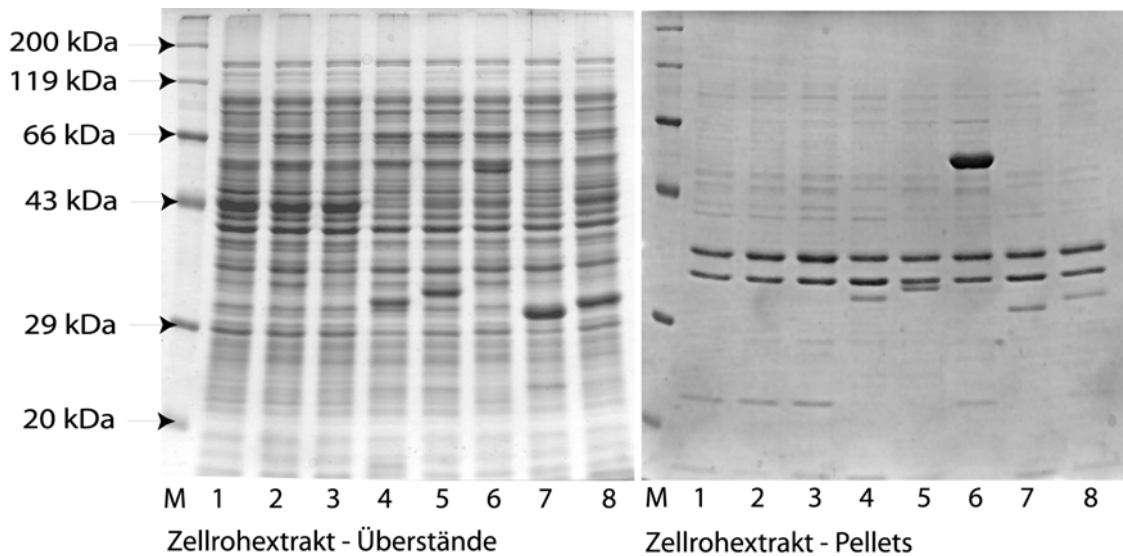


Abbildung 64: SDS-Page von Zellrohextrakten von induzierten *E. coli* JM109-Zellen ohne/mit *adhF1* in verschiedenen Expressionsvektoren nach 6 h Induktion mit 0,2 % Rhamnose bei 30 °C. Spuren M: Standardmarker von Roth 1: *E. coli* JM109; 2: *E. coli* JM109 pAM130.1; 3: *E. coli* JM109 pAM131.3; 4: *E. coli* JM109 pAM138.2; 5: *E. coli* JM109 pAM141.1; 6: *E. coli* JM109 pAM142.1; 7: *E. coli* JM109 pAM144.1; 8: *E. coli* JM109 pJOE4016.7.

Abbildung 65 zeigt dazu die Verteilung der spezifischen Aktivitäten. Als Substrat diente 2-Hexanol in einer Konzentration von 10 mM. Die Reaktion wurde in 50 mM Glycinpuffer pH 11 durchgeführt. Das pH-Optimum für 2-Hexanol und weitere Alkohole ist dazu in Kapitel 4.3.4 gezeigt. Als Kofaktor wurden 2 mM NAD⁺ zugegeben (Endkonzentration). Die in *E. coli* JM109 pAM144.1 und *E. coli* JM109 pJOE4016.7 exprimierten ADHF1-Derivate sind hinsichtlich ihrer spezifischen Aktivität sehr ähnlich. Ihre Aktivität ist etwa doppelt so hoch wie die von ADHF1 mit Strep-Tag (exprimiert von *E. coli* JM109 pAM138.2) und mehr als zehnmals so hoch wie die der ADHF1/eGFP-Fusion (exprimiert von *E. coli* pAM142.1). Daraus kann auch geschlossen werden, dass nicht jeder Tag für die Expression und hohe spezifische Aktivitäten des Proteins geeignet ist und die C-terminale Fusion mit einem Protein wie eGFP offensichtlich die Faltung und die spezifische Aktivität stark verändern kann (Bildung von Einschlusskörpern und niedrige spezifische Aktivität).

Weiterhin wurde die Proteinsequenz auch auf konservierte Metallbindestellen wie für Zink- oder Eisenatome untersucht. Es konnten keine derartigen Domänen gefunden werden, und auch die Zugabe von zweiwertigen Metallionen (Co²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺) während der Induktion von *E. coli* JM109 pJOE4016.7 und *E. coli* JM109 pAM144.1 führte nicht zu einer Verbesserung, sondern hauptsächlich zur Bildung von Einschlusskörpern mit einer deutlich niedrigeren spezifischen Aktivität als ohne Zugabe von Metallionen.

Mit den Daten der Expression von *adhF1* mit unterschiedlichen Stämmen und auf unterschiedlichen Expressionsvektoren konnte gezeigt werden, dass für eine optimale Enzymherstellung nur ein kurzer Induktionszeitraum zwischen 5 h und 8 h genutzt werden kann, um eine maximale Ausbeute an ADHF1 bei Expression in *E. coli* zu erhalten. Die höchsten Aktivitäten bei Expression von *adhF1* in *E. coli* JM109 konnten mit den Plasmiden pJOE4016.7 und pAM144.1 erreicht werden. Leider erwies sich gerade die Fusion von ADHF1 mit dem als Reporter gen gedachten eGFP als völlig ungeeignet, da hier das Fusionsprotein als Einschlusskörper produziert wurde, der offensichtlich stabil war und sich in der Zelle anhäufte.

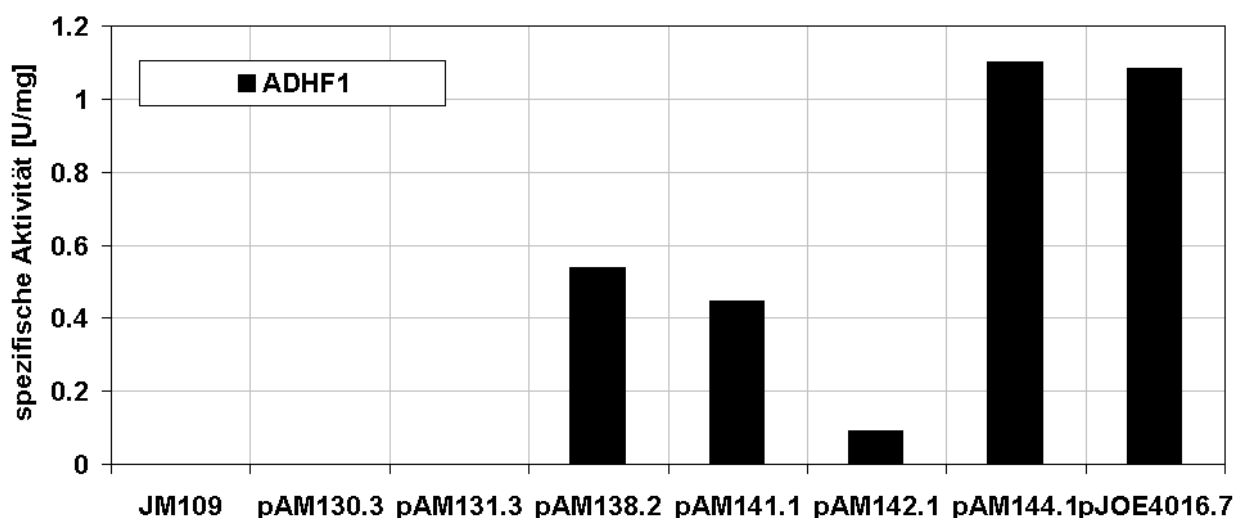


Abbildung 65: Spezifische Aktivitäten verschiedener ADHF1-Derivate mit 2-Hexanol in einer Konzentration von 10 mM in 50 mM Glycinpuffer pH 11 und NAD^+ (2 mM Endkonzentration). Die Induktion wurde in *E. coli* JM109 bei 30 °C und durch Zugabe von 0,2 % Rhamnose über 6 h durchgeführt. Angegeben sind hier die Expressionsvektoren bzw. die Kontrolle ohne Plasmid.

4.3.4 Substrate von ADHF1 und Aktivitätsoptima

Aktivitätstests mit der rekombinant in induzierten Zellen von *E. coli* JM109 pJOE4016.7 hergestellten ADHF1 wurden zunächst in Anlehnung an die von Hildebrandt et al. (2002) beschriebenen Substrate durchgeführt. Da das Substrat Acetophenon nicht kommerziell erhältlich war, wurde die halogenierte Variante p-Chloracetophenon analog zum Aktivitätstest von ADH-RE verwendet (siehe Kapitel 3.2.7.5). Die Aktivitätstests wurden zwischen pH 7 und pH 12 aufgrund des in der genannten Publikation angegebenen pH-Optimums (pH 8) für die Reduktion von Acetophenon durchgeführt. Mit p-Chloracetophenon und dem zweiten getesteten Substrat Cyclohexanon konnten jedoch bei Expression von *adhF1* in *E. coli* JM109 pJOE4016.7 und anderen Expressionsstämmen keine messbaren Umsetzungen

erzielt werden. Im Gegenteil, Kontrollen ohne Plasmid zeigen häufig höhere Aktivitäten, sodass die erhaltenen Aktivitätswerte als Basisaktivität von Dehydrogenasen bzw. Oxidoreduktasen des Expressionsstammes gewertet werden können. Es wurde daraufhin dazu übergegangen, aliphatische primäre und sekundäre Alkohole als Substrate zu untersuchen, von denen einige Beispiele der zyklischen korrespondierenden Ketone von Hildebrandt et al. (2002) genannt wurden. In Anlehnung an die 32 %-ige Identität der Proteinsequenz von ADHF1 an die von AdhA aus *P. furiosus* und deren Substratspektrum (van der Oost et al., 2001) wurden Isopropanol, 2(±)-Pentanol, 2(±)-Hexanol, 2(±)-Octanol, 1-Pentanol, 1-Octanol und Cyclohexanol als Substrate untersucht. Als Kofaktoren wurden NAD^+ und NADP^+ untersucht, da van der Oost et al. (2001) in AdhA aus *P. furiosus* eine NADP^+ -Bindestelle postulierten, die homolog zu einem Bereich von ADHF1 ist, und mit NADP^+ als Kofaktor höhere spezifische Aktivitäten von AdhA erreicht wurden. Das pH-Optimum von AdhA wurde mit pH 10 für die Alkoholoxidation angegeben und die Reaktionsbedingungen für die Untersuchung von ADHF1 übertragen und variiert. Für die pH-Wertbereiche pH 7 bis pH 12 wurde 50 mM Glycinpuffer verwendet, die genannten Substrate wurden in einer Endkonzentration von 10 mmol/l zugegeben.

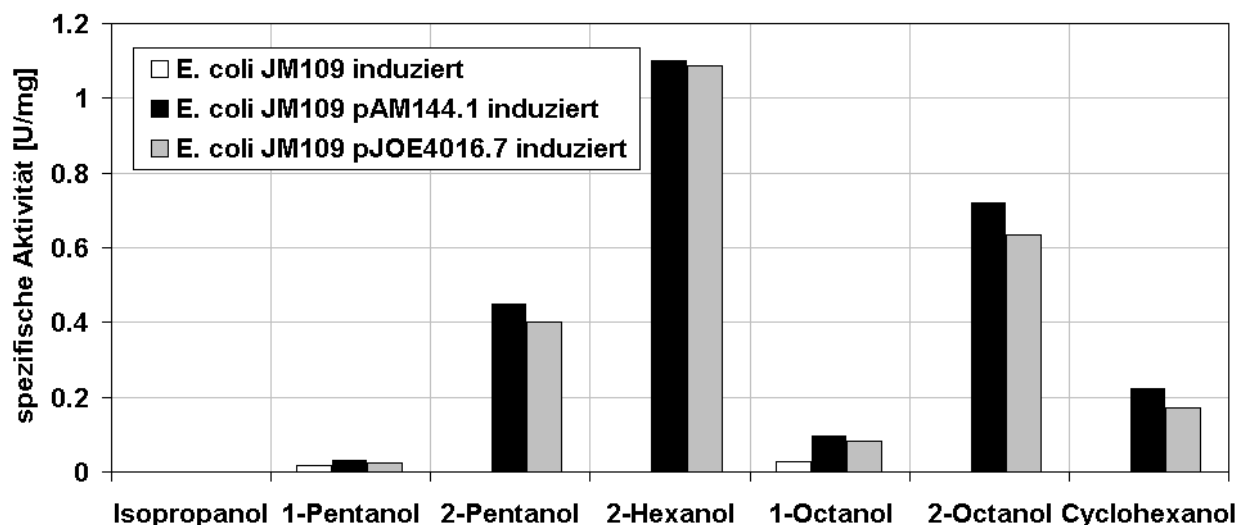


Abbildung 66: Spezifische Aktivitäten von ADHF1 (exprimiert in *E. coli* JM109 pAM144.1 und *E. coli* JM109 pJOE4016.7) gegenüber verschiedenen Alkoholen. Als Kontrolle wurde auch Zellrohextrakt von mit Rhamnose gewachsenen *E. coli* JM109 mit gemessen. Cyclohexanol wurde in einer Konzentration von 5 mM bereitgestellt, die anderen Substrate in einer Konzentration von 10 mM. Die Messungen erfolgte in 50 mM Glycinpuffer pH 11 bei 30 °C unter Zugabe von 2 mM NAD^+ .

Bei schlecht wasserlöslichen Substraten wurden die frisch hergestellten Substratlösungen vor dem Einsatz 5 min im Ultraschallwasserbad in Emulsionen umgewandelt. Unabhängig vom Substrat konnte eine Bevorzugung von NADP^+ als Kofaktor nicht

festgestellt werden. Eine Übereinstimmung mit der Substratspezifität von AdhA konnte jedoch gezeigt werden: beide Enzyme bevorzugten sekundäre Alkohole gegenüber primären. Während AdhA mit 2-Pentanol eine spezifische Aktivität von 46 U/mg erreichte (aufgereinigtes Enzym), konnte von ADHF1 im Zellrohextrakt mit 2(±)-Hexanol die höchste spezifische Aktivität erreicht werden (bis zu 2,4 U/mg z. B. in *E. coli* JM109 pJOE4016.7).

Aufgrund des für die Aktivitätstests genutzten Gemisches aus beiden 2-Hexanol-Isomeren kann jedoch keine Präferenz hinsichtlich der Selektivität von ADHF1 gemacht werden. Primäre und sekundäre Alkohole mit weniger oder mehr C-Atomen resultierten in geringerer spezifischer Aktivität. Das ist in Abbildung 66 dargestellt. Hier kann neben der offensichtlichen Präferenz von ADHF1 für 2-Hexanol gezeigt werden, dass Zellrohextrakt von mit Rhamnose gewachsenen *E. coli* JM109 auch 1-Pentanol und 1-Octanol aber keine sekundären Alkohole umsetzt, also eine Dehydrogenase für diese Substrate besitzen muss.

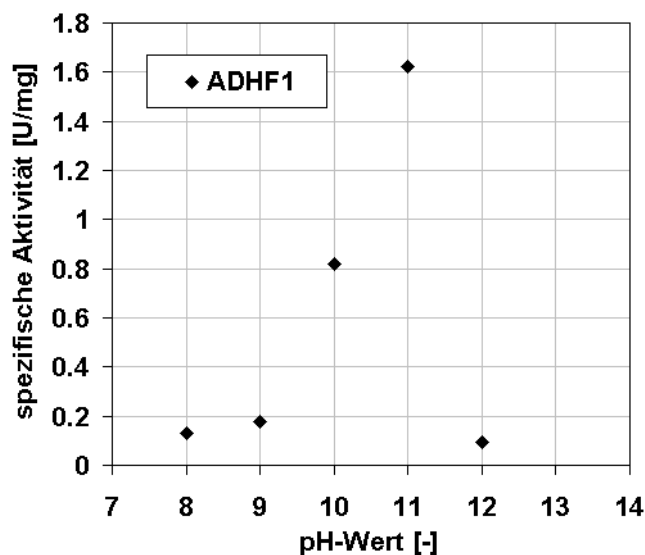


Abbildung 67: pH-Spektrum von ADHF1 (mit His-Tag). Die Daten wurden aufgenommen mit 10 mM 2-Hexanol als Substrat und 2 mM NAD⁺ als Kofaktor in 50 mM Glycinpuffer bei 30 °C durch Ermittlung der spezifischen Aktivität.

Mit ADHF1 aus Zellrohextrakt von induziertem *E. coli* JM109 pJOE4016.7 wurden auch Umsetzungen der Substrate p-Chloracetophenon (1,5 mM), p-Chlorphenylethanol (1,5 mM) und 2-Hexanon (10 mM) getestet. Bei p-Chloracetophenon und 2-Hexanon war die spezifische Aktivität mit 0,1 U/mg zwischen pH 6 und pH 12 in 50 mM Glycinpuffer bei 30 °C identisch. Neben der Aufnahme eines Substratspektrums wurde auch ein pH-Spektrum für einige der getesteten Alkohole aufgenommen (bei 30 °C). In Abbildung 67 wird dazu das pH-Spektrum der spezifischen Aktivität von ADHF1 gegenüber 2-Hexanol gezeigt, welches ein

eindeutiges Optimum des Enzyms bei pH 11 zeigt. Das für 2-Hexanol gezeigte vom pH-Wert abhängige Aktivitätsspektrum ist dabei repräsentativ für alle getesteten sekundären Alkohole. Bei primären Alkoholen und den Ketonen 2-Hexanon und p-Chloracetophenon ist die pH-Abhängigkeit der spezifischen Aktivität nicht so deutlich ausgeprägt, so dass zwischen pH 6 und pH 12 nahezu gleiche Werte ermittelt werden konnten.

4.3.5 Aufreinigung und Lagerstabilität von ADHF1

Rekombinant gebildete ADHF1 aus *E. coli* JM109 pJOE4016.7 und *E. coli* JM109 pAM138.2 wurde über eine Ni-NTA-Matrix (für His-Tag) bzw. eine Strep-Tactin-Säule (für Strep-Tag) aus Zellrohextrakt von 30 OD Zellen aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.7.6 und 3.2.7.7). Die Elutionsfraktionen wurden dialysiert. Vor der Dialyse wurden jeweils 12 µl der Elutionsfraktionen mit SDS-Page analysiert und die spezifische Aktivität von ADHF1 mit 2-Hexanol bei pH 11 ermittelt (siehe Tabelle 37). In Abbildung 68 ist dazu ein SDS-Gel abgebildet, das die Elutionsfraktionen der Strep- und His-Tag-Aufreinigungen zeigt. Im Vergleich zur spezifischen Aktivität des aufgereinigten Enzyms mit dem aus Zellrohextrakt, konnte maximal eine Versechsfachung der spezifischen Aktivität erreicht werden, was ungewöhnlich für aufgereinigte Enzyme ist.

Tabelle 37: Spezifische Aktivitäten und Proteingehalte der Zellrohextrakte und Elutionsfraktionen aus His- und Strep-Tag-Aufreinigung von ADHF1 (ZRE - Zellrohextrakt, E1 bis E7 - Elutionsfraktionen). Die spezifischen Aktivitäten der His-Tag-Aufreinigung wurden vor der Dialysierung ermittelt.

	ZRE	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
über His-Tag [mg/ml]	1,265	0,069	0,846	2,499	0,265	0,763	0,368	0,253
über His-Tag [U/mg]	1,488	0,114	2,261	1,626	3,176	0,208	0,238	0,220
über Strep-Tag [U/ml]	1,187	0,587	0,347	0,048	0,015	0	0	0
über Strep-Tag [U/mg]	0,500	3,151	2,381	2,139	1,605	0	0	0

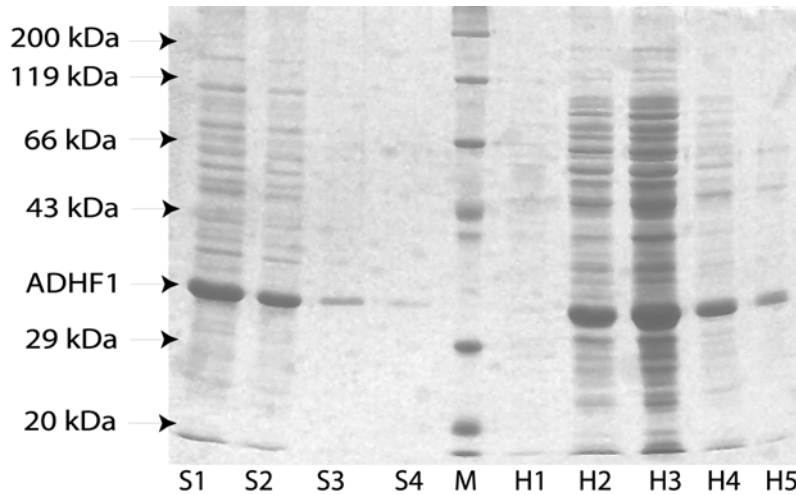


Abbildung 68: Aufreinigung von ADHF1 über eine Strep-Tactin-Säule und über eine Ni-NTA-Matrix. Die Elutionsfraktionen wurden im Fall der His-Tag-Aufreinigung vor der Dialyse aufgetragen. (M: Standardmarker von Roth; S1-S4: Elutionsfraktionen 1 bis 4 der Aufreinigung über die Strep-Tactin-Säule; H1 – H5: Elutionsfraktionen 1 bis 5 der Aufreinigung über die Ni-NTA-Matrix).

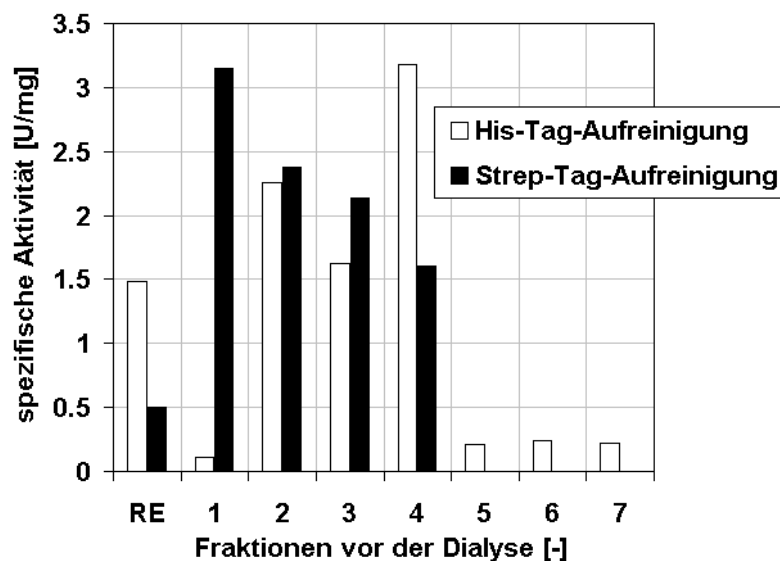


Abbildung 69: Spezifische Aktivitäten von ADHF1 vor und nach der Aufreinigung. Die Aktivität wurde mit 2-Hexanol bestimmt (RE = Zellrohextrakt).

In Abbildung 69 sind die spezifischen Aktivitäten von ADHF1 aus den Elutionsfraktionen vor der Dialyse des His-getaggtten Enzyms graphisch dargestellt. Als Referenz wurde auch die spezifische Aktivität des nicht aufgereinigten Enzyms mit angegeben. Die aktivsten Fraktionen waren Fraktion 2 bei der Strep-Tag-Aufreinigung und Fraktion 4 bei der His-Tag-Reinigung. Nach der Dialyse des über die Ni-NTA-Matrix aufgereinigten Enzyms wurden die Fraktionen nochmals auf Aktivität getestet. Es konnte dabei festgestellt werden, dass die Aktivität im Gegensatz zur Messung direkt nach

der Aufreinigung geringer war. Das über Strep-Tactin aufgereinigte Enzym hatte noch eine spezifische Aktivität von 1,1 U/mg in Fraktion 2, das mit Ni-NTA aufgereinigte Enzym vor der Dialyse noch eine Aktivität von 1,3 U/mg in Fraktion 4 (vergleiche mit Tabelle 37).

Aus dem Aktivitätsverlust nach der Dialyse kann geschlossen werden, dass das Enzym offensichtlich auch aufgereinigt nicht stabil ist und daher nach geeigneten Methoden zur Lagerung gesucht werden sollte. Die Zellrohextrakte wurden dazu in verschiedenen Puffern hergestellt und die spezifischen Aktivitäten über 7 Tage bestimmt.

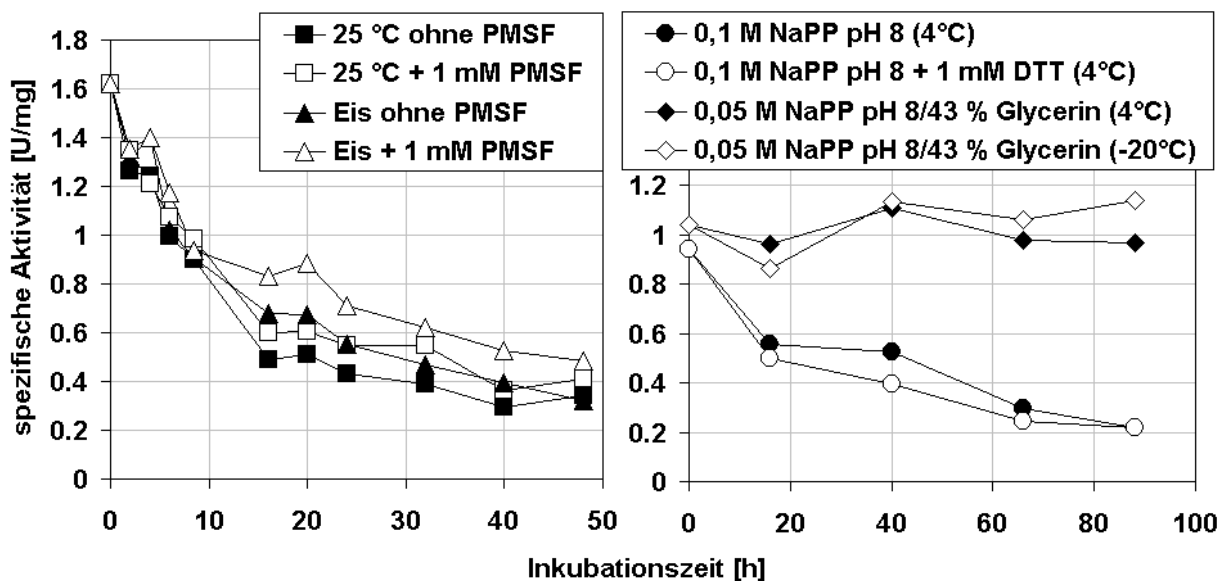


Abbildung 70: Lagerstabilität von ADHF1 in 0,1 M Natriumphosphatpuffer mit verschiedenen Zusätzen und unter verschiedenen Bedingungen.

Als Puffer wurden jeweils 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5 und pH 8, 0,1 M HEPES pH 7,5 und pH 8 und 0,1 M Tris/HCl pH 8 und pH 9 verwendet sowie 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 8 / 43 % Glycerin. Zum 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8 wurden weiterhin Zusätze gegeben, die das Enzym stabilisieren sollten: DTT (1 mM, für oxidationsempfindliche Enzyme) und PMSF (1 mM, Proteaseinhibitor). Bei der Untersuchung der Lagerung von ADHF1 in verschiedenen Puffern bei 4 °C und z. T. auf Eis fand bei allen Proben schon nach 16 h Inkubation ein Aktivitätsverlust von mehr als 50 % statt, so dass keiner der Puffer für eine stabile Lagerung optimal ist. Auch die Zugabe von PMSF und DTT führte, wie in Abbildung 70 sichtbar ist, nicht zu einer Stabilisierung des Enzyms. Zudem macht es auch keinen Unterschied, ob die Lagerung bei 25 °C, auf Eis oder bei 4 °C erfolgt, um einen Aktivitätsverlust zu erreichen. Es konnte immerhin eine Möglichkeit gefunden werden, das Enzym zu stabilisieren und über einen Zeitraum von etwa 4 Tagen relativ konstante Aktivitäten zu

erhalten. Die Lagerung erfolgte dazu in einem 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8 / 43 % Glycerin-Gemisch bei 4 °C im Kühlschrank und bei -20 °C im Tiefkühlschrank.

4.4 Genetisches Screening nach Alkoholdehydrogenasen

Das Screening nach neuen Alkoholdehydrogenasegenen durch die BLAST-Programme des Sanger-Institutes und des NCBI im Genom von *S. coelicolor* führte zur Identifizierung von bis zu 50 homologen putativen Enzymen/Genen, denen ADH- oder Oxidoreduktase-Aktivität zugeschrieben wird. Die Protein-Sequenzen von ADH-RE (mittelkettige, zinkabhängige ADH) und ADHF1 (kurzkettige ADH) dienten als Template für die Suche nach homologen DNA-Sequenzen im *S. coelicolor*-Genom. Entsprechend der höchsten Identität zu den Aminosäuresequenzen von ADH-RE und ADHF1 wurden 11 potentielle Oxidoreduktase-Gene ausgewählt, Oligonukleotide für die Amplifikation entwickelt und die Gene mit Schnittstellen für die Restriktionendonukleasen *NdeI* und *HindIII* für die Klonierung mittels PCR vervielfältigt. Es ergaben sich bei der Amplifikation und Expression der Gene eine Vielzahl von Problemen, auf die in den nachfolgenden Kapiteln eingegangen werden soll.

4.4.1 Expression von ADHs aus *S. coelicolor* A3(2)

Für die Klonierung und Expression in *E. coli* wurden die folgenden Streptomyceten-Gene anhand der Homologie ihrer Genprodukte zu ADH-RE bzw. ADHF1 ausgewählt: sco0199, sco0259, sco0365, sco0522, sco1611, sco2490, sco4304, sco6249, sco6442, sco7147 und sco7362. Abbildung 71 zeigt dazu einen phylogenetischen Stammbaum zur Darstellung der familiären Ähnlichkeit der 7 Enzyme aus *S. coelicolor*, die in *E. coli* rekombinant produziert werden konnten sowie ADHF1, ADH-RE und ADH-AP. Hier konnte die hohe Homologie von ADH-RE und ADH-AP mit SC9H11.16c (Gen: sco7362) gezeigt werden. Alle anderen genannten putativen ADHs aus *S. coelicolor* sind bezüglich ihrer Aminosäuresequenz, wie aus Alignments zu erkennen war, sehr weit von den ADHs aus *P. fluorescens* und *R. erythropolis* entfernt.

Wichtige Merkmale für die Auswahl waren auch das Vorhandensein einer NAD(H)-Bindestelle GXGXXG und optional einer Zinkbindestelle CGXCX₂CX₇C bei der Suche nach mittelkettigen ADHs. Die für die Amplifikationen benötigten Oligonukleotide und die Zielpasmide sind in Kapitel 3.2.5.3 aufgeführt. In den Genen sco0259 und sco1611 wurde das natürliche Startcodon GTG durch ATG ersetzt, um die Translation in *E. coli* zu optimieren. Die Gene sollten wie die meisten in dieser Arbeit untersuchten Gene unter Kontrolle des Rhamnose-Promotors exprimiert werden (siehe MM). Die Gene sco0199, sco0259, sco6249 und sco6442 konnten jedoch nicht

amplifiziert oder kloniert werden. Die meisten Erwartungen wurden in das Gen *sco7362* gesetzt, da dieses mit 75 % Identität zu ADH-RE am nächsten zu einer Alkoholdehydrogenase passte. In Tabelle 38 sind die Gene/Proteine aus *S. coelicolor* für die Untersuchung auf ADH-Aktivität nochmals zusammengestellt und jeweils Genbanknummer, vermutete Funktion und Vorhandensein einer Zinkbindestelle angegeben. Weiterhin wurde jeweils das Protein mit der höchsten Identität mit seiner Genbanknummer angegeben.

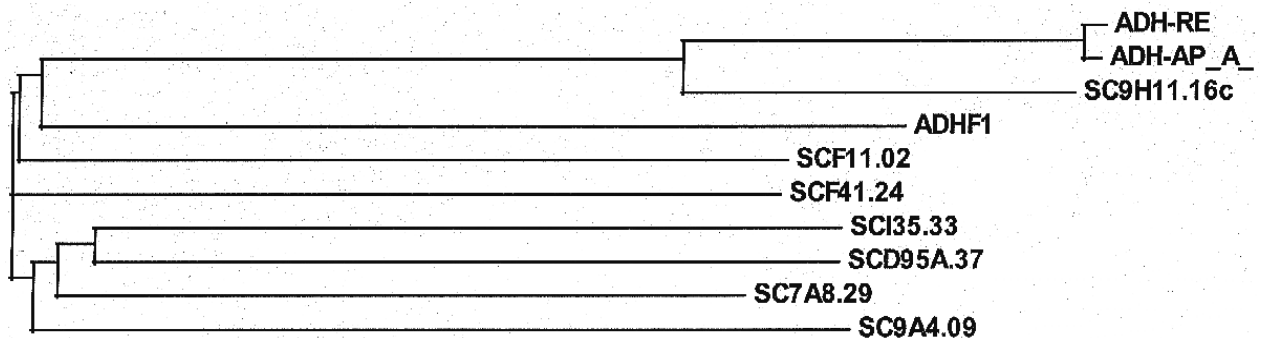


Abbildung 71: Phylogenetischer Stammbaum zur familiären Ähnlichkeit der 7 putativen in *E. coli* in dieser Arbeit produzierten ADHs aus *S. coelicolor* A3(2), ADHF1, ADH-RE und ADH-AP(A). Die Erstellung des Stammbaumes erfolgte unter www.expasy.org.

Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Genen variierte die Expression der Streptomyceten-Gene im Expressionsstamm *E. coli* JM109 beträchtlich. Proteinbanden in SDS-PAGE aus Zellrohextrakten von induzierten *E. coli*-Zellen JM109 mit Streptomyceten-Genen konnten immerhin bei fünf der klonierten Gene beobachtet werden: *sco0365* auf pAM18.2, *sco4304* auf pAM19.1, *sco2490* auf pAM24.3, *sco7147* auf pAM50.7 und *sco7362* auf pAM75.14, wobei einige Proteine als Einschlusskörper gebildet wurden. Die verringerte Bildung von Einschlusskörpern wurde beobachtet, wenn die Induktionstemperatur von 30 °C auf 28 °C abgesenkt wurde. In Abbildung 72 ist dazu ein repräsentativer Versuch gezeigt. Die Geninduktion wurde in *E. coli* JM109 bei 28 °C durchgeführt, die Probenahme erfolgte nach 9 h Induktionszeit mit 0,2 % Rhamnose. Bei Vorhandensein einer vermuteten Zinkbindestelle wurde als Kofaktor Zinkchlorid (0,5 mmol/l) zur Schüttelkultur zugegeben.

Trotz der offensichtlich hohen Expression der Gene *sco0365*, *sco4304*, *sco2490*, *sco7147* und *sco7362* konnte bei keinem der Stämme eine Aktivität gemessen werden. Als Substrate wurden p-Chloracetophenon, Aceton, 2-Pentanon und 2-Hexanon sowie die korrespondierenden Alkohole getestet. NADH und NAD⁺ wurden als Kofaktoren wie unter Kapitel 3.2.7.5 beschrieben zugegeben. Als Grundlage wurden dafür die Protokolle zum Test der Aktivität von ADH-RE und ADHF1 verwendet. Das Sub-

strat p-Chloracetophenon wurde in einer Endkonzentration von 1,5 mmol/l, die anderen in Konzentrationen von 10 mmol/l auf Umsetzung getestet.

Die Suche nach neuen ADHs in *S. coelicolor* A3(2) führte somit nicht zu neuen Enzymen für Ganzzellkatalysatoren, jedoch könnten mit den Genen, die gut exprimiert werden, weitere Substrate getestet und möglicherweise auch eine physiologische Funktion gefunden werden.

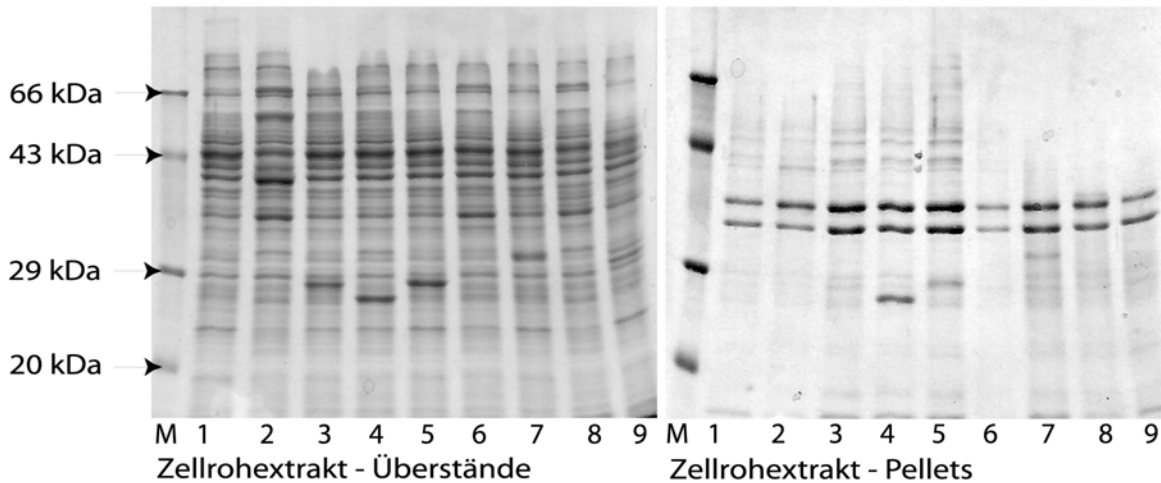


Abbildung 72: Induktion vermuteter Alkoholdehydrogenasegene aus *S. coelicolor* A3(2) unter Kontrolle des Rhamnose-Promotors bei 28 °C in *E. coli* JM109. Die SDS-Page wurde mit 12 µl des Zellrohextraktes der Proben durchgeführt, die nach 9 h Induktion genommen wurden. Bei der Induktion von *E. coli* JM109 pAM75.14 wurden zusätzlich 0,5 mM ZnCl₂ zugegeben. Spuren (nur Angabe des Plasmides und erwartete Größe der Bande des rekombinanten Proteins): M: Standardmarker von Roth; 1: *E. coli* JM109 ohne Plasmid; 2: *E. coli* JM109 pNO9 (40 kDa) 3: pAM18.2 (25,7 kDa); 4: pAM19.1 (25,6 kDa); 5: pAM24.3 (25,5 kDa); 6: pAM32.8 (27,2 kDa); 7: pAM50.7 (26,8 kDa); 8: pAM75.14 (35,3 kDa); 9: pAM77.6 (27,7 kDa).

Tabelle 38: Potentielle ADHs aus *S. coelicolor*.

Protein/ Gen/ Plas- mid	Größe (bp)	Genbank-Nr.	höchste Identität mit	% Id- enti- tät	vermutete Funktion	Zinkbin- destelle
SCJ12.11c/ sco0199	1022	NP_624534	ZP_00549517	65	mittelkettige ADH	ja
SCF20.05/ sco0259	1025	NP_733495	BAD03962 (ADH, <i>Gordonia</i> sp.)	76	mittelkettige ADH	ja
SCF41.24/ sco0365/ pAM18.2	746	NP_624688	YP_112071 (De- hydrogenase, <i>Burkholderia</i> sp.)	40	Dehydroge- nase, kurz- kettige ADH	nein
SCF11.02/ sco0522/ pAM77.6	791	NP_624836	YP_233305	65	Oxidoreduk- tase	nein
SCI35.33c/ sco1611	782	NP_625887	NP_827903 (Dehydrogenase, <i>S. avermitilis</i>)	91	Dehydroge- nase	nein
SC7A8.29/ sco2490/ pAM24.3	767	NP_626732	YP_163313 (De- hydrogenase, <i>Z.</i> <i>mobilis</i>)	44	Dehydroge- nase	nein
SCD95A.37/ sco4304/ pAM19.1	749	NP_628476	NP_851536 (Glucosedehydro- genase, <i>S. rochei</i>)	61	Oxidoreduk- tase	nein
SCAH10.14 c sco6249	776	NP_630349	ZP_00265723 (Dehydrogenase, <i>P. fluorescens</i> PfO-1)	51	Dehydroge- nase, Re- duktase	nein
SC9B5.09/ sco6442	1103	NP_630527	AAD23401 (Benzylalkohol- dehydrogenase, <i>S. aureolaciens</i>)	78	mittelkettige ADH	ja
SC9A4.09/ sco7147/ pAM50.7	767	NP_631206	YP_074421 (Keto- reduktase, <i>Symbi-</i> <i>obacterium ther-</i> <i>mophilum</i>)	45	Ketoreduk- tase	nein
SC9H11.16c / sco7362/ pAM75.14	1040	NP_631415	YP_119721 (Dehydrogenase, <i>Nocardia farcinica</i>)	78	Oxidoreduk- tase	ja

5 Diskussion und Ausblick

5.1 FDH als kofaktorregenerierendes Enzym

FDHs sind für Biokatalysen als NADH-regenerierende Enzyme besonders geeignet, da sie aus der Oxidation von Formiat nur CO₂ herstellen und keine weiteren Nebenprodukte die Synthese des eigentlichen Produktes (z. B. Aminosäure oder Alkohol) beeinflussen. Von den verwendeten FDHs wurde das von Slusarczyk et al. (2000) modifizierte FDH-Gen aus *C. boidinii* (*fdhCB*) als zuerst verfügbares Gen für die Kofaktorregenerierung in pAM3.25 inseriert, mit *ldh* aus *B. cereus* (Stoyan et al., 1997) auf pAM10.1 koexprimiert und Umsatzanalysen von Trimethylpyruvat zu L-*tert*-Leucin durchgeführt (Menzel et al., 2004, diese Arbeit). Dieser Ganzzellkatalysator sollte als Modellsystem für weitere reduktive Aminierungen und Ketoreduktionen mit ganzen Zellen und einer Formiatdehydrogenase als kofaktorregenerierendes Enzym validiert werden. Mit aufgereinigten Enzymen wurde die reduktive Aminierung von α -Ketosäuren wie Trimethylpyruvat und Substratanaloga bereits von Bommarius et al. (1998) beschrieben. Als Endprodukte entstehen L-Aminosäuren wie L-*tert*-Leucin oder L-Neopentylglycin. Für die Kofaktorregenerierung wird aufgrund der irreversiblen Oxidation von Formiat zu CO₂ und Wasserstoffäquivalenten FDH-CB verwendet. Galkin et al. (1997) verwenden bereits ganze Zellen zur Herstellung optisch aktiver D-Aminosäuren wie D-Glutamat und D-Leucin. Die verwendeten *E. coli*-Zellen enthalten dafür ein Plasmid, das Gene für eine D-spezifische Aminotransferase, eine Alaninracemase, eine L-Alanindehydrogenase und FDH-MV codiert und die durch einen *lac*-Promotor kontrolliert werden. Für die Herstellung von L-Leucin aus α -Ketoisokaproat oder L-Alanin aus Pyruvat wurde ebenfalls FDH-CB als kofaktorregenerierendes Enzym eingesetzt. Hinter dem *lac*-Promotor wurde in allen Fällen *fdhCB* zuerst in der Reihenfolge der zu transkribierenden Gene inseriert. Es wurden Substratkonzentrationen für die Herstellung der L-Aminosäuren bis zu 0,6 mol/l untersucht, wobei Ausbeuten zwischen 75 und 97 % mit e.e.-Werten zwischen 80 und 100 % erreicht wurden. Bei der Herstellung von D-Aminosäuren wurden Substratkonzentrationen bis 0,3 mol/l untersucht. Die Ausbeuten lagen zwischen 5 % (D-Tyrosin) und 95 % (α -Aminobuttersäure) mit e.e.-Werten zwischen 0 % (α -Aminobuttersäure) und 100 % (D-Glutamat, D-Leucin). FDH-CB wird ebenfalls von Weckbecker und Hummel (2004) als kofaktorregenerierendes Enzym zur Herstellung chiraler Alkohole mit einer NADPH-abhängigen ADH aus *L. kefir* verwendet. Die Kofaktorregenerierung in den Ganzzellkatalysatoren wird hier durch ein zusätzliches Enzym – Pyridinnukleotidtranshydrogenase –, welche die Wasserstoffäquivalente

von NADH auf NADP⁺ überträgt, ermöglicht. Es konnte eine Ausbeute von 70 % (*R*)-Phenylethanol aus 10 mmol/l Acetophenon erzielt werden. Gröger et al. (2003) beschreiben einen zweiphasigen Reaktionsprozess zur Herstellung von wasserunlöslichen Alkoholen mit FDH-CB und ADH-RE. Es konnten beispielsweise bei einer Substratkonzentration von *p*-Chloracetophenon von 200 mM mit aufgereinigten Enzymen Ausbeuten von 63 % Produkt *p*-Chlorphenylethanol erzielt werden. Das Substrat der FDHs (aus *C. boidinii* und *M. vaccae* N10) – Formiat – wird als Natrium- oder Ammoniumsalz in fünf- bis 10-fachem Überschuss im Vergleich zum Substrat für die Aminosäure- oder Alkoholdehydrogenase zugegeben. Ernst et al. (2005) untersuchten den Ganzzellkatalysator *E. coli* BL21 DE3 mit rekombinanter FDH-MV und (*R*)-spezifischer ADH aus *L. brevis* zur Herstellung von Methyl-(*R*)-Hydroxybutansäure. Es konnten Substratkonzentrationen bis 40 mmol/l mit 20 g/l Biofeuchtmasse umgesetzt werden. Die Problematik der geringen Produktherstellung ergibt sich auch daraus, dass FDH-MV NAD⁺-abhängig und ADH aus *L. brevis* NADPH-abhängig ist und letztere NADH nur in geringem Maß akzeptiert. FDH-MV wurde ebenfalls von Kaup et al. (2004) als kofaktorregenerierendes Enzym bei der Herstellung von D-Mannitol aus Fruktose verwendet. Hier wird auch der Effekt des pH-Anstieges während der Produktsynthese beschrieben. Dieser entsteht durch die äquimolare Herstellung von Natriumhydroxid während der Oxidation von Natriumformiat zu CO₂. Der pH-Wert steigt bei Kaup et al. (2004) im gepufferten Reaktionsmedium (0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5) um eine pH-Einheit auf pH 7,5 zwei Stunden nach Reaktionsstart. Dieser Effekt konnte sowohl bei Verwendung der FDHs als auch des Malic Enzymes (diese Arbeit), allerdings nicht so drastisch, beobachtet werden.

In dieser Arbeit konnte sowohl für die Herstellung von *L-tert*-Leucin als auch für die Herstellung von *p*-Chlorphenylethanol als chiraler Alkohol mit ganzen Zellen gezeigt werden, dass mit FDH-CB als kofaktorregenerierendes Enzym trotz geringerer Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln (Slusarczyk et al., 2000) als FDH-MV hohe Umsatzraten (> 90 %) auch bei Substratkonzentrationen von bis zu 500 mmol/l Trimethylpyruvat oder *p*-Chloracetophenon erreicht werden können. Unter limitierenden Bedingungen (hohe Substrat-, geringe Biomasse- und NAD⁺-Konzentration) könnte sich FDH-MV trotzdem als optimales Enzym für die Regenerierung von NADH herausstellen, da sich dann Unterschiede in der Enzymstabilität und Reaktionsgeschwindigkeit durch höhere spezifische Aktivität von FDH-MV zeigen sollten. Im Vergleich mit GDH als kofaktorregenerierendes Enzym ist auch die Reaktionsführung wesentlich einfacher, da maximal eine leichte Erhöhung des Reaktions-pH-Wertes auftreten kann, während bei GDH eine kontinuierliche Regulierung des pH-Wertes erfolgen muss, da das gebildete Nebenprodukt Gluconolacton zu einer starken Ansäuerung des Reaktionsmediums führt, die wiederum einen Reaktionsabbruch zur

Folge hat. Gluconolacton führt darüber hinaus noch zu einer komplexeren Aufreinigung des eigentlichen Produktes.

5.2 Malic Enzyme als kofaktorregenerierendes Enzym

Aufgrund seiner höheren spezifischen Aktivität (40 U/mg) bei Einzelexpression unter dem Rhamnosepromotor (Stumpp et al., 2000) im Vergleich zu den verschiedenen untersuchten FDHs aus *C. boidinii* (1 U/mg), *M. vaccae* N10 (1,7 U/mg) und *M. extorquens* AM1 (0,12 U/mg, diese Arbeit) wurde das NAD⁺-abhängige Malic Enzyme aus *E. coli* (siehe Kapitel 4.1.6) als Alternative für die Regenerierung des Kofaktors NADH bei den untersuchten Biotransformationen gesehen. Die Anwendung von Malic Enzyme aus *E. coli* ist durch Naamniek et al. (2003) im deutschen Patent DE10240603 beschrieben. Das durch die oxidative Decarboxylierung von L-Malat entstandene Pyruvat wird hier durch reduktive Aminierung von Alanindehydrogenase weiter zu L-Alanin umgewandelt. Neben der Herstellung von L-Alanin umfasst das Patent DE 10240603 auch die Herstellungen von L-*tert*-Leucin und p-Chlorphenylethanol mit Malic Enzyme als kofaktorregenerierendes Enzym. Vergleiche mit optimierter FDH-CB (Slusarczyk et al., 2000) als kofaktorregenerierendes Enzym wurden gezogen. Als Substratkonzentrationen wurden jeweils 10 mmol/l α -Ketoisocaproat bzw. p-Chloracetophenon eingesetzt. Bei der Herstellung von L-*tert*-Leucin mit LDH aus *B. cereus* wurden dabei keine Unterschiede bei der Anwendung von Malic Enzyme oder FDH-CB in der Umsetzung sichtbar. Die Ausbeute ist nach 2 h Reaktionszeit mit beiden kofaktorregenerierenden Enzymen identisch bei 99 %. Ein derartiger Vergleich ist für FDH-CB bei der Reduktion von p-Chloracetophenon nicht aufgeführt. Mit Malic Enzyme konnten bei 10 mmol/l Substratkonzentration 100 % Ausbeute erzielt werden.

Das in dieser Arbeit verwendete Malic Enzyme in Kombination mit LDH aus *B. cereus* oder ADH-RE schien mit spezifischen Aktivitäten von 15 - 20 U/mg Gesamtprotein durchaus zur Kofaktorregenerierung geeignet zu sein. Im Vergleich zu FDH-CB, die nach Koexpression mit 0,2 U/mg deutlich unter der spezifischen Aktivität des Malic Enzymes lag, sollten die Biokatalysen höhere Reaktionsgeschwindigkeiten besitzen, da der Kofaktor schneller regeneriert werden sollte. Im Vergleich zu Naamniek et al. (2003) wurde jedoch bei der Ganzzellkatalysatorentwicklung von Beginn an mit wesentlich höheren Substratkonzentrationen gearbeitet (> 50 mM), da diese für einen industriellen Einsatz eine wichtige Rolle spielen. Für die Herstellung von L-*tert*-Leucin wurden beispielsweise die Bestimmungen von Temperatur- und pH-Optimum bei 300 mmol/l Trimethylpyruvat durchgeführt. Schon hier zeigte sich, dass sich mit dem LDH/FDH-CB-Ganzzellkatalysator Ausbeuten von > 98 % im Vergleich zu < 90 % mit dem Malic Enzyme/LDH-Ganzzellkatalysator erzielen ließen. Ähnliche

Unterschiede ergaben sich auch für die Herstellung von p-Chlorphenylethanol, wo bis zu 25 % höhere Ausbeuten mit dem FDH-CB/ADH-RE-Ganzzellkatalysator erzielt wurden. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die spezifische Aktivität von Malic Enzyme mit zunehmender NADH-Konzentration und hohen Malat-Konzentrationen (> 500 mM) in der Reaktionslösung abnimmt (siehe Kapitel 4.2.11). Da jedoch Reduktion und Oxidation der Substrate des Ganzzellkatalysators Malic Enzyme/ADH-RE aufgrund der ähnlichen spezifischen Aktivitäten (Malic Enzyme: 16,1 U/mg, ADH-RE: 15,4 U/mg) etwa gleich schnell ablaufen sollten, sollte ein NADH-Überschuss in der Reaktionslösung nicht auftreten und damit auch keine Inhibierung von Malic Enzyme durch NADH. Auch eine inhibierende Wirkung von Pyruvat oder Malat auf die spezifischen Aktivitäten von ADH-RE und LDH konnten nicht gezeigt werden (siehe Kapitel 4.2.11) und eine Rückreaktion von Pyruvat zu Malat im Ganzzellkatalysator kann ebenfalls nahezu ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde die Möglichkeit einer unspezifischen Reaktion von LDH und ADH-RE in Betracht gezogen, die aus Pyruvat L-Alanin bzw. Milchsäure durch Reduktion der Ketogruppe in Abhängigkeit von NADH herstellen könnten. Es wurden allerdings keine Hinweise in Veröffentlichungen über derartige Reaktionen von LDH oder ADH-RE gefunden. In Kapitel 4.2.11 konnte jedoch gezeigt werden, dass offensichtlich ein drittes Enzym NADH der Reaktion entziehen kann. Die in *E. coli* vorhandene Lactatdehydrogenase LdhA (Bunch et al., 1997; Jiang et al., 2001) katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Milchsäure unter Verbrauch von NADH. Das Enzym, das eigentlich vorrangig bei anaerobem Glukosestoffwechsel aktiv ist, besitzt auch bei aerober Kultivierung und in der stationären Wachstumsphase spezifische Aktivitäten von 0,96 U/mg (Bunch et al., 1997, in *E. coli* LCB320). In *E. coli* BW3110 wurde die Basalaktivität bei aerober Kultivierung in der stationären Wachstumsphase mit Werten zwischen 1,3 U/mg und 1,7 U/mg bestimmt und beträgt etwa $\frac{1}{4}$ der spezifischen Aktivität von koexprimierter LDH und $\frac{1}{10}$ der spezifischen Aktivität von koexprimierter ADH-RE (jeweils mit Malic Enzyme). Das vom Malic Enzyme regenerierte NADH könnte folglich zu 25 % bzw. 10 % in der Konkurrenzreaktion verloren gehen und nicht mehr für die gewünschte Ketoreduktion zur Verfügung stehen, was folglich zu geringeren Umsetzungen als mit FDH als kofaktorregenerierendes Enzym führt. Um Malic Enzyme dennoch als kofaktorregenerierendes Enzym verwenden zu können, sollte entweder auf Reaktionen mit gereinigten Enzymen übergegangen werden, um Nebenreaktionen durch LdhA zu vermeiden, oder ein für Fermentationen geeigneter Stamm konstruiert werden, bei dem LdhA ausgeschaltet ist.

5.3 Zugabe vom Kofaktor NAD⁺ zur Biokatalyse

Werden Biotransformationen mit aufgereinigten und freien oder immobilisierten Oxioreduktasen durchgeführt, ist die Zugabe von Kofaktoren unerlässlich, um die Katalyse zu ermöglichen (Bommarius et al., 1994; Bommarius et al., 1998). Die meisten publizierten Ganzzellkatalysen beschreiben Substratkonzentrationen unter 50 mmol/l. Der Kofaktor NAD(P)⁺ wird in Konzentrationen von 0 mM bis 5 mM zugeben (Weckbecker und Hummel, 2004; Ernst et al., 2005). Galkin et al. (1997) zeigen bei der Herstellung von enantiomerenreinen D- und L-Aminosäuren mit ruhenden Zellen, dass eine Zugabe von zusätzlichem Kofaktor zumindest bis zu Substratkonzentrationen von 0,3 mol/l nicht notwendig ist. Höhere Substratkonzentrationen konnten nicht vollständig umgesetzt werden. Daher wurde vermutet, dass das Koenzym vermutlich in den Zellen abgebaut wird (Simon, 1995). Auch Itoh et al. (2002) zeigen bei der Umsetzung von 53 mM m-Chlorphenacylchlorid zu (*R*)-2-Chlor-1,3-Chlorphenylethanol, dass die Kofaktorzugabe einen signifikanten Einfluss auf die Produktsynthese hat und mit 0,5 mM NAD⁺ optimal ist. Kaup et al. (2004) geben bei der Herstellung von D-Mannitol aus 0,5 mol/l Fruktose mit ganzen Zellen keine Kofaktoren zu und erhalten Ausbeuten von 45 %. Allerdings wird hier Formiat nicht im Überschuss sondern in gleicher Konzentration wie Fruktose zugegeben, was die Umsetzung ebenfalls beeinflussen kann.

In der vorliegenden Arbeit konnten diese Beobachtungen reproduziert werden. Die Herstellung von L-*tert*-Leucin konnte bis zu einer Konzentration von 0,4 mol/l Trimethylpyruvat bei einer Biomassekonzentration von *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 von 67 g/l ohne Zugabe von Kofaktor mit hohen Umsätzen durchgeführt werden. Bei höheren Konzentrationen bis zu 0,9 mol/l genügten allerdings NAD⁺-Konzentrationen von 1 mmol/l, um das Substrat vollständig umzuwandeln (siehe Kapitel 4.1.9.2). Die Herstellung von p-Chlorphenylethanol mit einem Ganzzellkatalysator bestehend aus FDH-CB und ADH-RE (50 g/l Biofeuchtmasse) war ab einer Substratkonzentration > 150 mmol/l p-Chloracetophenon auf Zugabe von NAD⁺ angewiesen, wobei die optimale Konzentration des zugebenen Kofaktors in Abhängigkeit des Biokatalysators zwischen 1 mM und 5 mM NAD⁺ liegt (siehe Kapitel 4.2.9.1 und 4.2.9.2). Für den Biokatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 sind zum Beispiel 5 mM NAD⁺ für eine mehr als 85 %-ige Umsetzung von 250 mM p-Chloracetophenon notwendig, der Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 benötigt für eine 90 %-ige Umsetzung nur noch 1 mM. Für Ganzzellkatalysatoren mit FDH-MV als kofaktorregenerierendes Enzym wird vermutet, dass noch geringere Konzentrationen NAD⁺ ausreichen, um die Reaktion nahezu vollständig ablaufen zu lassen. Die von Galkin et al. (1997) gemachten Beobachtungen über die maximale Substratkonzentration, bei der noch kein Kofaktor zugegeben werden muss, scheinen somit abhängig von

der Art des Substrates, dem Verhältnis der Substrate zu den beteiligten Enzymen bzw. Menge der eingesetzten Zellen und der Stabilität der beteiligten Enzyme zu sein, und müssen für jede Katalyse speziell untersucht werden.

5.4 Kontrolle und Regulation des pH-Wertes

Wie auch bei chemischen Katalysen, müssen bei Biotransformationen bestimmte physikalische Bedingungen eingehalten werden. Die Einstellung des Reaktionsparameters Temperatur auf 30 °C war insofern einfach, da die verwendeten Enzyme für die Biotransformationen unter diesen Bedingungen gute Aktivitäten besitzen und stabil sind, keine Denaturierung des Zellproteins erfolgt und der Energieeintrag im Vergleich zu höheren Temperaturen gering ist. Reaktionen unterhalb 30 °C liefen im Allgemeinen langsamer ab und es wurden bereits bei 2 K weniger bis zu 10 % und bei 5 K weniger bis zu 25 % weniger Ausbeute erzielt (siehe Kapitel 4.1.8.1). Der Reaktionsparameter pH-Wert wurde in Abhängigkeit der verwendeten Enzyme bzw. der pH-Optima angepasst. Die meisten Autoren verwenden gepufferte Reaktionssysteme für Biotransformationen oder regulieren die pH-Erhöhung, die bei Verwendung von FDH als kofaktorregenerierendes Enzym aus der Oxidation des Formiat hervorgeht, mit einer Säure. Die Herstellung von D-Mannitol aus Fruktose wurde beispielsweise in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 durchgeführt und pH-Erhönungen mit 3 M Ameisensäure titriert (Kaup et al., 2004). Ohne pH-Kontrolle konnte bei einer Fruktosekonzentration von 230 mM eine Ausbeute von 92 % bei einem pH-Anstieg von pH 6,5 auf 7,8 erreicht werden, wobei der größte Anteil der Stoffumwandlung in den ersten zwei Stunden stattfand. Unter pH-Kontrolle wurden 500 mmol/l Fruktose zu 84 % umgesetzt. Vergleiche mit Ausbeuten bei Umsetzungen geringer konzentrierter Fruktose wurden nicht angegeben. Ernst et al. (2005) verwenden ebenfalls gepufferte Reaktionslösungen zur Herstellung chiraler Alkohole oder Hydroxyestern mittels ADH aus *L. brevis* und FDH-MV. Die Pufferung erfolgte hier mit 0,5 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5. Ein pH-Anstieg wie bei Kaup et al. (2004) wurde aufgrund der starken Pufferung nicht beobachtet, allerdings könnten derartig hohe Pufferkonzentrationen die Enzymaktivitäten negativ beeinflussen und die Produktausbeuten verringern.

Für die Herstellung von L-*tert*-Leucin (diese Arbeit) wurde die Reaktionslösung nicht gepuffert, sondern die Reaktionen bei den vorher bestimmten optimalen Anfangs-pH-Werten gestartet und laufen gelassen (pH 6,9 bis pH 7 für den FDH-CB/LDH-Ganzzellkatalysator; pH 6 bis pH 6,2 für den Malic Enzyme/LDH-Ganzzellkatalysator). Ob und wie schnell eine Reaktion ablief, konnte man an der Geschwindigkeit des Anstiegs des pH-Wertes erkennen. Das die Reaktion nicht reguliert werden muss, bedeutet zudem einen einfacheren Reaktionsaufbau für größere Versuchsansätze

als im Labormaßstab und eine Kostenersparnis, wenn auf die Säure verzichtet werden kann. Für die Herstellung von p-Chlorphenylethanol mit den FDH/ADH-Ganzzellkatalysatoren wurde das Reaktionsmedium in Anlehnung an die Reaktionsführung des Kooperationspartners Degussa mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7 gepuffert, allerdings keine pH-Regulation durchgeführt. Der pH-Wert nach den Reaktionen war immer höher als der Anfangs-pH-Wert und lag zwischen pH 7,1 und pH 7,5.

5.5 Der Ganzzellkatalysator LDH/FDH-CB

Mit rekombinanter LDH aus *B. cereus* und FDH aus *C. boidinii* sollte in *E. coli* ein Ganzzellkatalysator entwickelt werden, der als Modellsystem für eine Plattform weiterer Katalysatoren dieser Art dienen könnte. Beide verwendeten Enzyme wurden zuvor bereits charakterisiert. LDH (*ldh*) wurde von Stoyan et al. (1997) sowie von Ansorge und Kula (2000) charakterisiert und in großem Maßstab hergestellt (600.000 U/l). Die Charakterisierung von FDH-CB (bzw. *fdhCB*) wurde beispielsweise von Slusarczyk et al. (2000) und Labrou und Ridgen (2001) durchgeführt. Die Entwicklung des Modellsystems mit dem Substrat Trimethylpyruvat, das zu L-*tert*-Leucin umgewandelt werden sollte, war zudem von wirtschaftlichem Interesse zumal L-*tert*-Leucin von Unternehmen wie Sandoz, Abbott oder Zeneca als Komponente von pharmazeutisch aktiven Strukturen von antiviralen oder Antitumorwirkstoffen eingesetzt wird (Bommarius et al., 1998). L-*tert*-Leucin wurde bisher mit Enzymmembranreaktoren, in denen FDH-CB und LDH immobilisiert sind, oder mittels mehrstufiger chemischer Katalysen hergestellt. Hummel (1999) führt dazu Daten der Herstellung mittels Enzymmembranreaktoren auf, wobei 0,5 mol/l Trimethylpyruvat zu bis zu 95 % zu L-*tert*-Leucin in 4 h umgewandelt werden. Kragl et al. (1996) simulieren die Herstellung von L-*tert*-Leucin mittels Enzymmembranreaktoren und vergleichen mit experimentellen Untersuchungen. Hier werden ebenfalls 500 mM Trimethylpyruvat umgesetzt, wobei eine Produktausbeute von 93 % (experimentell) und 93,5 % (simuliert) erreicht wird. Als Kofaktor muss 0,2 mmol/l NAD^+ zugegeben werden. Ohne Zugabe von Kofaktor mit 67 g/l Biofeuchtmasse konnten von 500 mM Trimethylpyruvat etwa 60 % umgesetzt werden (diese Arbeit). Die Zugabe von 1 mM NAD^+ zur Reaktionslösung hat jedoch zum Vollumsatz geführt, wie bei der Umsetzung von 900 mM Trimethylpyruvat gezeigt werden konnte.

Zudosierungen von Substraten, um die Produktausbeute zu erhöhen, wurden von Galkin et al. (1997), Kaup et al. (2004) und Ernst et al. (2005) beschrieben. Galkin et al. (1997) geben bei der Herstellung von L-Phenylalanin aus Phenylpyruvat mit ruhenden *E. coli*-Zellen, die über rekombinante Phenylalanindehydrogenase und FDH-CB verfügen, Phenylpyruvat schrittweise zu, um Konzentrationen > 50 mM aufgrund

von Substratinhibierung zu vermeiden und eine Endkonzentration von 0,3 mol/l Phenylalanin zu erreichen. Kaup et al. (2004) versuchten ebenfalls bei der Herstellung von D-Mannitol aus Fruktose mit ganzen *E. coli*-Zellen, die über rekombinante Mannitoldehydrogenase und FDH (aus *M. vaccae* N10) verfügten, die Produktmenge durch Zudosierung zu erhöhen. Nach 9 h Reaktionszeit der Umsetzung von 500 mM Fruktose zu Mannitol wurden nochmals 100 mM Fruktose zugegeben, um die Ausbeute zu erhöhen. Es konnte eine Endkonzentration von D-Mannitol von 500 mM nach 23 h Reaktionszeit erreicht werden (83,3 %). Ernst et al. (2005) konnten mit einer einmaligen Zugabe von weiteren 20 mM Methylacetoacetat zur Reaktionslösung, die bereits 20 mM Methylacetoacetat enthielt, nach 3 h Reaktionszeit die Produktkonzentration von Methyl-(*R*)-Hydroxybutansäure auf 40 mM verdoppeln, wobei die Zudosierung bei diesen Konzentrationen vermutlich nicht notwendig gewesen wäre. Der Biokatalysator *E. coli* mit rekombinanter ADH aus *L. brevis* und FDH aus *M. vaccae* N10 konnte auch einmalig 40 mM Methylacetoacetat umgesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zudosierung ähnlich wie bei Galkin et al. (1997) durchgeführt. Die Zudosierung wurde auf den steigenden pH-Wert ausgerichtet, der nicht reguliert wurde. Die Reaktion wurde mit pH 7 gestartet und immer, wenn der pH-Wert pH 7,5 erreichte, wurden 4,5 ml einer 1 M Trimethylpyruvatlösung zugegeben (siehe Kapitel 4.1.9.3). Es wurde eine Trimethylpyruvatkonzentration von 773,4 mM erreicht und ein Endumsatz von 735 mM nach 24 h Reaktionszeit.

5.6 Die Ganzzellkatalysatoren ADH-RE/FDH-CB und ADH-RE/FDH-MV

Die Herstellung von p-Chlorphenylethanol und anderen Alkoholen wurde bereits mit gereinigten Enzymen beschrieben (Gröger et al., 2003). Für die Ketoreduktion wurde ADH-RE und für die Kofaktorregenerierung FDH-CB oder Glucosedehydrogenase verwendet. Die Reaktionen wurden in zweiphasigen Reaktionslösungen durchgeführt, die aus einer wässrigen und einer organischen Phase bestand. Als Lösungsmittel wurde n-Heptan favorisiert, da sowohl ADH-RE als auch FDH-CB über lange Zeit stabil blieben. p-Chloracetophenon und p-Chlorphenylethanol gingen in n-Heptan in Lösung und standen den Enzymen somit nur in geringen Konzentrationen zur Verfügung und führten offensichtlich so nicht zur Destabilisierung von FDH-CB, die mit organischen Substanzen schnell inaktiviert wird. In einem Reaktionsmedium von 20 % n-Heptan in Wasser konnte so 200 mM p-Chloracetophenon zu 63 % (126 mM) p-Chlorphenylethanol umgesetzt werden. Es wurde NADH als Kofaktor zugegeben, allerdings wurden keine Konzentrationen von Kofaktor und Enzymen angegeben, so dass direkte Vergleiche mit den Ergebnisse dieser Arbeit nicht gemacht werden können.

In dieser Arbeit wurden für die Herstellung von p-Chlorphenylethanol drei verschiedene Ganzzellkatalysatoren genauer analysiert, wobei Ganzzellkatalysatoren mit Malic Enzyme als kofaktorregenerierendes Enzym und mit ADH-AP(A) als Ketoreduktase hier nicht mit eingeschlossen sind. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11, *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 und *E. coli* BW3110 pAM149.1 / pNO11, wobei nur der erste Stamm fermentiert wurde und von den anderen beiden mit Biomasse aus Schüttelkulturen gearbeitet wurde. Bei den Stämmen mit pNO11 wurde festgestellt, dass die Aktivität von ADH-RE bei Koexpression mit 4 - 6 U/mg und bei Einzelexpression mit 13 - 15 U/mg weit unter der Aktivität bei Induktion von Stämmen mit pNO9 lag. Nachdem bei der Hochzell-dichtefermentation von *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 mehr als 30 % des Plasmides pNO11 verlorengegangen waren, wurde das Gen durch Ersetzen des Malic Enzymes in pHWG640.12 inseriert und der neue Vektor als pAM160.1 bezeichnet (diese Arbeit, vergleiche mit Kapitel 4.2.7). Beim Vektor pNO11 wurde vermutet, dass die zusätzlich eingefügte *cer*-Region zu nah am Replikationsursprung zu einer Destabilisierung oder geringeren Fähigkeit zur Replikation führt. Jetzt konnten bei Einzelexpression von *adhRE*(co) auf pAM160.1 spezifische Aktivitäten von 28,3 U/mg und bei Koexpression mit *fdhCB* spezifische Aktivitäten von 12 - 16 U/mg erreicht werden. Der Unterschied in der spezifischen Aktivität von ADH-RE zeigte sich auch bei den Ganzzellkatalysen. Der Stamm *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 konnte unter gleichen limitierenden Bedingungen (250 mM p-Chloracetophenon, 1,25 M Natriumformiat, 1 mM NAD⁺, 25 g/l Zellen, 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, 28 °C) 82 % des Substrates umsetzen, während *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 nur 65 % umsetzte. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass für Substratkonzentrationen bis zu 250 mM 25 g/l Biomasse ausreichend ist, da nahezu identische Ausbeuten wie mit 50 g/l Zellen erreicht wurden (siehe Kapitel 4.2.9). Die Zugabe von Kofaktor ist in jedem Fall erforderlich. Ein großer Unterschied zwischen den beiden genannten Stämmen konnte bei der Umsetzung von 500 mM und 750 mM p-Chloracetophenon gezeigt werden. Hier setzt *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM160.1 500 mM Substrat zu fast 86 % um (28 °C, 50 g/l Zellen, 5 mM NAD⁺), während *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pNO11 nur 45 % umsetzte. Bei 750 mM p-Chloracetophenon in der Reaktionslösung konnten noch 40 % bzw. 7 % umgesetzt werden. Hier zeigte sich die Verbesserung der spezifischen Aktivität durch den Wechsel des Expressionsvektors ebenfalls besonders deutlich. Mit FDH-MV als kofaktorregenerierendes Enzym bei der Herstellung von p-Chlorphenylethanol wurden nur Umsetzungen mit *E. coli* BW3110 pAM149.1 / pNO11 durchgeführt (30 °C, 100 g/l Zellen, 10 mM NAD⁺). Die Substratkonzentrationen lagen hier bei 250 mM und 500 mM, wobei hier Ausbeuten von 99,6 % bzw. 81,9 % erreicht wurden.

Bei den Umsetzungen von Ketoverbindungen zu sekundären Alkoholen in Konzentrationen > 250 mM ist eine hohe Expression der beteiligten Gene und der damit verbundenen spezifischen Aktivität sehr wichtig und konnte am Beispiel der Expression von *adhRE*(co) auf pNO11 und pAM160.1 gezeigt werden. Unterschiede zwischen den einzelnen Ganzzellkatalysatoren zeigten sich erst unter limitierenden Bedingungen wie hohe Substrat-, niedrige Kofaktor- und niedrige Biomassekonzentrationen sowie eine optimale Reaktionstemperatur. Weiterhin kann vermutet werden, dass eine Kombination von *adhRE*(co) auf pAM160.1 und *fdhMV* auf pAM149.1 aufgrund der höheren Stabilität von FDH-MV gegenüber organischen Substanzen ideal wäre. Allerdings konnten auch mit FDH-CB als kofaktorregenerierendes Enzym hohe Umsatzraten von p-Chloracetophenon erreicht werden, so dass verschiedene Substrate untersucht werden sollten, um den jeweils optimalen Ganzzellkatalysator einsetzen zu können.

5.7 Freie Zellen als Biokatalysatoren

Ganze freie Zellen als Biokatalysatoren wurden in den letzten Jahren in großer Zahl publiziert und stehen z. B. für die Herstellung von Zuckern (Wilberg et al., 1997; Kaup et al., 2004), Hydroxysäuren (Ernst et al., 2005), Alkoholen (Itoh et al., 2002) oder Aminosäuren (Galkin et al., 1997) zur Verfügung. Ein großer Vorteil von ganzen Zellen als Biokatalysator ist die Möglichkeit, diesen in großen Mengen relativ kostengünstig herzustellen, da eine Aufreinigung der beteiligten Enzyme und deren Immobilisierung entfällt. Auch müssen die Zellen als Biokatalysatoren nicht immobilisiert werden, sondern können frei in der Reaktionslösung eingesetzt und wieder von ihr abgetrennt werden. Hinsichtlich der offensichtlichen Stabilität von FDH-CB bei der Herstellung von p-Chlorphenylethanol (diese Arbeit) ist auch eine Art Schutzfunktion der Zelle für die Enzyme denkbar, da die Substrat- oder Produktkonzentrationen gering sind im Vergleich zum Reaktionsmedium. Nach der Zellernte des Biokatalysators kann dieser direkt für die Synthese eingesetzt werden (Wilberg et al., 1997; Galkin et al., 1997; Weckbecker und Hummel, 2004; Ernst et al., 2005) oder eine Lagerung bei -20 °C erfolgen (diese Arbeit). Letzteres garantiert Biomasse mit gleichen Eigenschaften über einen längeren Zeitraum und für eine Vielzahl von Untersuchungen im Labormaßstab. Bei ihrer spezifischen Anwendung müssen einige Biokatalysatoren im Gegensatz zu freien oder immobilisierten Enzymen vorbehandelt werden, um die Zellwand für die Substrate permeabel zu machen. Wilberg et al. (1997) verwenden dazu 0,2 % (w/v) Hexadecyltrimethylammoniumbromid, in dieser Arbeit wurden die Ganzzellkatalysatoren für die Herstellung von L-*tert*-Leucin mit 1,5 % (v/v) Toluol permeabilisiert, das mit in die Reaktionslösung gegeben wurde. Bei der Herstellung von p-Chlorphenylethanol konnte dagegen auf die Zugabe einer

permeabilisierenden Substanz verzichtet werden, da p-Chloracetophenon wie auch das Produkt von sich aus permeabilisierend wirken. Ein Nachteil von freien ganzen Zellen als Biokatalysatoren ist ihre Wiederverwendung, die von Boonstra et al. (2000) beschrieben wurde. Sie stellten mit ganzen *E. coli*-Zellen, die über rekombinante Morphindehydrogenase (NADP⁺-abhängig), Morphinonreduktase (NADH-abhängig) und Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase verfügten, Hydromorphon, ein semisynthetisches Opiat, aus 20 mM Morphin her. Zwischen den einzelnen Katalysen wurden die Zellen mit Zentrifugation vom Reaktionsmedium abgetrennt und gewaschen. Hier konnte gezeigt werden, dass Zellen ohne Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase, die Reaktion nur einmal vollständig durchführen können. Beim zweiten und dritten Einsatz (erster und zweiter Wiedereinsatz) konnten nur noch 6 % Morphin umgewandelt werden. Zellen, die über Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase verfügten, konnten dagegen Hydromorphon mit nur geringen Verlusten bei der Ausbeute (11 % Verlust nach der ersten Rezyklisierung und 16 % nach der zweiten) herstellen. NAD(P)⁺ wurde nicht zugegeben. Warum die Reaktion trotzdem stattfindet, obwohl nach unseren Ergebnissen ein Kofaktorverlust auftreten sollte, bleibt unklar. Bei der Herstellung von L-*tert*-Leucin mit dem Ganzzellkatalysator *E. coli* BW3110 pAM3.25 / pAM10.1 wurden ebenfalls Rezyklisierungsversuche durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass schon beim dritten Wiedereinsatz der Zellen kaum noch eine Umsetzung von Trimethylpyruvat erfolgte. NAD(H) wurde nicht zugegeben, könnte aber zu einem verbesserten Umsatz führen und einen häufigeren Wiedereinsatz ermöglichen. Die Wiederverwendbarkeit wäre dann mit der von immobilisierten Enzymen vergleichbar, die Häufigkeit eines Einsatzes müsste aber noch genauer untersucht werden. Der Verlust an Aktivität wurde der Permeabilisierung zugeschrieben, die dazu führt, dass ein erhöhter Stoffaustausch aus der Zelle und in die Zelle hinein erfolgt (Wilberg et al., 1997). Moleküle wie NAD(H) und die Substrate können somit leichter diffundieren. Die Enzyme selbst sollten zu groß sein, um aus der Zelle austreten zu können. Durch den Verlust an Kofaktor ins Medium können die wiederholt eingesetzten Zellen dann natürlich das Substrat nur noch geringer oder gar nicht mehr umsetzen. Bei der Herstellung von p-Chlorphenylethanol konnten die Zellen nach einem Einsatz nicht wiederverwendet werden, da das Zellprotein durch den Einfluss der organischen Komponenten in der Reaktionslösung denaturierte und weiße Flocken oder Klumpen bildete. Wenn noch aktives Enzym vorhanden war, dann vermutlich eingeschlossen im denaturierten Zellprotein. Für eine erneute Reaktion sollte in Abhängigkeit der Prozesskosten neue Biomasse eingesetzt werden oder auf immobilisierte Enzyme (Bommarius et al., 1994; Hummel, 1999; Gröger et al., 2003) übergegangen werden. Ein wesentlicher Nachteil von ganzen Zellen als Biokatalysatoren konnte im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden, wenn unerwünschte Nebenreaktionen ablaufen, die entweder eine kofaktorabhängige Reaktion mit dem Kofaktor für die gewünschte Reaktion katalysieren, wie vermutlich LdhA aus *E. coli* (siehe Kapitel 4.2.11), oder

das Produkt selbst weiter umwandeln. Produktionsstämme sollten aus diesem Grund genau untersucht werden, ob sie derartige Reaktionen katalysieren und bei Bedarf durch geeignete Mutanten ersetzt werden.

5.8 Charakterisierung von ADHF1

ADHF1 aus *P. fluorescens* DSM 50106 sollte eigentlich als Positivkontrolle für die Aktivität von neuen Alkoholdehydrogenasen aus *S. coelicolor* A3(2) dienen. Die Klonierung und Expression von *adhF1* wurde bereits von Hildebrandt et al. (2002) beschrieben. Eine Aufreinigung des Enzyms war nicht möglich. Daher wurde vermutet, dass das Enzym instabil ist. Nach Hildebrandt et al. (2002) und Riermeier et al. (2002) sollte ADHF1 Substrate wie Acetophenon und Cyclohexanon zu ihren korrespondierenden Alkoholen umsetzen können. Die Reduktionsreaktionen wurden bei Hildebrandt et al. mit nur 25,6 mmol/l Substratlösung durchgeführt. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* DH5 α pJOE4016.7 verwendet. Ein kofaktorregenerierendes Enzym wurde nicht eingesetzt, allerdings bestand die Reaktionslösung aus 20 % (v/v) Isopropanol in 0,1 M Tris/HCl pH 8, das von einer *E. coli*-eigenen NADH-abhängigen Dehydrogenase zu Aceton umgewandelt werden sollte. Die spezifische Aktivität (im Zellrohextrakt) für Acetophenon als Substrat wurde mit 0,0011 U/mg angegeben. In den Reduktionsreaktionen wurden 25,6 mM Acetophenon zu 95 % umgesetzt mit einem e.e.-Wert von 99 % für (*R*)- α -Phenylethanol. Die physiologische Rolle von *adhF1* wird im Abbau von zyklischen Ketonen vermutet, da das Gen auf dem bakteriellen Chromosom zwischen einer Esterase (Khalameyzer et al., 1999) und einer Bayer-Villiger-Monooxygenase liegt. ADHF1 soll dabei zyklische Alkohole in Ketone umwandeln, die von der Bayer-Villiger-Monooxygenase in zyklische Lactone umgewandelt werden. Die Esterase katalysiert anschließend die Hydrolyse der Lactone.

Für den Einsatz von ADHF1 wurden bevorzugt Alkohole als Substrate verwendet, da viele Substrate bereits in geringem Maße von *E. coli*-eigenen Enzymen reduziert werden und z. B. *E. coli* JM109 mit p-Chloracetophenon bis zu 0,15 U/mg spezifische Aktivität besitzt. Da dieser Hintergrund bei der Oxidation von Alkoholen eher selten auftritt und ADHF1 von Hildebrandt et al. (2002) die Funktion der Oxidation von Alkoholen zugeschrieben wurde, wurde ADHF1 auf Aktivität mit verschiedenen primären und sekundären Alkoholen getestet. ADHF1 besitzt zudem eine 32 %-ige Sequenzidentität mit AdhA aus *P. furiosus* (van der Oost et al., 2001), so dass auch aliphatische Substrate getestet wurden. Optimales Substrat für AdhA ist 2-Pentanol. Das pH-Optimum von ADHF1 für die Alkoholoxidation wurde mit pH 11 ermittelt. Mit p-Chlorphenylethanol (1,5 mM) und Cyclohexanol (5 mM) als zyklische Alkohole wurden spezifische Aktivitäten von 0,15 U/mg bzw. 0,2 U/mg gemessen. Aktivitäts-

tests mit den aliphatischen Alkoholen zeigten eine eindeutige Präferenz für sekundäre Alkohole sowie für C₅- bis C₈-Verbindungen. Als bestes Substrat für ADHF1 zeigte sich 2(±)-Hexanol, gefolgt von 2(±)-Octanol und 2(±)-Pentanol. Mit 2-Hexanol wurden spezifische Aktivitäten von bis zu 3 U/mg gemessen (siehe Kapitel 4.3.4). Die Bevorzugung eines Enantiomers konnte mit den Gemischen nicht festgestellt werden, allerdings beschreiben Poeschl et al. (2004), dass ADHF1 seine Selektivität in Abhängigkeit des Substrates ändert und diese nicht vorausgesagt werden kann. Aus den Aktivitätsuntersuchungen kann geschlossen werden, dass sich die physiologische Rolle von ADHF1 im Gegensatz zu der von Hildebrandt et al. (2002) postulierten Vermutung eher im Abbau aliphatischer Alkane befindet. Längerkettige Alkohole konnten mit dem verwendeten Enzymassay nicht getestet werden, da die Emulsion von wachsartigen Substanzen zu einer milchigen Lösung führt, die störend für die Extinktionsbestimmung ist.

Neben den Aktivitätstests wurden auch Induktionskinetiken in verschiedenen Expressionsstämmen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass ADHF1 in Zellen verschwindet, die sich längere Zeit in der Stationärphase befinden, unabhängig davon, ob σ^S oder Proteine, welche die Stabilität von σ^S beeinflussen, vorhanden sind. Der Nachweis erfolgte hier sowohl durch Aktivitätstest als auch über Proteingele. Im Gegensatz zu Hildebrandt et al. (2002) konnte ADHF1 als aktives Enzym über Ni-NTA- und Strep-Tactin-Säulen aufgereinigt werden. Das Enzym verlor allerdings so stark an Aktivität, dass das gereinigte Protein eine spezifische Aktivität von weniger als 5 U/mg besaß. Die einzige Möglichkeit, das Enzym über längere Zeit zu stabilisieren, konnte in 43 % Glycerin/0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8 erreicht werden. Weitere Untersuchungen könnten sich tiefergehend mit dem offensichtlichen Abbau und der Instabilität von ADHF1 beschäftigen. Die Untersuchung könnte mit Western Blot erfolgen, in dem ADHF1 mit Biotinylierungssequenz (pAM141.1) exprimiert und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert wird. Mit Avidin gekoppelt an ein Enzym wie horse raddish peroxidase könnten dann die entsprechenden Abbauprodukte als Stufen oder Schmier nachgewiesen werden. Eine Stabilisierung von ADHF1 könnte eventuell mit Mutationen erreicht werden, wobei dazu erst ein geeignetes Testsystem etabliert werden sollte, um die Mutanten unterscheiden zu können. Weiterhin sollte ADHF1 sowie auch *P. fluorescens* DSM 50106 noch mit weiteren Substraten untersucht werden, um die physiologische Funktion von *adhF1* besser verstehen zu können.

5.9 Genetisches Screening nach Alkoholdehydrogenasen

S. coelicolor A3(2) ist ein grampositiver Modellorganismus aus der großen Gruppe der Actinomyceten und verfügt über einen komplexen Lebenszyklus, bildet Substrat-

und Luftmyzel und kann unter bestimmten Bedingungen sporulieren (Bildung von Konidien zur Vermehrung). Aufgrund ihres breiten Spektrums von metabolischen Prozessen und Biotransformationen sind Streptomyceten wichtige Vertreter der Umwelt, da sie vor allem Überbleibsel anderer Organismen wie Lignocellulose oder Chitin abbauen und dadurch zum Kohlenstoffrecycling beitragen. Als Produzenten pharmazeutisch wichtiger Komponenten wie Anti-Tumor-Reagenzien, Immunsuppressoren und Antibiotika stellen sie ein großes industrielles Potential dar (Bentley et al., 2002). *S. coelicolor* A3(2) ist der genetisch am besten untersuchte Vertreter der Streptomyceten und besitzt ein lineares Chromosom mit endständigen „inverted repeats“ und einem zentral lokalisierten Replikationsursprung (*oriC*). Das Chromosom besteht aus 8,7 Millionen Basenpaaren, in denen bei einem GC-Gehalt von 72 % 7825 Gene vermutet werden (Bentley et al., 2002). Im Gegensatz dazu hat *E. coli* 4289 Gene und *B. subtilis* 4099 Gene. Durch die große Zahl an putativen Genen in *S. coelicolor* wird vermutet, dass neue Proteinfamilien entdeckt werden könnten bzw. bekannte Proteinfamilien erweitert werden können. Etwa 5 % der Gene sind potentiell am Sekundärmetabolismus beteiligt und liegen ebenfalls in Form von Genclustern vor. Trotz der enormen Anzahl von Genen konnte bisher nur eine NADH-abhängige Reduktase gefunden werden, die aus α -Ketoestern und α -Ketosäuren enantioselektiv *R*-Alkohole herstellt (Ishihara et al., 2004). Die Autoren vermuten weitere Ketoreduktasen in *S. coelicolor* A3(2), da zu bereits identifizierten Ketoesterreduktasen aus *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* (Yamaguchi et al., 2002) homologe Enzyme mit hohen Identitäten gefunden aber noch nicht untersucht wurden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Proteine aus *S. coelicolor* mit hoher Identität zu ADHF1 oder ADH-RE nicht unbedingt die gleichen Substrate reduzieren. Es konnte zu keinem der in *E. coli* produzierten *S. coelicolor*-Proteine ein geeignetes Substrat gefunden werden. Bei den Genen, die nicht oder gering exprimiert wurden, wird angenommen, dass die unterschiedliche Codon-Usage von *E. coli* und *S. coelicolor* und der hohe GC-Gehalt dafür verantwortlich ist. Aufgrund der sinkenden Preise für DNA-Synthese könnten in Zukunft zum Beispiel synthetische Gene untersucht werden, deren Codon-Usage an die des Expressionsstammes angepasst wird. Die Fähigkeit zur enantioselektiven Reduktion von Ketoverbindungen durch *S. coelicolor* könnte weiterhin mit Klonen einer Genbank untersucht werden, um gezielt nach neuen ADHs, Ketoreduktasen oder Ketoesterreduktasen suchen und darüber hinaus neue nachhaltige biokatalytische Prozesse entwickeln zu können.

6 Literaturverzeichnis

- Abaibou, H., Pommier, J., Benoit, S., Giordano, G., Mandrand-Berthelot, M.-A. (1995). Expression and characterization of the *Escherichia coli* *fdo* locus and a possible physiological role for aerobic formate dehydrogenase. *J Bacteriol* 177: 7141-7149
- Abokitse, K., Hummel, W. (2003). Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the gene encoding a (S)-specific alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297. *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 380 - 386
- Ansorge, M. B., Kula, M.-R. (2000). Investigating expression systems for the stable large-scale production of recombinant L-leucine-dehydrogenase from *Bacillus cereus* in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 668-673
- Ansorge, M. B., Kula M.-R., (2000). Production of recombinant L-leucine dehydrogenase from *Bacillus cereus* in pilot scale using the runaway replication system *E. coli* [pIET98]. *Biotechnol Bioengin* 68: 557-562
- Axley, M. J., Grahame, D. A., Stadtman T. C. (1990). *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase. *J Biol Chem* 265: 18213-18218
- Ballard, F. J., Hanson, R. W. (1967). The citrate cleavage pathway and lipogenesis in rat adipose tissue: replenishment of oxaloacetate. *Journal of Lipid Research* 8: 73-79
- Becker, G., Klauck, E., Hengge-Aronis, R. (1999). Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Microbiology* 96: 6439-6444
- Benoit, S., Abaibou, H., Mandrand-Berthelot, M.-A. (1998). Topological analysis of the aerobic membrane-bound formate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180: 6625-6634
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H. et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147
- Bibb, M. (1996). The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 142: 1335-1355

- Boller, T., Meier, C., Menzler, S. (2002). EUPERGIT Oxirane acrylic beads: How to make enzymes fit for biocatalysis. *Organic Process Research & Development* 6: 509-519
- Bommarius, A. S., Drauz, K., Hummel, W., Kula, M.-R., Wandrey, C. (1994). Some new developments in reductive amination with cofactor regeneration. *Biocatalysis* 10: 37-47
- Bommarius, A. S., Schwarm, M., Drauz, K. (1998). Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals – examples and perspectives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5: 1-11
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Bunch, P. K., Mat-Jan, F., Lee, N., Clark, D. P. (1997). The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology* 143: 187-195
- de Carvalho, C. C. C. R., de Fonseca, M. M. R. (2005). The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 715-726
- Chang, G.-G., Tong, L. (2003). Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Am Chem Soc* 42: 12721-12733
- Chenault, H. K., Simon, E. S., Whitesides, G. M. (1988). Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis. *Biotechnol Genet Eng Rev* 6: 221-270
- Chenault, H. K., Whitesides, G. M. (1987). Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl Biochem Biotechnol* 14 (2): 147-197
- Chistoserdova, L., Laukel, M., Portais, J.-C., Vorholt, J. A., Lidstrom, M. E. (2004). Multiple formate dehydrogenase enzymes in the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1 are dispensable for growth on methanol. *J Bacteriol* 186: 22-28
- Colloms, S. D., Sykora, P., Szatmari, G., Sherrat, D. J. (1990). Recombination at ColE *cer* requires the *Escherichia coli xerC* gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J Bacteriol* 172: 6973-6980
- van Dam-Mieras, M. C. E., de Jeu, W. H., de Vries, J., Currell, B. R., James, J. W., Leach, C. K., Patmore, R. A. (1997). Verlag Butterworth-Heinemann
- Doan, T., Servant, P., Tojo, S., Yamaguchi, H., Lerondel, G., Yoshida, K.-I., Fujita, Y., Aymerich, S. (2003). The *Bacillus subtilis ywkA* gene encodes a malic enzyme and its transcription is activated by the YufL/YufM two-component system in response to malate. *Microbiology* 149: 2331-2343

- Donadio, S., Sosio, M., Lancini, G. (2002). Impact of the first *Streptomyces* genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 377-380
- Eguchi, T., Kuge, Y., Inoue, K., Yoshikawa, N., Mochida, K., Uwajima, T. (1992). NADPH regeneration by glucose dehydrogenase from *Gluconobacter scleroides* for L-leuovorin synthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 701-703
- Erickson, R. C., Bennett, R. E. (1965). Penicillin acylase activity of *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol* 13: 738-742
- Ernst, M., Kaup, B., Müller, M., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (2005). Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (*R*)-specific alcohol dehydrogenase. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 629-634
- Fedorchuk, V. V., Galkin, A. G., Yasny, I. E., Kulakova, L. B., Rojkova, A. M., Filipova, A. A., Tishkov, V. I. (2002). Effect of interactions between amino acid residues 43 and 61 on thermal stability of bacterial formate dehydrogenases. *Biochemistry (Moskau)* 67: 1145-1151
- Fujisawa, H., Nagata, S., Chowdhury, E. K., Matsumoto, M., Misono, H. (2002). Cloning and sequencing of the serine dehydrogenase gene from *Agrobacterium tumefaciens*. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 1137-1139
- Fukuda, W., Sari Ismail, Y., Fukui, T., Atomi, H., Imanaka, T. (2005). Characterization of an archaeal malic enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Archae* 1: 293-301
- Galkin, A., Kulakova, L., Tishkov, V., Esaki, N., Soda, K. (1995). Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N10. *Appl Microbiol Biotechnol* 44: 479-483
- Galkin, A., Kulakova, L., Yoshimura, T., Soda, K., Esaki, N. (1997). Synthesis of optically active amino acids from α -keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes. *Appl Environ Microbiol* 63: 4651-4656
- Gourdon, P., Baucher, M.-F., Lindley, N. D., Guyonvarch, A. (2000). Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism. *Appl Environ Microbiol* 66: 2981-2987
- Gräwert, T., Kaiser, J., Zepeck, F., Laupitz, R., Hecht, S., Amslinger, S., Schramek, N., Schleicher, E., Weber, S., Haslbeck, M., Buchner, J., Rieder, C., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W., Rohdich, F. (2004). IspH protein of *Escherichia coli*: studies on iron-sulfur cluster implementation and catalysis. *J Am Chem Soc* 126: 12847-12855

Gröger, H., Hummel, W., Buchholz, S., Drauz, K., Van Nguyen, T., Rollmann, C., Hüsken, H., Abokitse, K. (2003). Practical asymmetric enzymatic reduction through discovery of a dehydrogenase-compatible biphasic reaction media. *Organic Letters* 5: 173-176

Gröger, H., Trauthwein, H., Buchholz, S., Drauz, K., Sacherer, C., Godfrin, S., Werner, H. (2004). The first aminoacylase-catalysed enantioselective synthesis of aromatic β -amino acids. *Org Biomol Chem* 2: 1977-1978

Hengge-Aronis, R. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in the control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 373-395

Herzon, S. B., Myers, A. G. (2005). Enantioselective synthesis of stephacidin B. *J Am Chem Soc* 127: 5342-5344

Hildebrandt, P., Musidlowska, A., Bornscheuer, U. T., Altenbuchner, J. (2002). Cloning, functional expression and biochemical characterization of stereoselective alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 483-487

Holland-Staley, C. A., Lee, K., Clark, D. P., Cunningham, P. R. (2000). Aerobic activity of *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase is determined by a single amino acid. *J Bacteriol* 182: 6049-6054

Hopwood, D. A. (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology* 145: 2183-2202

Hummel, W. (1999). Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *TIBTECH* 17: 487-492

Hummel, W., Kuzu, M., Geueke, B. (2003). An efficient and selective enzymatic oxidation system for the synthesis of enantiomerically pure D-*tert*-leucine. *Organic Letters* 5: 3649-3650

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology* 21: 526-531

Ingledew, W. J., Poole, R. K (1984). The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 48: 222-271

Ishihara, K., Yamaguchi, H., Omori, T., Uemura, T., Nakajima, N., Esaki, N. (2004). A novel zinc-containing α -keto ester reductase from actinomycete: An approach based on protein chemistry and bioinformatics. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 2120-2127

- Itoh, N., Matsuda, M., Mabuchi, M., Dairi, T., Wang, J. (2002). Chiral alcohol production NADH-dependent phenylacetaldehydoreductase coupled with *in situ* regeneration of NADH. *Eur J Biochem* 269: 2394-2402
- Jendrossek, D., Steinbüchel, A., Schlegel, H. G. (1988). Alcohol dehydrogenase gene from *Alcaligenes eutrophus*: Subcloning, heterologous expression in *Escherichia coli*, sequencing, and location of Tn5 insertions. *J Bacteriol* 170: 5248-5256
- Jiang, G. R., Nikolova, S., Clark, D. P. (2001). Regulation of the *ldhA* gene, encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology* 147: 2437-2446
- Kataoka, M., Kita, K., Wada, M., Yasohara, Y., Hasegawa, J., Shimizu, S. (2003). Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 437-445
- Kaup, B., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (2004). Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 333-339
- Khalameyzer, V., Fischer, I., Bornscheuer, U. T., Altenbuchner, J. (1999). Screening, nucleotide sequence, and biochemical characterization of a esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones. *Appl Environ Microbiol* 65: 477-482
- Kobayashi, K., Doi, S., Negoro, S., Urabe, I., Okade, H. (1989). Structure and properties of malic enzyme from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* 264: 3200-3205
- Kondo, K., Beppu, T., Horinouchi, S. (2003). Cloning, sequencing and characterization of the gene encoding the smallest subunit of the three-component membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter pasteurianus*. *J Bacteriol* 177: 5048-5055
- Kondo, T., Kondo, E., Maki, H., Yasumoto, K., Takagi, K., Kano, K., Ikeda, T. (2004). Purification and characterization of aromatic amine dehydrogenase from *Alcaligenes xylosoxidans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1921-1928
- Korotkova, N., Lidstrom, M. E. (2001). Connection between poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and growth on C₁ and C₂ compounds in the methylotroph *Methylbacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol* 183: 1038-1046
- Kragl, U., Vasic-Racki, D., Wandrey, C. (1996). Continuous production of L-tert-leucine in series of two enzyme membrane reactors – modelling and computer simulation. *Bioprocess Engineering* 14: 291-297

- Krix, G., Bommarius, A. S., Drauz, K., Kottenhahn, M., Schwarm, M., Kula, M.-R. (1997). Enzymatic reduction of α -keto acids leading to L-amino acids, D- or L-hydroxy acids. *J Biotechnol* 53: 29-39
- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., Faber, K. (2004). Biocatalytic oxidation of primary and secondary alcohols. *Adv Synth Catal* 346: 125-142
- Labrou, N. E., Rigden, D. J. (2001). Active-site characterization of *Candida boidinii* formate dehydrogenase. *Biochem J* 354: 455-463
- Lapujade, P., Cocaigh-Bousquet, M., Loubiere, P. (1998). Glutamate biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118. *Appl Environ Microbiol* 64: 2485-2489
- Laukel, M., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E., Vorholt, J. A. (2003). The tungsten-containing formate dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1: Purification and properties. *Eur J Biochem* 270: 325-333
- Levy, H. R., Loewus, F. A., Vennesland, B. (1956). The enzymatic transfer of hydrogen V – The reaction catalysed by glucose dehydrogenase. *J Biol Chem* 222: 685-693
- Levy, H. R., Vennesland, B. (1957). The stereospecificity of enzymatic hydrogen transfer from diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* 228: 85-96
- Lobit, P., Genard, M., Wu, B. H., Soing, P., Habib, R. (2003). Modelling citrate metabolism in fruits: responses to growth and temperature. *Journal of Experimental Botany* 54: 2489-2501
- Mahajan, S. K., Chu, C. C., Willis, D. K., Templin, A., Clark, A. J. (1990). Physical analysis of spontaneous mutagen-induced mutant of *Escherichia coli* K-12 expressing DNA exonuclease VIII activity. *Genetics* 125: 261-273
- Makdessi, K., Andreesen, J. R., Pich, A. (2001). Tungstate uptake by a highly specific ABC transporter in *Eubacterium acidaminophilum*. *J Biol Chem* 276: 24557-24564
- Mandler, L. N. (1998). *Stereoselektive Synthese*. Wiley-VCH Verlag GmbH, ISBN 3-527-29566-6
- Matsushita, K., Yakushi, T., Takaki Y., Toyama, H., Adachi, O. (1995). Generation mechanism and purification of an inactive form convertible in vivo to the active form of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter suboxydans*. *J Bacteriol* 177: 6552-6559
- May, H. D., Patel, P. S., Ferry, J. G. (1988). Effect of molybdenum and tungsten on synthesis and composition of formate dehydrogenase in *Methanobacterium formicum*. *J Bacteriol* 170: 3384-3389

- Membrillo-Hernandez, J., Echave, P., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, R., Lin, E. C. C. (2000). Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. *J Biol Chem* 275: 33869-33875
- J. Membrillo-Hernandez, E. C. C. Lin (1999). Regulation of expression of the *adhE* gene, encoding ethanol oxidoreductase in *Escherichia coli*: Transcription from a downstream promoter and regulation by Fnr and RpoS. *J Bacteriol* 181: 7571-7579
- Milne, J. A., Cook, R. A. (1979). Role of metal cofactors in Enzyme regulation. Differences in the regulatory properties of the *Escherichia coli* nicotinamide adenine dinucleotide specific malic enzyme depending on whether Mg^{2+} or Mn^{2+} serves as divalent cation. *Biochemistry* 18:3604-3610
- Mitsubishi, K., Yamamoto, H., Kimoto, N. (2004). Mutants of *Mycobacterium vaccae*-derived formate dehydrogenase and uses thereof. US-Patent: US 6.830.907 B2
- Muffler, A., Barth, M., Marschall, C., Hengge-Aronis, R. (1997). Heat shock regulation of σ^S turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by σ^S and σ^{32} in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 445-452
- Naamnik, S., Hummel, W., Gröger, H. (2004). Verwendung von Malat-Dehydrogenase zur NADH-Regenerierung. Deutsches Patent: DE 102 40 603 A1
- Netzer, R., Krause, M., Rittmann, D., Peters-Wendisch, P.-G., Eggeling, L., Wendisch, V. F., Sahm, H. (2004). Roles of pyruvate kinase and malic enzyme of *Corynebacterium glutamicum* for growth on carbon sources requiring gluconeogenesis. *Arch Microbiol* 182: 354-363
- Nidetzky, B., Neuhauser, W., Haltrich, D., Kulbe, K. D. (1996). Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor. *Biotechnol Bioeng* 52: 387-396
- Noyori, R., Ohkuma, T. (1999). Rapid, productive and stereoselective hydrogenation of ketones. *Pure Appl Chem* 71: 1493-1501
- Patel, R. N., Hou, C. T., Laskin, A. I., Derelanko, P., Felix, A. (1979). Oxidation of secondary alcohols to methyl ketons by yeasts. *Appl Environ Microbiol* 38: 219-223
- Poessl, T. M., Kosjek, B., Ellmer, U., Gruber, C. C., Edegger, K., Faber, K., Hildebrandt, P., Bornscheuer, U. T., Kroutil, W. (2005). Stereo-complementary non-racemic halohydrins via biocatalytic hydrogen transfer-reduction of halo-ketones and one-pot cascade-reaction to enantiopure epoxide. in press.
- Pruteanu, M., Hengge-Aronis, R. (2002). The cellular level of the recognition factor RssB is rate-limiting for σ^S proteolysis: implications for RssB regulation and signal transduction in σ^S turnover in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 45: 1701-1713

- Riermeier, T., Bornscheuer, U., Altenbuchner, J., Hildebrandt, P. (2002). Alkoholdehydrogenase und deren Verwendung. Deutsches Patent: DE 101 12 401 A1
- van der Rest, M. E., Frank, C., Molenaar, D. (2000). Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Escherichia coli*. J of Bacteriol 182: 6892-6899
- Schauer, N. L., Ferry, J. G. (1986). Composition of the coenzyme F420-dependent formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum*. J Bacteriol 165: 405-411
- Schmid, R. D. (2002). Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley-VCH Verlag GmbH
- Schmitz, R. P. H., Diekert, G. (2003). Purification and properties of the formate dehydrogenase and characterization of the *fdhA* gene of *Sulfurospirillum multivorans*. Arch Microbiol 180: 394-401
- Schneider, J. J., Lewbart, M. L. (1956). Enzymatic synthesis of steroid sulfates. J Biol Chem 222: 787-794
- Schulze, R., Lorenz, P., Eck, J., May, O., Gröger, H., Trauthwein, H. (2006). Neue Alkoholdehydrogenasen. Deutsches Patent: DE 10 2005 008 908 A1
- Shibasaki, M., Kanai, M. (2001). Multifunctional asymmetric catalysis. Chem Pharm Bull 49: 511-524
- Shinoda, T., Satoh, T., Mineki, S., Iida, M., Taguchi, H. (2002). Cloning, nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the gene for formate dehydrogenase of *Paracoccus* sp. 12-A, a formate-assimilating bacterium. Biosci Biotechnol Biochem 66: 271-276
- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M.-R., Pohl, M. (2000). Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. Eur J Biochem 267: 1280-1289
- Sola, A., Maaheimo, H., Ylönen, K., Ferrer, P., Szyperski, T. (2004). Amino acid biosynthesis and metabolic flux profiling of *Pichia pastoris*. Eur J Biochem 271: 2462-2470
- Stoyan, T., Recktenwald, A., Kula, M. R. (1997). Cloning, sequencing and overexpression of the leucine dehydrogenase gene from *Bacillus cereus*. J Biotechnol 54: 77-80
- Strecker, H., Korkes, S. (1952). Glucose dehydrogenase. J Biol Chem 196: 769-784
- Stumpp, T., Wilms, B., Altenbuchner, J. (2000). Ein neues L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. Biospektrum 6: 33-36

- Sundquist, K. E., Hiltunen, J. K., Hassinen, I. E. (1989). Biochem J 257: 913-916
- Suzuki, K., Itai, R., Suzuki, K., Nakanishi, H., Nishizawa, N.-K., Yoshimura, E., Mori, S. (1998). Formate dehydrogenase, an enzyme of anaerobic metabolism, is induced by iron deficiency in barley roots. Plant Physiology 116: 725-732
- Toyama, H., Fuji, T., Aoki, N., Matsushita, K., Adachi, O. (2003). Molecular cloning of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase, ADH IIB, from *Pseudomonas putida* HK5. Biosci Biotechnol Biochem 67: 1397-1400
- Tsigos, I., Velonia, K., Smonou, I., Bouriotis, V. (1998). Purification and characterization of an alcohol dehydrogenase from the Antarctic psychrophile *Moraxella* sp. TAE123. Eur J Biochem 254: 356-362
- Wang, H., Gunsalus, R. P. (2003). Coordinate regulation of the *Escherichia coli* formate dehydrogenase *fdnGHI* and *fdhF* genes in response to nitrate, nitrite, and formate: Roles for NarL and NarP. J Bacteriol 185: 5076-5085
- Weckbecker, A., Hummel, W. (2004). Improved synthesis of chiral alcohols with *Escherichia coli* cells co-expressing pyridine nucleotide transhydrogenase, NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenase and NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. Biotechnological Letters 26: 1739-1744
- Wilberg, K. Q., Alves, T. L. M., Nobrega, R. (1997). Enzymatic catalysis by permeabilized cells. Braz J Chem Eng. 14
- Willke, T., Vorlop, K.-D. (2004). Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. Appl Microbiol Biotechnol 66: 131-142
- Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syltatk, C., Mattes, R., Siemann, M., Altenbuchner, J. (2001). High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli rhaBAD* promoter. Biotechnol Bioengin 73:95-103
- Willner, I., Mandler, D. (1989). Enzyme-catalysed biotransformations through photochemical regeneration of nicotinamide cofactors. Enzyme and Microbial Technology 11: 467-483
- Wong, C.-H., Drueckhammer, D. G. (1985). Enzymatic synthesis of chiral hydroxy compounds using immobilized glucose dehydrogenase from *Bacillus cereus* for NAD(P)H regeneration. Nature Biotechnology 3: 649-651
- Wu, G., Culley, D. E., Zhang, W. (2005). Predicted highly expressed genes in the genomes of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* and the implications for their metabolism. Microbiology 151: 2175-2187
- Wynn, J. P., bin Abdul Hamid, A., Ratledge, C. (1999). The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. Microbiology 145: 1911-1917

Yamaguchi, H., Nakajima, N. Ishihara, K. (2002). Purification and characterization of two α -keto ester reductases from *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* IFO 14271. Biosci Biotechnol Biochem 66: 588-597

Yokoyama, S., Yokoyama, R., Kinlaw, C. S., Harry, D. E. (1990). Molecular evolution of the zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenase genes. Mol Biol Evol 7: 143-154

Zarnt, G., Schröder, T., Andreesen, J. R. (2001). Catalytic and molecular properties of the quinohemoprotein tetrahydrofurfuryl alcohol dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* strain Bo. J Bacteriol 183: 1954-1960

Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge.Aronis, R., Storz, G. (1998). The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein. The EMBO Journal 17: 6061-6068

Email-Kontakt beim Kooperationspartner des BMBF-Projektes Degussa *projecthouse biocatalysis*:

harald.groeger@degussa.com

7 Anhang

Anhang 1: Nicht selbständig hergestellte Plasmide.



Anhang 2: Nicht selbständig hergestellte Plasmide.



Anhang 3: in dieser Arbeit verwendete Gene, die in Genbanken hinterlegt sind.

Gen	accession number	Gen	accession number
<i>sfcA</i>	AAC74552	sco7147	NP_631206
sco0365	NP_624688	sco7362	NP_631415
sco0522	NP_624836	<i>ldh</i>	NP_833877
sco1611	NP_625887	<i>adhRE(wt)</i>	AAN73270
sco2490	NP_626732	<i>adhF1</i>	AAL79772
sco4304	NP_628476		

Anhang 4: Identität von potentiellen ADHs aus *S. coelicolor*, deren Gene in dieser Arbeit kloniert werden konnten, mit ADH-RE und ADHF1.

Gen aus <i>S. coelicolor</i>	Protein	Identität mit ADH-RE	Identität mit ADHF1
sco0365	SCF41.24	27 %	-
sco0522	SCF11.02	34 %	-
sco1611	SCI35.33c	28 %	-
sco2490	SC7A8.29	36,5 %	-
sco4304	SCD95A.37	27 %	-
sco7147	SC9A4.09	26 %	-
sco7362	SC9H11.16c	-	63,5 %

Anhang 5: Sequenzen von in dieser Arbeit verwendeten Gene, die Mutationen im Vergleich zum Wildtypgen tragen und nicht in Genbanken hinterlegt sind. Die accession number des Wildtypgens ist, wenn vorhanden, mit angegeben.

> *fdhCB*:

```

1  atgaagattg tcttagttct ttatgatgct ggtaagcacg ctgctgatga agaaaaatta
61  tatggttcta ctgaaaataa attaggtatt gctaattggt taaaagatca aggtcatgaa
121 ctaattacta cttctgataa agaaggtgaa acaagtgaat tggataaaca tatcccagat
181 gctgatatta tcatcaccac tcctttccat cctgcttata tcactaagga aagacttgac
241 aaggctaaga acttaaaatt agtcgttgtc gctgggtgtg gttctgatca cattgattta
301 gattatatta atcaaacagg taagaaaatc tcagtcctgg aagttacagg ttctaattgtt
361 gtctctgttg ctgaacacgt tgtcatgacc atgcttgtct tggttagaaa tttcgttcca
421 gcacatgaac aaattattaa ccacgattgg gaggttgctg ctatcgctaa ggatgcttac
481 gatatcgaag gtaaaaactat cgctaccatt ggtgctggta gaattgggta cagagtcttg
541 gaaagattac tcccatttaa tccaaaagaa ttattatact acgattatca agctttacca
601 aaagaagctg aagaaaaagt tgggtgctaga agagttgaaa atattgaaga attagttgct
661 caagctgata tcgttacagt taatgctcca ttacacgcag gtacaaaagg ttaattaat
721 aaggaattat tatctaaatt taaaaaagggt gcttggttag tcaataccgc aagaggtgct
781 attgctgttg ctgaagatgt tgcagcagct ttagaatctg gtcaattaag aggttacggt
841 ggtgatgttt ggttcccaca accagctcca aaggatcacc catggagaga tatgagaaat
901 aaatatggtg ctggtaatgc catgactcct cactactctg gtactacttt agacgctcaa
961 acaagatacg ctgaaggtac taaaaatatt ttggaatcat tctttaccgg taaatttgat
1021 tacagaccac aagatattat cttattaaat ggtgaatagc ttactaaagc ttacggtaaa
1081 cacgataaga aataa

```

accession number *fdhCB* (Wildtyp): AAC49766

> *fdhMV*:

```

1  atggcgaaag tgctggcggg tctgtatgat gatccgggtg atggctatcc gaaaacctat
61  gcccgatgatg atctgccgaa aatcgaatcat tatccggggcg gtcagattct gccgaccccg
121 aaagcgattg attttaccac gggtcagctg ctgggtagcg ttagcgggtga actgggtctg
181 cgtgaatatac tggaaagcaa cggccatacc ctgggttgta ccagcgataa agatggccccg
241 gatagcgttt ttgaacgtga actggtggat gccgatgtgg ttattagcca gccgttttgg
301 ccggcgatc tgaccccgga acgtattgcc aaagcgaaaa acctgaaact ggcgctgacc
361 gccggtattg gtagcgatca tgtggatctg cagagcgcca ttgatcgtaa tgttaccggtg
421 gcggaagtga cctatagcaa cagcattagc gtggcggaac atgtgggtgat gatgattctg
481 agcctgggtc gtaattatct gccgagccat gaatggggcc gtaaaggcgg ttggaatatac
541 gccgactgtg tgagccatgc ctatgatctg gaagcgatgc atgttggcac cgttgccgcc
601 ggtcgtattg gtctggcggg gctgcgtcgt ctggcgccgt ttgatgttca tctgcactat
661 accgatcgtc atcgtctgcc ggaaagcgtg gaaaaagaac tgaacctgac ctggcatgcc
721 acccgatgaag atatgtatcc ggtgtgtgat gtgggtgacc tgaatgttcc gctgcacccg
781 gaaaccgaac acatgatcaa cgatgaaacc ctgaaactgt taaacgtgg cgcctatatt

```

841 gttaataaccg cccgtggcaa actgtgtgat cgtgatgccg ttgcccgtgc cctggaaagc
 901 ggtcgtctgg cgggttatgc cggatgatgtt tggtttccgc agccggcgcc gaaagatcat
 961 ccgtggcgta ccatgccgta taatggcatg accccgcata ttagcggcac caccctgacc
 1021 gcccaggccc gttatgccgc cggtagcgtg gaaattctgg aatgcttctt tgaaggccgt
 1081 ccgatccgtg atgaataacct gattgttcaa ggtggtgctg tggcgggcac cggcgcacat
 1141 agctatagca aaggtaaatgc caccggcgtg agcgaagaag cggcgaat caaaaaagcg
 1201 gtgtaa

accession number *fdhMV* (Wildtyp): BAB69476

> *fdh1A*:

1 atgagcaacg ggcccgaacc gcatggcaac aaaattgaac agccggaaat tcgtgccgat
 61 gaacgtcagg atgcgggtgg tccggcgaat ggtgcgccga gcaccagcgg tggatgcgat
 121 agccaggggtg cgaaaagcgg tggccaggcg gcgccggacc cgagcggtag ctatggcatt
 181 aaagatgctg cggttgcgcc ggcgaccatt gcgtttgaat ttgatggcca gcaggtttaa
 241 gcgcagcccg gtgaaacat ttgggcggtt gcgaaacgctc tgggcacca tattccgat
 301 ctgtgccata aaccggaccg gggctatcgc cggatggta attgtcgcgc ctgcatggtg
 361 gaaattgaag gcgaacgcgt tctggcggcg agctgtaaac gtaccccggc gattggcatg
 421 aaagttaaaa gcgcgaccga acgcgcgacc aaagcgcgtg cgatggttct ggaactgctg
 481 gttgcggatc agccggaacg cgcaaccagc catgatccga gcagccattt ttgggttcag
 541 gcggatggtc tggatgttac cgaaagccgt tttccggcgg cggaacggtg gaccagcgt
 601 gttagccatc cggcgatgag cgttaatctg gatgcgtgca ttcaatgcaa tctgtgtgtt
 661 cgtgcgtgtc gtgaagtgca ggtgaacgat gttattggca tggcgtatcg tgcggccggt
 721 agcaaagtgg tgtttgattt cgatgatccg atgggtggta gcacctgtgt tgcgtgtggt
 781 gaatgtgttc aggcgtgtcc gaccggtgct ctgatgccgg cggcctatct ggatgcgaat
 841 cagaccgta ccgtttaccg ggatcgtgaa gtgaaaagcc tgtgccgta ttgcggcggt
 901 ggttgtcagg tgagctacaa agtgaaagat gaacgcacgc tttatgcgga aggtgttaac
 961 ggtccggcga accagaatcg tctgtgctg aaaggccggt ttggctttga ttatgtgat
 1021 catccgcatc gtctgaccgt tccgctgatt cgtctgaaa acgtgccgaa agatgcgaac
 1081 gatcaggctg atccggcgaa tccgtggacc cttttcgcg aagcgacctg ggaagaagcg
 1141 ctggatcgcg cggcaggcgg tctgaaagcg attcgtgata ccaacggtcg taaagcgtg
 1201 gcgggttttg gtagcgcgaa aggcagcaac gaagaagcgt acctgtttca gaaactggtg
 1261 cgtctgggtt ttggcaccaa caacgtggat cattgcacc gtctgtgtca tgcgagcagc
 1321 gttgcggcgc tgatggaagg tctgaatagc ggtgcgggta ccgcccgtt tagcgcggcg
 1381 ctggatgcgg aagtgattgt tgttattggc gcgaaccgca ccgttaatca tccggttgcg
 1441 gcgacctttc tgaaaaacgc ggtgaaacag cgtggtgcca aactgattat tatggaccg
 1501 cgtcgtcaga ccctgagccg tcatgcgtat cgtcatctgg cgtttcgtcc gggtagcgt
 1561 gttgcgatgc tgaacgcgat gctgaatgtg atcgtgaccg aaggcctgta tgatgaacg
 1621 tatatcgcgg gctacaccga aaattttgaa gcgctgcgcg aaaaaatcgt tgatttcacc
 1681 ccggaaaaaa tggcgcgctg ttgcggtatt gatgcgaaa ccctgcgcga agttgcgcgt
 1741 ctgtatgctg gcgcgaaaag cagcctgatt ttttgggta tggcgtgag ccagcatggt
 1801 catggcaccg ataatagccg ttgtctgatt gcgctggcgc tgattaccg tcagattggt

Anhang

1861 cgtccgggca ccggtctgca tccgctgctg ggtcagaata atgttcaggg tgcgagcgat
1921 gccggtctga ttccgatggt gtaccgggat tatcagagcg ttgaaaaaga tgcggtgctgc
1981 gaactgtttg aagaattttg gggccagagc ctggaccggc agaaaggtct gaccgtggtt
2041 gaaattatgc gtgcgattca tgcgggcaaa attcgtggca tgttcgtgga aggtgaaaat
2101 ccggccatga gcgaccggga tctgaatcat gcgctcatg cgctggcgat gctggatcat
2161 ctggtggttc aggacctggt tctgaccgaa accgcgtttc atgaggatgt tgttctgccc
2221 gccagcgcgt ttgccgaaaa agccggcacc tttaccaata ccgatcgtcg tgttcagatt
2281 gcgagccgg ttgttgccgc gccgggtgat gcgctcagg attggtggat tatccaggaa
2341 ctggcgcgct gtctggatct ggattggaat tatggcggct cggcggatat ttttgcggaa
2401 atggcgcagg ttatgccgag cctgaataac attacctggg aacgtctgga acgcgaaggg
2461 gccgttacct atccggtcga tgcgccggac caaccgggca acgaaatcat tttttacgcg
2521 ggcttcccga ccgaaagcgg tctgcaaaa attgttccgg cggcgattgt tccgcgggat
2581 gaagtgccgg atgatgaatt tccgatggtt ctgagcaccg gtcgtgttct ggaacattgg
2641 cataccggta gcatgaccg tctgctgggt gtgctggatg cgctggaacc ggaagcggtt
2701 gcgtttatgg cgccgaaaga actgtatcgt ctgggtctgc gtccgggtgg tagcatgcgt
2761 ctggaaacc gtgcggcgc cgttgttctg aaagtgcgta gcgatcgcga tgttccgatc
2821 ggcatgatct ttatgccgtt ctgctatgca gaagcggcgg cgaatctgct gaccaatccg
2881 gcgctggacc cgctgggtaa aatcccggaa ttcaaatttt gcgcgccgcg tgttctgccc
2941 gcggaagcgg ccccgatggc ggccgaataa

accession number *fdh1A* (Wildtyp): AAN03799

> *fdh1B*:

1 atgagcgaag cgagcggcac cgtccggagc tttgctcatc cgggtcgtgg tctaatggt
61 gcgctgctgg ttccgaaagg tctcaggtt gatccgcctg cgaaagtgga aatcgaagaa
121 ctgctgggca cccgtccgca tctcaggtt ctgctgatcg aacatctgca tctgatccag
181 gataacctat gtcagattag cgcggatcat ctggcggcgc tggcggatga aatgagcctg
241 gcgtttgctg aagtttttga aaccgcgacc ttttatgctc atttctgatg ggtgaaagaa
301 ggcaagcgg atattccgca tctgaccatt cgtgtgtgca atagcattac ctgcgcgatg
361 tttggtgctg atgaactgct ggaaccctg cagcgcgaac tggcagcga tgcggttctg
421 gttgttctg cgccgtgtgt tggctctgtg gatcatgctc cggcgggtga agtgggtcat
481 aactttctgc atcgtgcgga tctggcagc gttcgcgcgg cgggtggaagc ggaagatacc
541 catgctcata ttccgaccta cgtggattat gatgcgtatc gcgcggtgg tggttatgca
601 accctggaac gtctgcgtag cggcgaactg ccggttgatg atgtgctgaa agtgcctgat
661 gatggcggct tgcgctgctt ggggtggtgc ggttttccga cgggtcgtaa atggcgtgca
721 gtgctggtg aaccgggtcc gcgtctgatg gcggttaatg gcgatgaagg tgaaccgggc
781 acctttaaag atcagctgta cctgaacacc gatccgcctc gttttctgga aggcctgctg
841 attggcgcgc atgttgttga agcggcggat gtgtatatct atctgcgcga tgaatatccg
901 attagccgca aaattctggc gcgtgaaatt gcgaaactgc cggaaaggtg caccctgatt
961 catctgctgc gtggtgctgg tgcgtatatt tgcggtgaa aaagcagcct gatcgaagc
1021 ctggaaggta aacgcggtct gccgcgtcat aaaccgctt ttccgtttca ggtgggctg
1081 tttaatctgc cgacctgat caacaacatc gaaaccctgt tttgggtgca cgatctgat

1141 gaacgtggtg cggaatggtg gaaaagccat ggtcgtaatg gtcgcgttgg tctgcgtagc
1201 tacagcgтта gcggccgtgt taaagaaccg ggtgttaaac tggcaccggc gggcctgacc
1261 attcaggaac tgatcgacga atattgcggc ggcattagcg atggtcatag ctttgcggcg
1321 tatctgccgg gtggcgcgag cggtggtatt ctgccggcga gcatgaatga tatcccgtg
1381 gattttggca ccctggaaaa atatggctgc tttattggta gcgcgcggtg tgttattctg
1441 agcgatcagg atgatgttcg cggcgcagcg ctgaacctga tgaaattttt cgaagatgaa
1501 agctgcggtc aatgtacccc gtgtcgtagc ggcaccaga aagcgcgtat gctgatggaa
1561 aacggcgттt gggataccga tctgctgggc gaactggcgc agtgtatgcg tgatgcgagc
1621 atttgtggtc tgggtcaggc ggcgagcaat ccggttagca ccgtgatcaa atacttcccg
1681 gacctgttcc cggaaccgcg cgcagttgcg gcggaataa

accession number *fdh1B* (Wildtyp): AAN03798

Anhang 6: Alignment der Sequenzen von Wildtyp- und codonoptimierter (co) DNA von *fdh1A* und *fdh1B*. Die Sequenz des jeweils produzierten Proteins bleibt erhalten und wird daher nicht explizit aufgeführt.

> *fdh1A*:

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

fdh1A      ATGAGCAACGGCCCCGAACCGCACGGCAACAAGATCGAACAGCCCGAGATCCGCGCCGAC 60
fdh1A_co_  ATGAGCAACGGCCCCGAACCGCATGGCAACAAAATTGAACAGCCGAAATTCGTGCCGAT 60
*****
fdh1A      GAACGTCAGGATGCCGGCGGGCCGGCAAATGGCGCACCATCGACCTCCGGCGGGCCTAC 120
fdh1A_co_  GAACGTCAGGATGCCGGTGGTCCGGCGAATGGTGCGCCGAGCACCAGCGGTGGTGCAT 120
*****
fdh1A      TCGCAGGGCGCCAAGTCGGGTGGCCAGGCCGCGCCGGATCCGTCCGGCTCCTACGGCATC 180
fdh1A_co_  AGCCAGGGTGCAAAAGCGGTGGCCAGGCCGCGCCGGACCCGAGCGGTAGCTATGGCATT 180
*****
fdh1A      AAGGACGCCCGGTTCGCGCCCGGACCATCGCCTTCGAGTTCGACGGCCAACAGGTTCGAG 240
fdh1A_co_  AAAGATGCGCCGGTTGCGCCGGCGACCATTCGCTTTGAATTTGATGGCCAGCAGGTTGAA 240
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fdh1A      GCCCAGCCCGGCGAGACGATCTGGGCGGTTCGCCAAGCGCCTTGCCACGCATATCCCGCAT 300
fdh1A_co_  GCGCAGCCGGGTGAAACCATTTGGGCGGTTGCGAAACGTCTGGGCACCCATATTCCCGCAT 300
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fdh1A      CTCTGCCACAAGCCCGATCCCGGCTACCGCCCGGACGGCAATTGCCGCGCTGCATGGTC 360
fdh1A_co_  CTGTGCCATAAACCGGACCCGGGCTATCGCCCGGATGGTAATTGTCGCGCTGCATGGTG 360
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fdh1A      GAGATCGAGGGCGAGCGGTGCTCGCCGCTCGTGCAAGCGCACGCCCGCCATCGGCATG 420
fdh1A_co_  GAAATTGAAGGCGAACCGGTTCTGGCGGCGAGCTGTAAACGTACCCCGGCGATTGGCATG 420
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fdh1A      AAGGTGAAGTCGGCCACCGAGCGGCCACCAAGGCCCGCGCCATGGTGCTCGAACTGCTC 480
fdh1A_co_  AAAGTTAAAAGCGCGACCGAACCGCGACCAAGCGCGTGCGATGGTTCTGGAAGTCTGCTG 480
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fdh1A      GTGGCCGATCAGCCCGAGCGCGGACCTCGCATGACCCGTGTCGCATTTCTGGGTGCAG 540
fdh1A_co_  GTTGGCGATCAGCCGGAACCGCGCAACCAGCCATGATCCGAGCAGCCATTTTGGGTTCAG 540
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fdh1A      GCCGACGTCCTCGATGTGACCGAGAGCCGCTTCCCGGCGGCGGAGCGCTGGACCAGCGAC 600
fdh1A_co_  GCGGATGTTCTGGATGTTACCGAAAGCCGTTTCCGCGGCGGAAACGTTGGACCAGCGAT 600
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fdh1A      GTCAGCCACCCGGCGATGAGCGTCAATCTCGACGCCTGCATCCAGTGCAATCTCTGTGTC 660
fdh1A_co_  GTTAGCCATCCGGCGATGAGCGTCAATCTGGATGCGTGCATTCAATGCAATCTGTGTGTT 660
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fdh1A      CGCGCTGCCGCGAGGTTTCAGGTCAACGACGTGATCGGCATGGCCTACCGCGCCGCGGGC 720
fdh1A_co_  CGTGCGTGTGCGTGAAGTGCAGGTGAACGATGTTATTGGCATGGCGTATCGTGCGGCGGTT 720
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```


Anhang

fdh1A	TCCAAGGTCGTGTTTACTTCGACGATCCGATGGGTGGCTCCACCTGCGTGGCCTGCGGC	780
fdh1A_co_	AGCAAAGTGGTGTGTTGATTTTCGATGATCCGATGGGTGGTAGCACCTGTGTTGCGTGTGGT	780
	*** ** ***** ** ** ***** ** ** ** **	
fdh1A	GAGTGGCTCCAAGCCTGCCCGACCGGGGCGCTGATGCCGGCCGCTATCTCGACGCAAAC	840
fdh1A_co_	GAATGTGTTTCAGGCGTGTCCGACCGGTGCGCTGATGCCGGCCGCTATCTGGATGCGAAT	840
	** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** ** **	
fdh1A	CAGACCCGGACGGTCTATCCCGACCGGAGGTGAAGTCGCTCTGCCCTATTGCGGCGTC	900
fdh1A_co_	CAGACCCGTACCGTTTACCCGGATCGTGAAGTGAAAAGCCTGTGCCGTATTGCGGCGTT	900
	***** ** ** ** ** ***** ** *****	
fdh1A	GGCTGCCAAGTCTCCTACAAGGTCAAGGACGAGCGCATCGTCTACGCCGAGGGCGTGAAC	960
fdh1A_co_	GGTTGTCAGGTGAGCTACAAAGTGAAAGATGAACGCATCGTTTATGCGGAAGGTGTTAAC	960
	** ** ** ** ***** ** ** ** ***** ** ** **	
fdh1A	GGACCGGCCAACCAGAACCGGCTCTGCGTGAAGGGCCGCTTCGGCTTCGACTACGTCCAC	1020
fdh1A_co_	GGTCCGGCGAACCAGAATCGTCTGTGCGTGAAGGCCGTTTTGGCTTTGATTATGTGCAT	1020
	** ***** ***** ** ** ***** ** ***** ** ** **	
fdh1A	CACCCACCGCCTGACGGTGCCGCTGATCCGCTTGAGAACGTGCCAAGGACGCCAAC	1080
fdh1A_co_	CATCCGCATCGTCTGACCGTTCGCTGATTCGTCTGAAAACGTGCCGAAAGATGCGAAC	1080
	** ** ** ** ***** ** ***** ** ***** ** ** **	
fdh1A	GATCAGGTCGATCCGGCGAACCCTGGACGCATTTCCGCGAGGCGACCTGGGAAGAGGCG	1140
fdh1A_co_	GATCAGGTCGATCCGGCGAATCCGTGGACCCATTTCCGGAAGCGACCTGGGAAGAAGCG	1140
	***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** **	
fdh1A	CTCGACCGCGCGGGCGGCCTGAAGCGATCCGTGACACCAACGGGCGCAAGGCGCTG	1200
fdh1A_co_	CTGGATCGCGCGGACGGCGGTCTGAAAGCGATTCCGTGATAACCAACGGTCGTAAGCGCTG	1200
	** ** ***** ***** ***** ***** ***** ** ** *****	
fdh1A	GCGGGCTTCGGCTCGGCCAAGGGTTCGAACGAGGAGGCTACCTCTTCCAGAAGCTCGTC	1260
fdh1A_co_	GCGGGTTTTGGTAGCGCAAAGGCAGCAACGAAGAAGCGTACCTGTTTCAGAACTGGTG	1260
	***** ** ** ** ** ** ***** ** ***** ** ***** ** **	
fdh1A	CGCCTCGGCTTCGGCACCAACAACGTGATCAGTGCACGCGCCTGTGCCACGCTCGTCG	1320
fdh1A_co_	CGTCTGGGTTTTGGCACCAACAACGTGGATCATTCACCCGTCTGTGTCATGCGAGCAGC	1320
	** ** ** ** ***** ***** ***** ** ***** ** **	
fdh1A	GTGGCGGCGCTGATGGAGGGCCTGAATTCCGGCGCCGTCACCGCTCCCTTCTCGGCAGCG	1380
fdh1A_co_	GTTGCGGCGCTGATGGAAGGTCTGAATAGCGGTGCGGTTACCGCCCGTTTAGCGCGGCG	1380
	** ***** ***** ** ***** ** ** ***** ** ** **	
fdh1A	CTCGACCCGAGGTCATCGTCTCATCGGCGCCAACCCGACCGTGAACCATCCGGTCGCG	1440
fdh1A_co_	CTGGATGCGGAAGTGATTGTTGTTATTTGGCGCAACCCGACCGTTAATCATCCGGTTGCG	1440
	** ** ** ** ** ** ***** ***** ***** ** ***** **	
fdh1A	GCGACCTTCTCAAGAACGCGGTGAAGCAGCGCGGCCAAGCTGATCATCATGGACCCG	1500
fdh1A_co_	GCGACCTTCTGAAAACGCGGTGAAGCAGCGTGGTGGGAACTGATTATTATGGACCCG	1500
	***** ** ** ***** ***** ** ** ***** ** *****	
fdh1A	CGGCGCCAGACGCTCTCGGCCACGCTATCGGCACCTCGCCTTCCGCCCCGGCTCGGAC	1560
fdh1A_co_	CGTCTCAGACCCGTAGCCGTATCGTCATCTGGCGTTTCGTCGGGTAGCGAT	1560
	** ** ***** ** ***** ***** ** ** ***** ** **	

Anhang

fdh1A GTGGCGATGCTCAACGCGATGCTCAACGTGATCGTCACGGAGGGCCTCTACGACGAGCAG 1620
fdh1A_co_ GTTGGCGATGCTGAACGCGATGCTGAATGTGATCGTGACCGAAGGCCTGTATGATGAACAG 1620
** ***** ** ***** ** * * * * * ** * * * * *

fdh1A TACATCGCCGGCTACACCGAGAACTTCGAGGCTCTGCGCGAGAAGATCGTCGACTTCACG 1680
fdh1A_co_ TATATCGCGGGCTACACCGAAAATTTGAAGCGCTGCGCGAAAAAATCGTTGATTTCACC 1680
** ***** ** * * * * * ** ***** ** * * * * *

fdh1A CCGGAGAAGATGGCCTCGGTCTGCGGCATCGACGCCGAGACCCTGCGCGAGGTGCGCCGG 1740
fdh1A_co_ CCGGAAAAAATGGCGAGCGTTTTCGGTATTGATGCGGAAACCCTGCGCGAAGTTGCGCGT 1740
***** ** ***** ** ***** ** * * * * * ***** ** * * * *

fdh1A CTCTACGCCCGGGCCAAGTCGTCGCTCATCTTCTGGGGCATGGGCGTCAGCCAGCACGTG 1800
fdh1A_co_ CTGTATGCGCGCGCGAAAAGCAGCCTGATTTTTTGGGGTATGGGCGTGAGCCAGCATGTT 1800
** * * * * * * * * * * ** * * * * * ***** ***** **

fdh1A CACGGCACCGACAACCTCGCGCTGCCTGATCGCGCTCGCCCTCATCACCGCCAGATCGGC 1860
fdh1A_co_ CATGGCACCGATAATAGCCGTTGTCTGATTGCGCTGGCGCTGATTACCGGTTCAGATTGGT 1860
** ***** ** * * * * * ***** ** * * * * * ***** **

fdh1A CGGCCCGGCACCGCCTGCACCCGTTGCGCGGCCAGAACAACGTCCAGGGCGCGTCCGAT 1920
fdh1A_co_ CGTCCGGGCACCGGTCTGCATCCGCTGCGTGGTCAGAAATAATGTTTCAGGGTGCAGCGAT 1920
** * * * * * ***** ***** ** * * * * * ***** ** * * * * *

fdh1A GCCGGCCTGATCCCGATGGTCTACCCGACTATCAGTCGGTCGAGAAGGACGCGGTGCGT 1980
fdh1A_co_ GCCGTCTGATTCCGATGGTGTACCCGATTATCAGAGCGTTGAAAAGATGCGGTGCGC 1980
***** ***** ***** ***** ***** ** * * * * * *****

fdh1A GAGCTGTTTCGAGGAGTTCTGGGGCAGTCCCTCGATCCTCAGAAGGGCCTCACCGTGGTC 2040
fdh1A_co_ GAACTGTTTGAAGAATTTGGGGCCAGAGCCTGGACCCGAGAAAGGTCTGACCGTGGTT 2040
** ***** ** * * * * * ***** ** * * * * * ***** ** * * * * *

fdh1A GAGATCATGCGCGGATCCACGCGGGCGAGATCCGGGGCATGTTTCGTCGAGGGCGAGAAC 2100
fdh1A_co_ GAAATTATGCGTGCATTCATGCGGGCGAAAATTCGTGGCATGTTTCGTGGAAGGTGAAAAT 2100
** * * * * * ***** ** ***** ** * * * * * ***** ** * * * * *

fdh1A CCGGCGATGTCGACCCCGACCTCAACCATGCCCGCCACGCGCTGGCGATGCTCGACCAT 2160
fdh1A_co_ CCGGCCATGAGCGACCCGGATCTGAATCATGCGCGTCATGCGCTGGCGATGCTGGATCAT 2160
***** ** * * * * * ***** ** * * * * * ***** ***** ** * * *

fdh1A CTCGTGGTGCAGGACCTGTTCTGACGGAGACGGCCTTCCACGCCGACGTGGTGTGCCG 2220
fdh1A_co_ CTGGTGGTTCAGGACCTGTTTCTGACCGAAAACCGCCTTTCATGCGGATGTTGTTCTGCCG 2220
** ***** ***** ***** ** * * * * * ** * * * * * ** * * * * *

fdh1A GCCTCGGCCTTTGCCGAGAAAGCCGGACCTTACCAACACCGACCGCGCGTGCAGATC 2280
fdh1A_co_ GCCAGCGCCTTTGCCGAAAAAGCCGGCACCTTACCAATACCGATCGTCGTGTTTCAGATT 2280
*** * * * * ***** ***** ***** ***** ***** ** * * * * *

fdh1A GCCAGCCCGTTCGTCGCCCTCCGGGCGATGCGCGCCAGGATTGGTGGATCATCCAGGAA 2340
fdh1A_co_ GCGCAGCCGTTGTTGCGCCCGGGTGTGCGCGTCAGGATTGGTGGATTATCCAGGAA 2340
** ***** ** * * * * * ***** ***** ***** ***** *****

fdh1A CTGGCCGACGCTCGACCTCGACTGGAACCTACGGCGGCCCGCCGACATCTTCGCCGAG 2400
fdh1A_co_ CTGGCGCTCGTCTGGATCTGGATTGGAATTATGGCGTCCGGCGGATATTTTTCGGAA 2400
***** ** * * * * * ** * * * * * ***** ***** ***** ***** ** * * * * *

Anhang

```
fdh1A      ATGGCGCAGGTGATGCCGTCCTTGAACAACATCACCTGGGAGCGGCTGGAGCGCGAGGGG 2460
fdh1A_co_  ATGGCGCAGGTTATGCCGAGCCTGAATAACATTACCTGGGAACGCTCGGAACCGGAAGGC 2460
***** * **** * ***** ** ***** **
fdh1A      GCGGTGACCTATCCGGTCGATGCCCCGGACCAGCCCGGCAACGAGATCATCTTCTATGCC 2520
fdh1A_co_  GCCGTTACCTATCCGGTCGATGCGCCGGACCAACCGGCAACGAAATCATTTTTTACGCG 2520
** * ***** ** ***** ** ***** ** * * **
fdh1A      GGCTTCCCGACCGAGAGCGGTCGCGCCAAGATCGTGCCCGGGCGATCGTGCCCGCCGGAC 2580
fdh1A_co_  GGCTTCCCGACCGAAAGCGGTCGTGCGAAAATTGTTCCGGCGGGCGATTGTTCCGCCGGAT 2580
***** ** * * * * * ***** ** *****
fdh1A      GAGGTGCCGGACGACGAGTTCCCGATGGTGCTCTCGACCGGCCGCGTGCTCGAACACTGG 2640
fdh1A_co_  GAAGTGCCGGATGATGAATTTCCGATGGTTCTGAGCACCGGTCGTGTTCTGGAACATTGG 2640
** ***** ** * * ***** ** ***** ** * * * * *
fdh1A      CACACGGGCTCGATGACCCGGCGCGGGCGTGCTCGACGCGTGGAGCCGGAGGCGGTG 2700
fdh1A_co_  CATAACCGGTAGCATGACCCGTCGTGCGGGTGTGCTGGATGCGCTGGAACCGGAAGCGGTT 2700
** * * * ***** ** ***** ** ***** ** *****
fdh1A      GCCTTCATGGCACCCAAGGAGCTCTACCGGCTCGGTCTCCGGCCCGGGGTCGATGCGG 2760
fdh1A_co_  GCGTTTATGGCGCCGAAAGAAGTGTATCGTCTGGGTCTGCGTCCGGGTGGTAGCATGCGT 2760
** * * ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fdh1A      TTGAAACACGGCGGGCGCCGTCGTGTTGAAGGTGCGCTCCGACCGGACGTGCCGATC 2820
fdh1A_co_  CTGAAACCCGTCGCGGGCGCGTGTCTGAAAGTGCCTAGCGATCGCGATGTTCCGATC 2820
***** ** ***** ** ***** ***** ** * * * * *
fdh1A      GGCATGATCTTCATGCCCTTCTGCTACGCGGAAGCCGCCCAACCTTCTGACCAACCCC 2880
fdh1A_co_  GGCATGATCTTTATGCCGTTCTGCTATGCGGAAGCGGCGGCAATCTGCTGACCAATCCG 2880
***** ***** ***** ***** ** * * * * * ***** **
fdh1A      GCCCTGACCCCTCGGAAAGATTCCCGAGTTCAAATTTGCGCAGCCCGGTCGTCCCC 2940
fdh1A_co_  GCGCTGACCCGTCGGGTAATCCCGAATTCAAATTTGCGCGGCGGTCGTTGTGCCG 2940
** * * ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fdh1A      GCGGAGGCTGCGCCGATGGCCCGGAGTAA 2970
fdh1A_co_  GCGGAAGCGGCCCGATGGCGCCGAATAA 2970
***** ** * * ***** ***** **
```

> *fdh1B*:

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```
fdh1B      ATGAGTGAGGCAAGTGGGACTGTCCGGAGCTTCGCGCATCCGGGCGTGGCCGTAACGTC 60
fdh1B_co_  ATGAGCGAAGCGAGCGGCACCGTCCGGAGCTTTGCGCATCCGGGTCGTGGTCGTAATGTT 60
***** ** * * * * * ***** ***** ***** *****
fdh1B      GCCCGCGCCGTGCCGAAGGGGCGTCAGGTGATCCCCACGCCAAGGTGAGATCGAGGAG 120
fdh1B_co_  GCGCGTGCAGTTCCGAAAGGTCGTGAGTTGATCCGCATGCGAAAGTGAAATCGAAGAA 120
** * * * * ***** ** ***** ***** ** * * * * * ***** **
fdh1B      CTGCTCGGCACCCGCCCGCCAGCGGACCTGCTGATCGAGCACCTGCACCTGATCCAA 180
fdh1B_co_  CTGCTGGGCACCCGTCGCGTCAGCGTGATCTGCTGATCGAACATCTGCATCTGATCCAG 180
***** ***** ***** ***** ** ***** ***** *****
```

Anhang

fdh1B GACACCTACGGCCAGATCAGCGCCGATCATCTCGCGGCGCTGGCCGACGAGATGAGCCTC 240
fdh1B_co_ GATACCTATGGTCAGATTAGCGCGGATCATCTGGCGGCGCTGGCGGATGAAATGAGCCTG 240
** ***** ** ***** ***** ***** ***** ** ** *****

fdh1B GCCTTCGCCGAGGTGTTTCGAGACCGCGACCTTCTACGCGCATTTTCGATGTGGTGAAGGAG 300
fdh1B_co_ GCGTTTGCGGAAGTTTTTGAACCGCGACCTTTTATGCGCATTTTCGATGTGGTGAAGAA 300
** *

fdh1B GGCGAGGCCGACATCCCGCGCTGACGATCCGGGTTTGCAGACAGCATCACCTGCGCCATG 360
fdh1B_co_ GGCGAAGCGGATATCCCGCTGACCATTCGTGTGTGCGATAGCATTACCTGCGCGATG 360
***** ** *

fdh1B TTCGGCGCCGACGAGCTGCTGGAGACGCTGCAGCGGAGCTGGCCTCGGATGCGGTCCGC 420
fdh1B_co_ TTTGGTGCGGATGAACTGCTGGAACCCCTGCAGCGGAACTGGCGAGCGATGCGGTTCGT 420
** *

fdh1B GTCGTGCGCGGCCCTGTGTGCGCCTGTGCGACCACGCCCCGGCGGTCGAGGTCGGGCAC 480
fdh1B_co_ GTTGTTCGTGCGCCGTGTGTGGTCTGTGTGATCATGCGCCGGCGGTTGAAGTGGGTCAT 480
** *

fdh1B AACTTCCTGCACCGGGCCGACCTCGCCTCCGTGCGCGCCGCGGTTCGAGGCCGAGGACACC 540
fdh1B_co_ AACTTTCATCGATCGTGCAGATCTGGCGAGCGTTCGCGCGCGGTTGAAGCGGAAGATACC 540
***** ***** ** *

fdh1B CACGCCACATCCCCACTTACGTGATTACGACGCCTACCGGGCCGGCGGGCTACGCG 600
fdh1B_co_ CATGCGCATATCCGACTACGTGGATTATGATGCGTATCGCGGGGTGGTGGTTATGCG 600
** *

fdh1B ACCCTGGAGCGGCTGCGCAGCGGCGAACTGCCGGTCGATGACGTGCTGAAGGTGCTCGAC 660
fdh1B_co_ ACCCTGGAACGTCTGCGTAGCGGCGAACTGCCGGTTGATGATGTGCTGAAAGTGTGGAT 660
***** ** *

fdh1B GACGGCGGCTGCGCGGCTCGGCGGCGCGGCTTTCCACCGGCCGCAAGTGGCGCTCC 720
fdh1B_co_ GATGGCGGTCTGCGCGGTCTGGGTGGTGGGTTTTCCGACCGGTGCTAAATGGCGTAGC 720
** ***** ***** ** *

fdh1B GTGCGCGGCGAGCCCCGACCCCGGCTGATGGCGGTCAACGGCGACGAGGGCGAGCCCCGGC 780
fdh1B_co_ GTGCGTGGTGAACCGGTTCCGCTCTGATGGCGGTTAATGGCGATGAAGGTGAACCGGGC 780
***** ** *

fdh1B ACCTTCAAGGATCAGCTCTACCTCAACACCGATCCGCACCGCTTTCTGGAAGGCATGCTG 840
fdh1B_co_ ACCTTTAAAGATCAGCTGTACCTGAACACCGATCCGCATCGTTTTCTGGAAGGCATGCTG 840
***** ** *

fdh1B ATCGGCGCCACGTCTGTCGAGGCCCGGACGTCTACATCTACCTGCGCGACGAGTACCCG 900
fdh1B_co_ ATTGGCGCGCATGTTGTTGAAGCGGCGGATGTGTATATCTATCTGCGCGATGAATATCCG 900
** ***** ** *

fdh1B ATCTCCCGGAGATCCTGGCCCGGAGATCGCGAAGCTCCCCGAGGGCGGCACCCGCATC 960
fdh1B_co_ ATTAGCCGCGAAATTTGCGCGGTGAAATTCGAAACTGCCGGAAGGTGGCACCCGTATT 960
** ***** ** *

fdh1B CACCTGCGCGGTGGGGCCGGCGCCTATATCTGCGGCGAGGAATCCTCGCTGATCGAGTCG 1020
fdh1B_co_ CATCTGCGTCTGGTGGGTTGCGTATATTTGCGGTGAAGAAAGCAGCCTGATCGAAAGC 1020
** ***** ***** ** *

Anhang

fdh1B CTGGAGGGCAAGCGCGGCTGCCGCGGCACAAGCCGCCCTTCCCCTTCCAGGTGGCCTG 1080
fdh1B_co_ CTGGAAGGTAAACCGCGTCTGCCGCGTCATAAACCCGCGTTTCCGTTTCAGGTGGGCCTG 1080
***** ** ** ***** ***** ** ** ***** ** ** ** ***** *****

fdh1B TTCAACCGGCCGACGCTGATCAACAACATCGAGACGCTGTTCTGGGTGCGCGACCTGATC 1140
fdh1B_co_ TTTAATCGTCCGACCCTGATCAACAACATCGAAACCCTGTTTGGGTGCGCGATCTGATT 1140
** ** ** ***** ***** ** ***** ***** *****

fdh1B GAGCGCGGCGCCGAATGGTGAAGAGCCACGGGCGCAACGGCCGCGTCCGGCTGCGCTCG 1200
fdh1B_co_ GAACGTGGTGCAGGAATGGTGAAGAAAGCCATGGTCGTAATGGTGCCTGGTCTGCGTAGC 1200
** ** ** ** ***** ***** ** ** ** ** ***** ** *****

fdh1B TACTCGGTTTTCGGGCCGGGTCAAGGAGCCGGGCGTCAAGCTCGCGCCCGCCGGCCTGACC 1260
fdh1B_co_ TACAGCGTTAGCGGCCGTGTTAAAGAACCAGGCGTAAACTGGCACCAGCGGGCCTGACC 1260
*** ** ***** ** ** ** ***** ** ** ** ** *****

fdh1B ATCCAGGAACATCATCGACGAGTATTGCGGCGGCATCTCTGACGGCCACAGCTTCGCGGCC 1320
fdh1B_co_ ATTCAGGAACATGATCGACGAATATTGCGGCGGCATTCAGCGATGGTCATAGCTTTCGCGCG 1320
** ***** ***** ***** ** ** ** ***** *****

fdh1B TACCTGCCGGGCGGAGCCTCGGGCGGCATCCTGCCGCGCTCGATGAACGACATCCCGCTC 1380
fdh1B_co_ TATCTGCCGGGTGGCGCGAGCGGTGTTCTGCCGCGGAGCATGAATGATATCCCGCTG 1380
** ***** ** ** ** ** ***** ***** *****

fdh1B GATTTCGGCACGCTGAAAAATACGGCTGCTTCATCGGCTCGGCCGCGGTCTGTGATCCTG 1440
fdh1B_co_ GATTTTGGCACCCGAAAAATATGGCTGCTTTATGGTAGCGCGCGGTTGTTATTCTG 1440
***** ***** ***** ***** ** ** ** ***** ** ** **

fdh1B TCCGATCAGGACGATGTGCGCGGTGCCGCGTTGAACCTGATGAAGTTCTTCGAGGACGAG 1500
fdh1B_co_ AGCGATCAGGATGATGTTGCGGCGCAGCGCTGAACCTGATGAAATTTTTCGAAGATGAA 1500
***** ***** ***** ** ** ***** ***** ** *****

fdh1B TCCTGCGGGCAGTGCACGCCCTGCCGCTCGGGCAGCAGAAGGCCCGCATGCTGATGGAG 1560
fdh1B_co_ AGCTGCGGTCAATGTACCCCGTGTCTAGCGGCACCCAGAAAGCGCGTATGCTGATGGAA 1560
***** ** ** ** ***** ***** ***** ***** *****

fdh1B AACGGCGTGTGGGACACCGATCTCCTCGGCGAGCTGGCGCAATGCATGCGCGACGCCTCG 1620
fdh1B_co_ AACGGCGTTTGGGATACCGATCTGCTGGGCGAACTGGCGCAGTGTATGCGTATGCGGAGC 1620
***** ***** ***** ** ***** ***** ***** *****

fdh1B ATCTGCGGTCTCGGTGAGGCGGCCTCGAACCCCGTCAGCACCGTGATCAAGTACTTCCCT 1680
fdh1B_co_ ATTTGTGGTCTGGGTGAGGCGGCGAGCAATCCGGTTAGCACCGTGATCAAATACTTCCCG 1680
** ** ***** ***** ** ** ***** ***** *****

fdh1B GATCTCTTCCCGGAGCCGCGGGCCGTGGCGGCCGAGTGA 1719
fdh1B_co_ GACCTGTTCCCGGAACCGCGCGCAGTTGCGGCGGAATAA 1719
** ** ***** ***** ** ** ***** ** * *

Anhang 7: Alignment der Genprodukte von Wildtyp und mutierter FDH-CB und FDH-MV. Unterschiede sind gekennzeichnet.

> FDH-CB:

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

FDH-CB      MKIVLVLYDAGKHAADDEEKLYGSTENKLGIANWLKDQGHELITTSKKEGETSELDKHIPD 60
FDH-CB_WT_  MKIVLVLYDAGKHAADDEEKLYGCTENKLGIANWLKDQGHELITTSKKEGETSELDKHIPD 60
*****

FDH-CB      ADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVAVGSDHIDLIDYINQTKKISVLEVTGSNV 120
FDH-CB_WT_  ADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVAVGSDHIDLIDYINQTKKISVLEVTGSNV 120
*****

FDH-CB      VSVAEHVVMTMLVLRNFVPAHEQIINHDEVAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL 180
FDH-CB_WT_  VSVAEHVVMTMLVLRNFVPAHEQIINHDEVAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL 180
*****

FDH-CB      ERLLPFPNKELLYDYQALPKEAEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN 240
FDH-CB_WT_  ERLLPFPNKELLYDYQALPKEAEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN 240
*****

FDH-CB      KELLSKFKKGAWLVNTARGAIAVAEDVAAALESGQLRGYGGDVWFPQPAPKDHPWRDMRN 300
FDH-CB_WT_  KELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDVWFPQPAPKDHPWRDMRN 300
*****

FDH-CB      KYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGK 360
FDH-CB_WT_  KYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGK 360
*****

FDH-CB      HDKK 364
FDH-CB_WT_  HDKK 364
****

```

> FDH-MV:

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

FDH-MV      MAKVLAVLYDDPVDGYPKTYARDDLKIDHYPGGQILPTPKAIDFTPGQLLGSVSGELGL 60
FDH-MV_WT_  MAKVLCVLYDDPVDGYPKTYARDDLKIDHYPGGQILPTPKAIDFTPGQLLGSVSGELGL 60
*****

FDH-MV      REYLESNGHTLVVTSKDKGPDSVFERELVDADVVISQPFWPAYLTPERIAKAKNLKAL 120
FDH-MV_WT_  REYLESNGHTLVVTSKDKGPDSVFERELVDADVVISQPFWPAYLTPERIAKAKNLKAL 120
*****

```

Anhang

FDH-MV AGIGSDHVDLQSAIDRNVTVAEVTYSNSISVAEHVMMILSLVRNYLPSHEWARKGGWNI 180
FDH-MV_WT_ AGIGSDHVDLQSAIDRNVTVAEVTYCNSISVAEHVMMILSLVRNYLPSHEWARKGGWNI 180

FDH-MV ADCVSHAYDLEAMHVGTVAAAGRIGLAVLRRRLAPFDVHLHYTDRHRLPESVEKELNLTWHA 240
FDH-MV_WT_ ADCVSHAYDLEAMHVGTVAAAGRIGLAVLRRRLAPFDVHLHYTDRHRLPESVEKELNLTWHA 240

FDH-MV TREDMPVCDVVTLNVPLHPETEHEMINDETLKLFKRGAYIVNTARGKLCRDAVARALES 300
FDH-MV_WT_ TREDMPVCDVVTLNCPHHPETEHEMINDETLKLFKRGAYIVNTARGKLCRDAVARALES 300

FDH-MV GRLAGYAGDVWFPQPAPKDHPWRTMPYNGMTPHISGTTTLTAQARYAAGTREILECFEGR 360
FDH-MV_WT_ GRLAGYAGDVWFPQPAPKDHPWRTMPYNGMTPHISGTTTLTAQARYAAGTREILECFEGR 360

FDH-MV PIRDEYLIVQGGALAGTGAHSYSKGNATGGSEEAAKFKKAV 401
FDH-MV_WT_ PIRDEYLIVQGGALAGTGAHSYSKGNATGGSEEAAKFKKAV 401

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Familienname: Menzel
Vorname: Anne
Geburtsdatum: 12.12.1978
Geburtsort: Radebeul
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

September 1985 - Juli 1992: 1. Polytechnische Oberschule Dresden, Dresden

August 1992 - Juli 1997: Gymnasium Dreikönigschule Dresden, Dresden
Abschluss: Abitur

Oktober 1997 - September 2002: Technische Universität Dresden, Dresden
Studium im Hauptdiplom an der Fakultät Maschinenwesen, Studienrichtung Bioverfahrenstechnik
Abschluss: Diplomingenieur

September 2000 - Februar 2001: Creatogen AG, Augsburg
Projektarbeit: „Einsatz von konditionalen Vektoren zur Erzeugung definierter Deletionen von chromosomalen Genen zur Herstellung von Impfstoffträgerstämmen“

Oktober 2001 - Januar 2002: Technische Universität Dresden, Dresden
Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik (ILB)
Studienarbeit: „Untersuchungen zum Zellaufschluss von *Escherichia coli* mit *Bdellovibrio bacteriovorus*.“

April 2002 - September 2002: NMI Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut der Universität Tübingen, Reutlingen
Diplomarbeit: „Etablierung eines funktionellen Zellchips mittels Zelltod- und Apoptose-Assays auf Microarrays aus ECM-Molekülen“

seit Oktober 2002: Universität Stuttgart, Stuttgart – Vaihingen
Institut für Industrielle Genetik
Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter mit dem Ziel der Promotion