

**Entwicklung eines enzymatischen und synthetischen
Produktionsverfahrens für 1,3-Propandiol aus Glycerol**

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

von

Fabian Rieckenberg

aus

Hannover

2014

Betreuer: Prof. Dr. An-Ping Zeng

Gutachter: Prof. Dr. An-Ping Zeng
PD Dr. Monika Johannsen

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2014

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist in den Jahren 2009 – 2014 im Rahmen meiner Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik der Technischen Universität Hamburg-Harburg entstanden. Daher gilt mein erster Dank dem gesamten Team des Instituts. Vor allem meinem langjährigen Doktorvater und Betreuer, Herrn Prof. Dr. An-Ping Zeng, welcher mich im Rahmen des Forschungsprojektes immer wieder forderte und förderte, möchte ich auf diesem Wege danken. Unsere Zusammenarbeit habe ich stets als von gegenseitigem Respekt und Vertrauen geprägt empfunden.

Des Weiteren danke ich den Kollegen, die mit mir gemeinsam unmittelbar an dem Forschungsprojekt gearbeitet haben: Frau Dr. Rosarin Rujananon und Frau Dr. Sugima Rappert, die mich in den molekularbiologischen Arbeiten unterstützt haben. Frau Dr. Inés Ardao, mit welcher ich insbesondere theoretische Ansätze bzgl. des synthetischen Produktionsprozesses ergebnisorientiert diskutieren konnte. Herrn Ralf Grajetzki, ohne dessen Unterstützung die großtechnischen Fermentationen im 300L-Maßstab inklusive DSP nicht so erfolgreich verlaufen wären. Frau Dr. Katharina Götz danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit bzgl. der Produktion und Aufreinigung der verwendeten Wasserstoffhydrogenase. Auch danke ich meinen Praktikanten Malihe, Marc und Igor, welche mich jeweils ein Semester durch ihre engagierte Mithilfe entlasteten.

Für die Unterstützung meiner Familie und meiner Freunde während dieser Zeit bin ich dankbar. Vor allem meiner Freundin Lena-Marie danke ich für ihr Verständnis und die Rücksichtnahme während meiner Jahre als Doktorand. Diese Zeit wird stets ein ganz besonderes Kapitel in meinem Leben bleiben.

„Fest zupacken, nie loslassen!“

Luftlandebrigade 31, Fallschirmjägerbataillon 313

Abstract

In the present work the feasibility of engineering an enzymatic *in vitro* production process for 1,3-propanediol (1,3-PDO) from glycerol was demonstrated. In this novel bioprocess, a very high production yield of about 0.95 mol 1,3-PDO/mol glycerol was reached.

Currently, 1,3-PDO production processes from glycerol or glucose established in industry and technology are based on fermentation processes exclusively. In the case of glycerol fermentation, the maximum theoretical yield of 1,3-PDO is 0.72 mol/mol, the yield reached in most studies being about 0.60 mol/mol. The reason for the only partial transformation of glycerol to the target product 1,3-PDO can be found in the parallel consumption of glycerol to undesired side products. About a half of the provided glycerol is used for the generation of energy and reducing power and for cell growth through oxidative metabolism, while the remaining part of the glycerol is transformed reductively to the final product 1,3-PDO. Due to increasing prices of glycerol, driven by higher glycerol demands and shortage of natural resources in the near future, the engineering of high efficient 1,3-PDO production systems is highly desired.

An exclusively enzymatic *in vitro* production system is able to overcome the disadvantage of fermentation like glycerol consumption for energy generation and cell growth. Such an enzymatic *in vitro* production process could convert glycerol completely to 1,3-PDO and reach the theoretical maximum of 1 mol PDO/mol glycerol. The objective of this thesis therefore has been the establishment of a synthetic ensemble of natural enzymes to convert glycerol to 1,3-PDO with a yield of nearly 100%.

In order to realize this goal the enzymes glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*, propanediol oxydoreductase-isoenzyme from *Escherichia coli*, and hydrogenase I from *Pyrococcus furiosus* have been produced and partly purified. Through the combination of propanediol oxydoreductase-isoenzyme and hydrogenase a nearly total conversion of the intermediate 3-hydroxypropionaldehyde into 1,3-PDO (0.97 mol/mol) could be realized via hydrogen up-take. Here, the hydrogenase generates NADPH from NADP and hydrogen continuously, which is used for the NADPH-dependent reduction reaction of 3-hydroxypropionaldehyde into 1,3-PDO.

One of the challenges for an efficient *in vitro* synthesis of 1,3-PDO has been the process integrated reactivation of glycerol dehydratase due to its mechanism-based suicide effect by the substrate. This suicide effect, as widely described in literature before, results in an inactivation of the glycerol dehydratase by the substrate glycerol after a few minutes of

reaction with glycerol. In the present work reactivation methods integrated in the process through a continuous feeding of coenzyme B12, ATP, and magnesium could be realized. The activity of glycerol dehydratase could be sustained from a few minutes to several hours. With this system, the production process for 1,3-PDO from glycerol with a high yield has been significantly improved. However, the product concentration (<1g 1,3-PDO/L) reached under the experimental conditions was still quite low. The bottleneck of the process regarding costs and productivity is considered to be mainly related to the inactivation of glycerol dehydratase. Through site directed mutagenesis and other molecular biological approaches a glycerol dehydratase with a reduced mechanism based suicide effect may be constructed. In the future, such a novel glycerol dehydratase may strongly increase the productivity of the production process. Furthermore, the high costs for coenzyme B12 and ATP feeding should be overcome. The developed enzymatic process is currently not yet competitive but such a process could become more important in the future considering the increasing importance of more efficient substrate utilization.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die grundsätzliche Realisierbarkeit eines enzymatischen *in vitro* Produktionsprozesses für 1,3-Propandiol (1,3-PDO) aus Glycerol demonstriert. Dabei konnte eine sehr hohe Ausbeute von ca. 0,95 mol 1,3-PDO/mol Glycerol erzielt werden.

In Industrie und Technik etablierte 1,3-Propandiolproduktionsverfahren aus Glukose und Glycerol belaufen sich derzeit ausschließlich auf mikrobielle Fermentationsprozesse. Diese weisen den Nachteil auf, dass das theoretisch mögliche Maximum bei 0,72 mol/mol liegt, wobei normalerweise Produktausbeuten von ca. 0,60 mol/mol erreicht werden können. Der Grund für diese nur anteilige Transformation von Glycerol zum Zielprodukt 1,3-PDO ist in der parallelen Verstoffwechslung des Glycerols zu unerwünschten Nebenprodukten zu finden. Während etwa die Hälfte des zur Verfügung gestellten Glycerols durch oxidative Stoffumwandlung zur Energiegewinnung und zum Wachstum des Organismus verwendet wird, entfällt der verbleibende Anteil des Glycerols auf die reduktive Stoffumwandlung mit dem Endprodukt 1,3-PDO. Vor allem weil der Glycerolpreis aufgrund der steigenden Nachfrage sowie aufgrund allgemeiner Rohstoffverknappung in naher Zukunft steigen wird, ist die Entwicklung von effizienteren Umwandlungsverfahren von Glycerol zu 1,3-PDO mit höheren Ausbeuten von großem Interesse.

Mittels eines rein enzymatischen *in vitro* Produktionsverfahrens können die in der Fermentation notwendigen Nebenbedingungen, wie Glycerolkonsum für Energiegewinnung und Zellwachstum, umgangen werden. Ein solcher enzymatischer *in vitro* Produktionsprozess könnte Glycerol vollständig zu 1,3-PDO umwandeln und somit das theoretisch mögliche Transformationsmaximum von 1 mol/mol (100%) erreichen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erstellung und Etablierung eines synthetischen Ensembles von natürlichen Enzymen, mittels dessen eine Glyceroltransformation zu 1,3-PDO mit annähernd 100% Ausbeute möglich ist.

Zu diesem Zweck wurden die Enzyme Glyceroldehydratase aus *Lactobacillus reuteri* sowie Propandioloxidoreduktase-Isoenzym aus *Escherichia coli* und Wasserstoffhydrogenase I aus *Pyrococcus furiosus* produziert und zum Teil aufgereinigt. Durch die Kombination des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym mit der Wasserstoffhydrogenase konnte zunächst eine nahezu vollständige Transformation des Intermediats 3-Hydroxipropionaldehyd zu 1,3-PDO unter Wasserstoffaufnahme realisiert werden (0,97 mol/mol). Dabei synthetisierte die Wasserstoffhydrogenase kontinuierlich aus NADP und gelöstem Wasserstoff NADPH,

welches der NADPH-abhängigen Reduktion von 3-Hydroxipropionaldehyd zu 1,3-PDO durch das Propandioloxidoreduktase-Isoenzym zur Verfügung gestellt wurde.

Eine Herausforderung wies die prozessintegrierte Reaktivierung der Glyceroldehydratase auf, welche Glycerol zum genannten Intermediat 3-Hydroxipropionaldehyd transformiert. Durch den in Literatur ausführlich beschriebenen mechanismusbasierten Suizideffekt erfolgt eine Inaktivierung der Glyceroldehydratase nach wenigen Minuten Reaktion mit Glycerol (Substratinhibierung). In der vorliegenden Arbeit konnten entsprechende prozessintegrierte Reaktivierungsmethoden unter kontinuierlicher Zugabe von Coenzym B12, ATP und Magnesium erstmalig realisiert werden. Dabei konnte die Lebensdauer der Glyceroldehydrataseaktivität von wenigen Minuten auf mehrere Stunden expandiert werden. Mittels dieses Systems konnte der 1,3-Propandiolproduktionsprozess signifikant verbessert werden. Insgesamt konnten durch dieses neuentwickelte Produktionsverfahren allerdings Konzentrationen von <1g/L Glycerol transformiert werden. Die hohe Ausbeuteeffizienz steht somit verglichen mit fermentativen Verfahren der geringen volumetrischen Produktivität gegenüber. Der klar identifizierte produktivitäts- und kostenbestimmende Faktor stellt in dem *in vitro* System die Glyceroldehydratase dar. Durch gerichtete Mutationen und weitere molekularbiologische Ansätze könnte in Zukunft eine Glyceroldehydratase mit vermindertem, mechanismusbasiertem Suizideffekt konstruiert werden, welche die Produktivität des hier entwickelten Produktionsprozesses um ein Vielfaches steigern würde. Auch würde eine enorme Kostenreduktion des Gesamtprozesses durch die Einsparung der Reaktivierungskomponenten Coenzym B12 und ATP erzielt werden. Die derzeit noch nicht gegebene Konkurrenzfähigkeit des Verfahrens gegenüber Fermentationsprozessen könnte unter Berücksichtigung des steigenden Glycerolpreises langfristig absehbar werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung, Fragestellung und Zielsetzung	1
2	Theoretische Grundlagen.....	6
2.1	Reaktionskinetik.....	6
2.1.1	Reaktionen erster Ordnung.....	6
2.1.2	Reaktionen zweiter Ordnung.....	7
2.1.3	Parallelreaktionen.....	8
2.1.4	Folgereaktionen.....	9
2.1.5	Enzym-Substrat-Komplex und Michaelis-Menten-Kinetik	12
2.2	Enzyminhibition	14
2.2.1	Reversible Hemmung	14
2.2.2	Irreversible Hemmung.....	15
2.3	Mechanismusbasierter Suizideffekt der Glyceroldehydratase	16
2.4	Wasserstoffhydrogenase als NADPH-Regenerationsenzym.....	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Mikroorganismen	21
3.1.1	<i>Lactobacillus reuteri</i>	21
3.1.2	<i>Klebsiella pneumonia</i>	21
3.1.3	<i>Escherichia coli</i>	22
3.1.4	<i>Pyrococcus furiosus</i>	23
3.2	Enzyme.....	24
3.2.1	Glyceroldehydratase	24
3.2.2	Propandioloxidoreduktase-Isoenzym	25
3.2.3	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase	26
3.2.4	Wasserstoffhydrogenase.....	27
3.3	Stoffwechselprodukte des 1,3-Propandiolsynthesewegs.....	27
3.3.1	Glycerin	28
3.3.2	3-Hydroxipropionaldehyd	28
3.3.3	1,3-Propandiol	30

3.3.4	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat.....	31
3.4	Molekularbiologische Methoden zur Vektor- und Stammkonstruktion.....	32
3.4.1	Genamplifikation mittels PCR	32
3.4.2	Restriktion und Dephosphorylierung des Expressionsvektors.....	33
3.4.3	Ligation.....	33
3.4.4	Transformation	34
3.5	Biomasseproduktion rekombinanter <i>E. coli</i> -Stämme.....	34
3.5.1	Stammhaltung, Medien und Puffer.....	34
3.5.2	Expression im Schüttelkolben	35
3.5.3	IPTG-Induktion	35
3.6	Biomasseproduktion von <i>P. furiosus</i>	35
3.6.1	Stammhaltung.....	35
3.6.2	Medien und Puffer.....	36
3.6.3	Allgemeine Kultivierungstechniken <i>P. furiosus</i>	36
3.6.4	Produktion im 30L-Fermenter	37
3.6.5	Produktion im 300L-Fermenter.....	38
3.7	Biomasseproduktion der Glyceroldehydratase-Systeme.....	38
3.7.1	Produktion von <i>L. reuteri</i> -Biomasse	38
3.7.2	Produktion von <i>K. pneumonia</i> -Biomasse	39
3.8	Zellernte.....	40
3.8.1	Diskontinuierliche Zellernte mittels Zentrifuge (<i>E. coli</i> und <i>K. pneumonia</i>).....	40
3.8.2	Kontinuierliche Zellernte mittels Contifuge (<i>P. furiosus</i> und <i>L. reuteri</i>).....	41
3.8.3	Kontinuierliche Zellernte mittels Separator	42
3.9	Zellaufschluss.....	43
3.9.1	Zellaufschluss mittels Ultraschall.....	43
3.9.2	Zellaufschluss mittels FastPrep™	44
3.10	Enzymaufreinigung und Langzeitstabilisierung.....	44
3.10.1	FPLC.....	45
3.10.2	Affinitätschromatographie.....	45

3.10.3	Anionenaustauschchromatographie.....	46
3.10.4	Fällung und Umpufferung.....	47
3.10.5	Gefriertrocknung.....	47
3.11	Enzymaktivitätstests.....	48
3.11.1	Propandioloxidoreduktase-Isoenzym Aktivitätstest.....	49
3.11.2	Glyceroldehydratase Aktivitätstest.....	50
3.11.3	Wasserstoffhydrogenase Aktivitätstest.....	51
3.12	Weitere analytische Methoden.....	51
3.12.1	HPLC.....	51
3.12.2	HPIC.....	52
3.12.3	Lyophilisierung.....	52
3.12.4	Tryptophantest nach Circle et al. (1945).....	52
3.12.5	Proteinbestimmung nach Bradford.....	53
3.12.6	Gelelektrophoresen.....	53
3.12.7	Zellwachstum und dessen Kinetik.....	54
3.12.8	Biotrockenmasse.....	54
3.12.9	Optische Dichte.....	55
3.12.10	Bestimmung der Zellzahl.....	55
3.13	Realisierung synthetischer Stoffwechselwege.....	55
3.13.1	Konzeption und Realisierung einzelner Produktionsstufen.....	55
3.13.2	Biobrick 1: Glyceroldehydratase.....	56
3.13.3	Biobrick 2a: PDORI und G6P-DH.....	60
3.13.4	Biobrick 2b: PDORI und H ₂ ase.....	61
3.13.5	Konzeption und Realisierung des mehrstufigen Prozesses.....	63
4	Ergebnisse und Diskussion.....	67
4.1	Produktion und Aufreinigung des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym.....	67
4.1.1	Ergebnisse der Konstruktion des Expressionssystems.....	67
4.1.2	Expressionsergebnis.....	70
4.1.3	Analytische Enzymaufreinigung.....	71

4.1.4	Zellaufschluss <i>E. coli</i>	72
4.1.5	Präparative Enzymaufreinigung (FPLC), Fällung und Umpufferung.....	73
4.2	Aktivitätsbestimmung des aufgereinigten Propandioloxyd-Reduktase-Isoenzym.....	75
4.2.1	Spezifische Aktivität von Hin- und Rückreaktion.....	75
4.2.2	Pufferbezogene Aktivität.....	78
4.2.3	pH-wertabhängige Aktivität.....	80
4.2.4	Aktivitätsverlust nach Lagerung.....	82
4.2.5	Aktivitätsverlust nach Anwendung.....	84
4.3	Produktion von <i>P. furiosus</i> -Biomasse und H ₂ ase.....	85
4.3.1	Upstream Processing und Vorkultur.....	86
4.3.2	Batchfermentation und Scale-up.....	88
4.3.3	Ernte der Biomasse und Aufreinigung der H ₂ ase I.....	92
4.3.4	Allgemeine Diskussion des Produktionsverfahrens.....	93
4.4	Produktion von Glyceroldehydratase-Systemen.....	94
4.4.1	Produktion und Ernte von <i>L. reuteri</i> und GDHt-Aktivität.....	94
4.4.2	Produktion und Ernte von <i>K. pneumonia</i> und GDHt-Aktivität.....	96
4.5	Realisierung synthetischer Stoffwechselwege.....	97
4.5.1	Biobrick 1: GDHt.....	97
4.5.2	Untersuchungen zum Ansatz nach Nemeth et al. (2008):.....	97
4.5.3	Fed-Batch-Ansatz zur GDHt-Regeneration (Biobrick 1).....	103
4.5.4	Biobrick 2a: PDORI und G6P-DH.....	107
4.5.5	Biobrick 2b: PDORI und H ₂ ase.....	109
4.5.6	Konzeption und Realisierung des Gesamtprozesses.....	112
4.5.7	Variation der Feed-Lösungszusammensetzung.....	114
4.5.8	Variation der Substratkonzentration.....	116
4.5.9	Variation der eingesetzten Enzymmenge.....	120
4.6	Allgemeine Diskussion des synthetischen 1,3-PDO-Produktions-verfahrens.....	121
5	Fazit und Ausblick.....	123
6	Literaturverzeichnis.....	i

Abkürzungsverzeichnis

1,2-PDO	1,2-Propandiol
1,3-PDO	1,3-Propandiol
3-HPA	3-Hydroxypropionaldehyd
6PG	6-Phosphorglukonat
A _i	Chemische Spezies im Reaktionsgemisch
ATP	Adenosintriphosphat
bp	base pairs/ Basenpaare
c ₀	Ausgangskonzentration einer chemischen Komponente
c _i	Konzentration der Komponente i
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
G6P	Glukose-6-Phosphat
G6P-DH	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
GDH	Glyceroldehydrogenase
GDHt	Glyceroldehydratase
GDHt-RF	Glyceroldehydratase-Reaktivierungsfaktor
H ₂ ase	Wasserstoffhydrogenase
HPIC	High Performance Ion Exchange Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
k	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
k _{cat}	Wechselzahl
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
MCS	multiple cloning site
μ(max)	(maximale) Wachstumsrate
NAD	Nicotinamadenindinukleotid
NADH	Nicotinamadenindinukleotid (reduziert)
NADP	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (reduziert)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDOR	Propandioloxidoreduktase
PDORI	Propandioloxidoreduktase-Isoenzym
R	Stoffmengenänderungsgeschwindigkeit
r	Reaktionsgeschwindigkeit
rpm	Rotationen pro Minute
t	Zeit
V/v	Reaktionsgeschwindigkeit
X	Umsatz

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich bezüglich Ko- und Hauptsubstratverbrauch	2
Abbildung 2: Vergleich bezüglich Ausbeute und Effizienz.....	4
Abbildung 3: Konzentrations-Zeit-Abhängigkeiten für zweistufige Folgereaktionen.....	11
Abbildung 4: Mechanismus und Inaktivierung der Glyceroldehydratase.....	17
Abbildung 5: Vorgeschlagener, zweistufiger Mechanismus zur Reaktivierung der GDHt.....	19
Abbildung 6: Glycerolstoffwechselwege von Klebsiellen.....	22
Abbildung 7: <i>P. furiosus</i> (Näther 2007).....	23
Abbildung 8: Katalytische Reaktion der Glyceroldehydratase.....	24
Abbildung 9: Oxidoreduktion von 3-HPA und NADPH zu 1,3-PDO und NADP	25
Abbildung 10: NADP-abhängige Reaktion von Glukose-6-Phosphat.....	26
Abbildung 11: NADP-Reduktionsreaktion unter Wasserstoffaufnahme.....	27
Abbildung 12: Stoffwechselprodukte und Enzyme.....	28
Abbildung 13: Vollenweider et al. 2003: Dynamisches Gleichgewicht 3HPA	29
Abbildung 14: Konzentrationsabhängigkeit von 3HPA und dessen Derivate	29
Abbildung 15: Kalibriergrade Extinktion über 3-HPA Konzentration.....	30
Abbildung 16: Aufbau der Grundoperationen für Ernte mittels Contifuge.....	42
Abbildung 17: Synthetischer Produktionsprozess.....	56
Abbildung 18: Konzept eines <i>in vitro</i> Prozesses.....	57
Abbildung 19: Experimenteller Aufbau des Fed-Batch-Ansatzes.....	59
Abbildung 20: Produktionsstufe 2 (Biobrick 2) des synthetischen Stoffwechselweges.....	60
Abbildung 21: Produktionsstufe 2 (Biobrick 2) des synthetischen Stoffwechselweges.....	61
Abbildung 22: Experimenteller Aufbau des Fed-Batch-Ansatzes	66
Abbildung 23: Links: 1%iges Agarosegel mit isolierten pET15b-Expressionsvektoren.....	67
Abbildung 24: 1%iges Agarosegel.....	68
Abbildung 25: 1%iges Agarosegel.....	69
Abbildung 26: 1%iges Agarosegel mit pET15b-Vektoren,	70
Abbildung 27: 12%ige SDS-Page	71
Abbildung 28: 12%ige SDS-Page.....	72
Abbildung 29: Durchlauf- und Elutions-Peaks der präparativen Enzymaufreinigung	73
Abbildung 30: Verschiedene Fraktionen des FPLC-Aufreinigungsprozesses.....	74
Abbildung 31: Verlauf der NADPH-Entwicklung.....	76

Abbildung 32: Verlauf des NADPH-Verbrauchs.....	77
Abbildung 33: Relative Aktivität des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym.....	79
Abbildung 34: Hepes-Molekül (links) und Tris-Molekül (rechts).....	80
Abbildung 35: Relative Aktivität des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym.....	80
Abbildung 36: Verschiedene Formen von 3-HPA.....	81
Abbildung 37: Aktivitätsverlust nach Lagerung.....	83
Abbildung 38: Aktivitätsverlust nach Lagerung.....	83
Abbildung 39: Relative Aktivität des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym.....	84
Abbildung 40: Vergleich klassischer (A) und angewandter (B) Inokulations.....	87
Abbildung 41: Ergebnisse von zeitpunktabhängigen Überimpfungsexperimenten.....	89
Abbildung 42: Vergleichsexperimente zweier Scale-up-Kaskaden:.....	91
Abbildung 43: Fermentationsverlauf von <i>L. reuteri</i> im 30L-Reaktor.....	95
Abbildung 44: Ergebnisse von Nemeth et al. (2008).....	98
Abbildung 45: Durch Nemeth et al. (2008) angestrebtes Reaktionsschema.....	98
Abbildung 46: Wiederholung des Versuchs von Nemeth et al. (2008).....	100
Abbildung 47: Modifizierte Wiederholung des Versuchs von Nemeth et al. (2008).....	101
Abbildung 48: Reinterpretation der korrekt gemessenen Daten durch Nemeth et al. (2008).....	102
Abbildung 49: Konzept eines <i>in vitro</i> Prozess.....	104
Abbildung 50: Experimentelle Ergebnisse des Proof of Concept.....	105
Abbildung 51: Verifizierungsexperiment des Proof of Concept.....	106
Abbildung 52: Zielsystemvariante (links) und Modellsystemvariante (rechts).....	107
Abbildung 53: Ergebnisse des experimentellen Ansatzes der Modellvariante.....	108
Abbildung 54: Ergebnisse des experimentellen Ansatzes der Zielvariante.....	110
Abbildung 55: Ergebnisse des Negativkontrollansatzes der Zielvariante.....	111
Abbildung 56: Proof of Concept-Experiment für den Gesamtprozess.....	114
Abbildung 57: Glycerol- und 1,3-PDO-Konzentrationsverlauf.....	117
Abbildung 58: Gesamtproduktionsprozess.....	120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: pH-wertabhängige Halbwertszeiten von NADPH bei 30°C (Wu et al. 1987).....	31
Tabelle 2: Temperaturabhängige Halbwertszeiten von NADPH bei pH6,0 (Wu et al. 1987).	32
Tabelle 3: Medienzusammensetzung <i>P. furiosus</i> nach Biller et al. (2002).....	36
Tabelle 4: Medienzusammensetzung zur Kultivierung von <i>L. reuteri</i> nach Peng et al.	39
Tabelle 5: Medienzusammensetzung zur anaeroben Kultivierung von <i>K. pneumonia</i>	40
Tabelle 6: Zusammenfassung der Affinitätschromatographiedaten.....	46
Tabelle 7: Reaktionsansatz für Biobrick 1 (Batch-Ansatz).....	58
Tabelle 8: Reaktivierungslösung für Biobrick 1 (Feed-Ansatz).	58
Tabelle 9: Reaktionsansatz für Biobrick 2: PDORI und G6P-DH.....	60
Tabelle 10: Reaktionsansatz für Biobrick 2: PDORI und H2ase	63
Tabelle 11: Reaktionsansatz für Biobrick 1	64
Tabelle 12: Reaktivierungslösung.....	64
Tabelle 13: Freigesetzte Proteinkonzentration pro Ultraschallzyklus.....	72
Tabelle 14: Scale-up und konstanter Leistungseintrag (P/V).....	90
Tabelle 15: Freigesetzte Proteinkonzentration	92
Tabelle 16: Ergebnisse der H ₂ ase I-Aufreinigung aus 9g <i>P. furiosus</i> -Biomasse	93
Tabelle 17: Freigesetzte Proteinkonzentration pro Ultraschallzyklus, <i>L. reuteri</i>	95
Tabelle 18: Freigesetzte Proteinkonzentration pro Ultraschallzyklus, <i>K. pneumonia</i>	96
Tabelle 19: Ergebnisse von Xu et al. (2009).	103
Tabelle 20: Ergebnisse der ATP- und Coenzym B12-Konzentrationsvariation	115
Tabelle 21: Gemessene Glycerol- und 1,3-PDO-Konzentrationen	118

1 Einleitung, Fragestellung und Zielsetzung

Mikrobielle Fermentationsprozesse, als klassische biotechnologische Produktionsverfahren, leisten einen wichtigen Beitrag zur Herstellung essentieller Produkte, wie Chemikalien, Pharmazeutika und Energieträger (Zeng et al. 2002). Dabei substituieren sie nicht nur bereits etablierte, rein chemische Prozesse, sondern machen die Produktion diverser Bedarfsgüter überhaupt erst möglich (Chmiel 2011).

Allerdings weisen sämtliche Fermentationsprozesse grundsätzlich die durchaus nachteilige Eigenschaft auf, die entsprechenden Ausgangssubstrate (Rohstoffe) weit unter dem aus stöchiometrischer Sicht theoretisch möglichen Ausbeutemaximum zu transformieren. Der Grund hierfür ist in der Kopplung der Oxidation und Reduktion des Substrats zu finden. Ein beträchtlicher Anteil des Ausgangssubstrats, welches aus technischer Sicht primär zum Zielprodukt umgewandelt werden soll, wird unvermeidlich anteilig zu Biomasse, unerwünschten Nebenprodukten und CO_2 verstoffwechselt sowie zur Energiegewinnung des Mikroorganismus verwendet (Broderick et al. 2000). Eine vollständige und ausschließliche Transformation des Substrats zu den entsprechenden Zielprodukten ist mittels klassischen Fermentationsprozessen somit kaum möglich.

Ein weiterer Nachteil fermentativer Produktionsprozesse stellt der obligatorische Bedarf an Kosubstraten dar, welche zwar notwendig für Wachstum und Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen sind, jedoch keineswegs in das eigentliche Zielprodukt einfließen. Als Beispiel seien hier klassische Medienadditive wie Hefeextrakt, Vitamine und Spurenelemente genannt, welche sich in einem fermentativen Endprodukt, wie zum Beispiel Ethanol, nicht wiederfinden. Zusammenfassend können also Fermentationsprozesse aus produktionstechnischer Sicht so charakterisiert werden, dass das Hauptsubstrat nur anteilig in das entsprechende Zielprodukt einfließt.

Vor allem durch die generelle Verteuerung von biologischen und nichtbiologischen Rohstoffen in naher Zukunft, welche zum einen durch das Bevölkerungswachstum, zum anderen durch die zeitnahe Überschreitung des Ölfördermaximums (Bentley et al. 2007) verursacht wird, erscheint die unzureichende Rohstoffnutzung in Gestalt von relativ niedrigen Produktionsausbeuten der Fermentationsprozesse als langfristig ineffizient.

Eine mögliche Methode zur effizienteren Substratumwandlung kann dagegen die Technologie der synthetischen *in vitro* Produktionssysteme darstellen (Tundo et al. 2000). Diese neuartigen Produktionsprozesse basieren auf einem minimalistischen Prinzip synthetischer Enzymreaktionen, welche nach dem Baukastenprinzip zu neuartigen und somit hocheffizienten Produktionssystemen konstruiert werden können. Die entscheidenden effizienzsteigernden Faktoren gegenüber Fermentationsprozessen finden sich:

- (a) in der vollständigen Transformation des Ausgangssubstrats zum entsprechenden Zielprodukt mit einer theoretisch möglichen Ausbeute von 100% (Hodgman 2012),
- (b) in der dadurch vermeidbaren Produktion von Nebenprodukten und der damit in Reinform vorliegenden Zielprodukte, was die Produktaufreinigung erleichtert (Ardao and Zeng 2012).

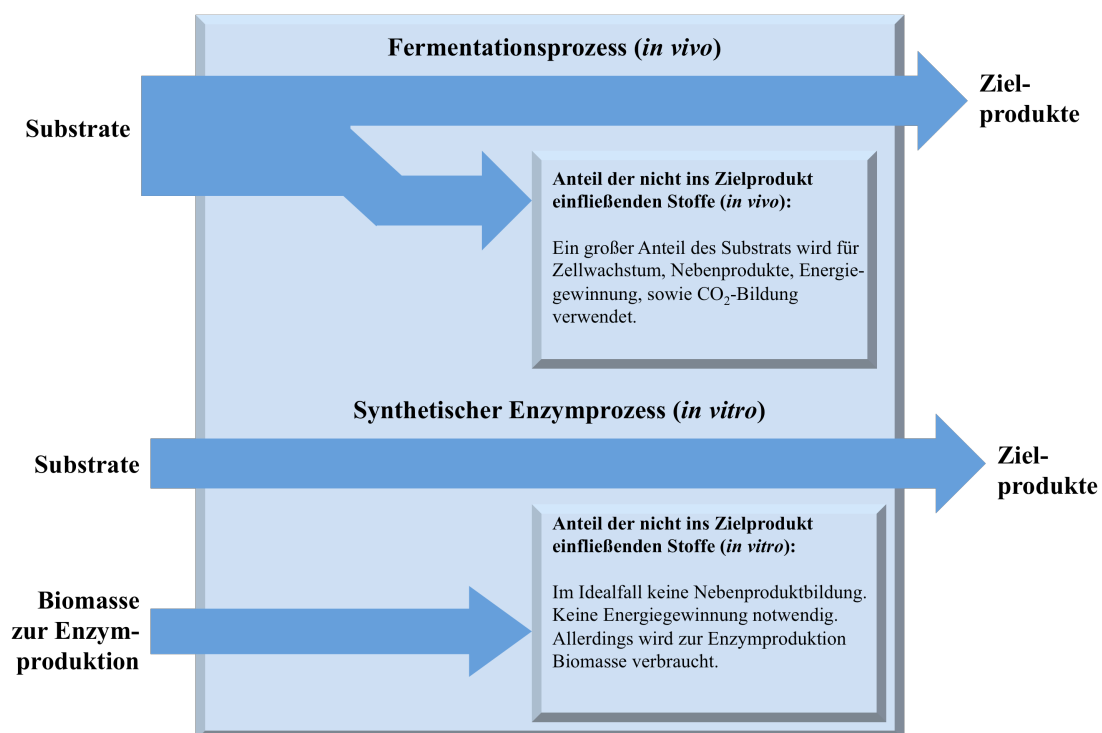


Abbildung 1: Vergleich bezüglich Substratverbrauch sowie Ausbeute und Effizienz von Fermentationsprozessen (*in vivo*) und synthetischen Enzymreaktionen (*in vitro*). Während in Fermentationsprozessen die Substrate nur anteilig in das Zielprodukt einfließen, werden in synthetischen Prozessen die Substrate vollständig zum Zielprodukt transformiert.

Als nicht zu vernachlässigender Nachteil der synthetischen Enzymproduktionsprozesse sei hier jedoch der zugrunde liegende Enzymproduktionsaufwand genannt. Dabei sind zur Enzymproduktion ebenfalls klassische Fermentationsrohstoffe notwendig, um die entsprechenden Enzymmengen zur Verfügung zu stellen. Eine quantitative Gegenüberstellung der nicht in das Zielprodukt einfließenden Rohstoffanteile von fermentativen und enzymatischen Prozessen muss für individuelle Prozesse spezifisch erfolgen. Für *in vitro* Enzymprozesse besteht jedoch aufgrund der effizienteren Substratnutzung zumindest die Chance einer wirtschaftlichen Konkurrenzfähigkeit. In **Abbildung 1** ist der Vergleich bezüglich Substratverbrauch sowie Ausbeute und Effizienz von Fermentationsprozessen (*in vivo*) und synthetischen Enzymreaktionen (*in vitro*) schematisch dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit soll ein solcher synthetischer Enzymprozess am Beispiel der biotechnologischen 1,3-Propandiolproduktion (1,3-PDO) aus Glycerol entwickelt werden. Das Exempel der 1,3-Propandiolproduktion eignet sich dabei hervorragend aufgrund folgender Aspekte: Die derzeit in Industrie und Technik etablierten Produktionsverfahren für 1,3-PDO aus Glycerol belaufen sich ausschließlich auf mikrobielle Fermentationsprozesse (Biebl et al. 1999). Enzymatische Prozesse sind hier bis heute nicht etabliert. Die Ausbeute dieser Fermentationsprozesse, welche von reinem Glycerol als Hauptsubstrat ausgehen, beläuft sich auf ca. 60% (0.6 mol/mol) (Cheng et al. 2004, Zeng & Sabra 2012, Zeng 1996). Während ein Teil des Glycerols über den reduktiven Stoffwechselweg der Mikroorganismen zu dem entsprechenden Zielprodukt 1,3-PDO umgewandelt wird, beläuft sich der verbleibende Teil des Glycerolverbrauchs auf Biomassebildung sowie oxidative Energiegewinnung (Ahrens et al. 2000). Eine Abweichung von diesem Schema ist aufgrund von sich gegenseitig regenerierenden Kofaktorabhängigkeiten nicht möglich. Durch Zugabe von Glukose kann zwar die glycerolbezogene Produktausbeute gesteigert werden (Anex et al. 2006), die Glukose selber fließt jedoch nicht direkt in das Zielprodukt ein, wodurch die gesamtsubstratbezogene Produktausbeute (1,3-PDO pro (Glycerol+Glukose)) kaum gesteigert wird. Auch Additive wie Hefeextrakt (Forsberg et al. 1987) stellen im Fall der 1,3-Propandiolproduktion eine solche klassische und bereits zuvor in allgemeiner Form beschriebene Maßnahme zur Produktivitätssteigerung dar, welche allerdings ebenfalls zur Erhöhung der Gesamtsubstratkonzentration (hier: Glycerol+Hefeextrakt) führt.

Die Entkopplung des parallel ablaufenden und somit ineffizienten Glycerolverbrauchs von jeglichen Energie- und Biomassegewinnungsprozessen, wie sie intrazellulär ablaufen (*in vivo*), gelingt in der vorliegenden Arbeit durch die Entwicklung eines enzymatischen *in vitro* Systems. In diesem minimalistisch konstruierten Prozess wird Glycerol zunächst durch die Glyceroldehydratase (GDHt) zu 3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA) umgewandelt, welches wiederum durch das Propandioloxidoreduktase-Isoenzym (PDORI) zum Zielprodukt 1,3-PDO transformiert wird. Der in diesem zweiten Schritt benötigte Kofaktor NADPH wird parallel durch eine entsprechende Wasserstoffhydrogenase (H₂ase) und Aufnahme von gelöstem Wasserstoff kontinuierlich regeneriert.

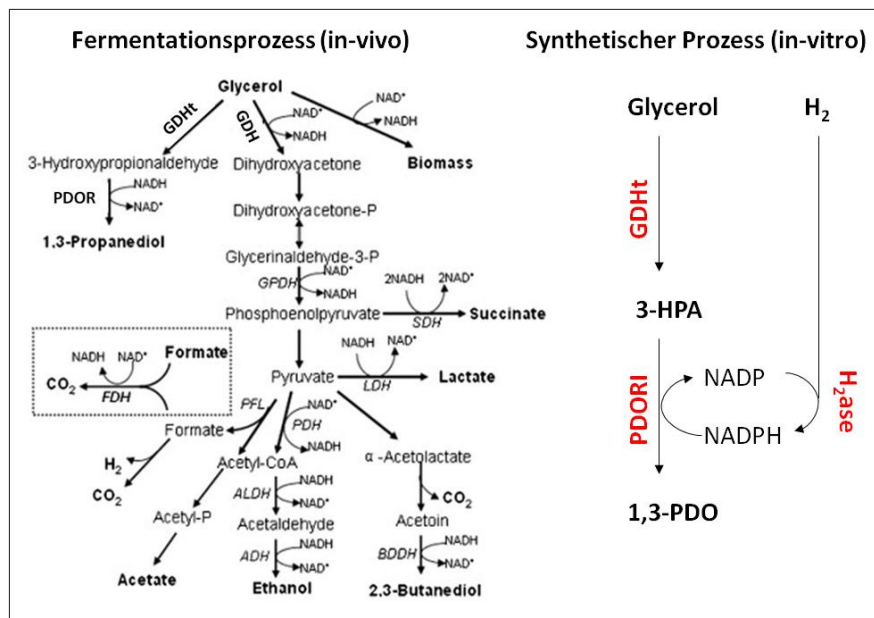


Abbildung 2: Vergleich bezüglich Ausbeute und Effizienz von fermentativer 1,3-Propanediolproduktion (*in vivo*) und synthetischen Enzymreaktionen (*in vitro*). Während in Fermentationsprozessen Glycerol nur anteilig in das Zielprodukt 1,3-PDO einfließt, werden in synthetischen Prozessen die Hauptsubstrate vollständig zum Zielprodukt transformiert. (Linker Teil der Abbildung angelehnt an Biebl et al. 1999 und Zhang et al. 2009, modifiziert).

Durch dieses aus nur drei Enzymen bestehende System können theoretisch die Ausgangssubstrate Glycerol und Wasserstoff vollständig und mit einer Produktausbeute von 100% (1 mol/mol) zu 1,3-PDO umgewandelt werden. In **Abbildung 2** ist der Vergleich bezüglich Ausbeute und Effizienz des Fermentationsprozesses (*in vivo*) und des synthetischen Enzymprozesses (*in vitro*) dargestellt.

Die experimentellen Fragestellungen zur Untersuchung dieses neuartigen Modellprozesses eines synthetischen Produktionssystems lassen sich den folgenden drei Kategorien zuordnen:

- (I) **Machbarkeit:** Ist eine grundsätzliche Realisierbarkeit dieses angestrebten synthetischen 1,3-Propandiolproduktionsprozesses aus Glycerol möglich?
- (II) **Ausbeute:** Welche Ausbeuten lassen sich mit diesem System erzielen? Wie nahe kommen diese dem theoretisch möglichen Maximum von 1 mol/mol? Können somit die von Glycerol als Substrat ausgehende Fermentationsprozesse übertroffen werden?
- (III) **Vor- und Nachteile:** Welche Schwierigkeiten ergeben sich mit der Etablierung eines solchen *in vitro* Prozesses verglichen mit einem relativ einfach zu steuernden Fermentationsprozess? Welche volumetrischen Produktivitäten können erreicht werden? Was bedeutet dies (qualitativ, nicht-quantitativ) für die Wirtschaftlichkeit dieses Prozesses lang- und mittelfristig?

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines Produktionsprozesses bestehend aus einem synthetischen Ensemble natürlicher Enzyme als potentiell Substitutionsverfahren für klassische Fermentationsprozesse am Beispiel der 1,3-Propandiolproduktion aus Glycerol. Strukturell teilt sich die vorliegende Arbeit somit in zwei Teilbereiche: Der erste Teil der Zielsetzung beläuft sich auf die Produktion, eventuelle Aufreinigung und Bereitstellung der entsprechenden Enzyme Glyceroldehydratase, Propandioloxidoreduktase-Isoenzym sowie der Wasserstoffhydrogenase gemäß **Abbildung 2**. Ziel des zweiten Teils der Arbeit ist anschließend die prozesstechnische Vereinigung der Enzyme zu dem angestrebten synthetischen Gesamtprozess. Dabei liegt der Fokus auf der Erzielung von wesentlich höheren Produktausbeuten als entsprechende Fermentationsprozesse, um ein grundsätzliches, langfristiges Substitutionspotential dieses synthetischen Produktionsverfahrens nachzuweisen.

2 Theoretische Grundlagen

Das vorliegende Kapitel umfasst vor allem jene theoretischen Grundlagen, welche entscheidenden Charakter zur Bearbeitung der wissenschaftlichen Herausforderungen darstellen. Besonders auf die Themen der Reaktionskinetik und des mechanismusbasierten Suizideffekts der Glyceroldehydratase werden hier verstärkt Bezug genommen.

2.1 Reaktionskinetik

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Reaktionen belaufen sich auf Reaktionen erster, als auch zweiter Ordnung, sowie auf Folge- und Parallelreaktionen. Schließlich kann das angestrebte Zielsystem als ein Reaktionsnetzwerk betrachtet werden. Die theoretischen Grundlagen dieser Reaktionen werden im Folgenden zusammengefasst.

2.1.1 Reaktionen erster Ordnung

Zu den Reaktionen erster Ordnung gehören beispielsweise Isomerisierungs- oder Zerfallsreaktionen. In der vorliegenden Arbeit tritt dieser Reaktionstyp beispielsweise in der Dehydratisierung von Glycerol zu 3-Hydroxipropionaldehyd durch die Glyceroldehydratase auf. Der Reaktionsgeschwindigkeitsansatz dieser Reaktion erster Ordnung ist somit proportional zur Substratkonzentration:

$$r = k c_1 \quad (1)$$

Für die Abreaktion von A_1 mit $v_1 = -1$ gilt:

$$R_1 = v_1 r = \frac{dc_1}{dt} = -k c_1 \quad (2)$$

Dabei ist $-dc_1/dt = dc_2/dt$, falls die stöchiometrischen Koeffizienten gleich sind und nur eine Produktkomponente vorliegt. Durch Integration dieser Gleichung

$$\int_{c_{1,0}}^{c_1} \frac{dc_1}{c_1} = -k \int_0^t dt \quad (3)$$

ergibt sich

$$\ln \frac{c_1}{c_{1,0}} = -k t \quad (4)$$

bzw.

$$c_1 = c_{1,0} \exp(-k t) \quad (5)$$

Wird die Konzentration A_1 durch den Umsatzgrad $X_1 = (c_{1,0}-c_1)/c_{1,0}$ ersetzt, so ergibt sich (Baerns et al. 2007):

$$X_1 = 1 - \exp(-k t) \quad (6)$$

2.1.2 Reaktionen zweiter Ordnung

Bei Reaktionen zweiter Ordnung kann es sich zum Beispiel um Dimerisierungen, Hydrierungen oder Chlorierungen handeln. In der vorliegenden Arbeit tritt dieser Reaktionstyp beispielsweise in der Hydrierung von 3-Hydroxipropionaldehyd zu 1,3-PDO durch das Propandioloxidoreduktase-Isoenzym unter Verwendung von NADPH als Reduktionsmittel auf. Die entsprechende Reaktionsgeschwindigkeitsgleichung lautet in diesem Fall:

$$R = \frac{dc_1}{dt} = \frac{dc_2}{dt} = -k c_1 c_2 \quad (7)$$

Die Integration der Gleichung erfolgt nach Substitution der jeweils anderen Komponente über den stöchiometrischen Zusammenhang:

$$c_2 = c_{2,0} - (c_{1,0} - c_1) \quad (8)$$

Für die vorliegende Arbeit ist es unter Berücksichtigung der Applikation dieser Gleichungen auf die Reaktionen des Zielprozesses sinnvoll, anzunehmen, dass eine der beiden Komponenten in sehr großem Überschuss vorliegt. Somit kann diese Konzentration näherungsweise als konstant angesehen werden. Das Problem kann somit vereinfacht werden, da ein formalkinetischer Ansatz erster Ordnung erhalten wird:

$$\frac{dc_1}{dt} = -k c_{2,0} c_1 = k_{\text{eff}} c_1 \quad (9)$$

Hier kann $k c_{2,0}$ gleich k_{eff} angenommen werden, da gilt: $c_{2,0} \gg c_{1,0}$ (Baerns et al. 2007).

2.1.3 Parallelreaktionen

Parallelreaktionen zeichnen sich in der Biochemie durch die synchrone Verwendung von zwei oder mehr Substraten aus, welche zu zwei oder mehr Produkten transformiert werden. In der vorliegenden Arbeit werden im angestrebten Zielprozess beispielsweise 3-Hydroxipropionaldehyd und NADPH durch das Propandioloxidoreduktase-Isoenzym zu 1,3-PDO und NADP umgesetzt. Es liegt also eine parallele (gekoppelte) Reduktions- sowie Oxidationsreaktion vor.

Auch wie im vorangegangenen Abschnitt ist es unter Berücksichtigung des entsprechenden Zielprozesses sinnvoll eine der Komponenten (A_2) als im Überschuss vorliegend zu betrachten. Die Transformation von A_1 zum Zielprodukt bewirkt somit nur eine vernachlässigbar kleine Konzentrationsänderung an A_2 . Somit verläuft auch diese Reaktion formal nach erster Ordnung. Die Geschwindigkeit der Substratverbrauchs- sowie Produktgenerationsreaktionen entsprechen somit:

$$\frac{dc_1}{dt} = -(k_1 + k_2) c_1 \quad (10)$$

$$\frac{dc_3}{dt} = (k_1 c_1) \quad (11)$$

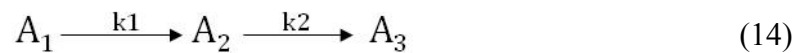
$$\frac{dc_4}{dt} = (k_2 c_1) \quad (12)$$

Mit Integration der oberen Gleichung wird folgender Ausdruck erhalten (Baerns et al. 2007):

$$c_1 = c_{1,0} \exp [-(k_1 + k_2) t] \quad (13)$$

2.1.4 Folgereaktionen

Auch Folgereaktionen treten in der vorliegenden Arbeit im Rahmen des mehrstufigen Produktionsprozesses auf. So stellt die schrittweise Transformation von Glycerol über 3-Hydroxipropionaldehyd zu 1,3-PDO eine klassische zweistufige Folgereaktion dar. Dabei kann die hier betrachtete zweistufige Reaktion wie folgt vereinfacht werden:



Wenn für die Reaktionsschritte 1 und 2, wie im Zielprozess der vorliegenden Arbeit, eine Reaktion erster Ordnung angenommen werden kann, lassen sich die Stoffmengenänderungsgeschwindigkeiten R_1 bis R_3 wie folgt zusammenfassen:

$$R_1 = \frac{dc_1}{dt} = -k_1 c_1 \quad (15)$$

$$R_2 = \frac{dc_2}{dt} = k_1 c_1 - k_2 c_2 \quad (16)$$

$$R_3 = \frac{dc_3}{dt} = k_2 c_2 \quad (17)$$

Mit

$$c_1 = c_{1,0} \exp [-k_1 t] \quad (18)$$

folgt nach Integration von Gleichung (19):

$$\frac{dc_2}{dt} = k_1 c_{1,0} \exp[-k_1 t] - k_2 c_2 \quad (19)$$

Die Lösung dieser Differenzialgleichung mit der Ausgangsbedingung $c_2 = 0$ und $k_1 \neq k_2$ ergibt die Konzentrations-Zeit-Abhängigkeit des Intermediats A_2 , in der vorliegenden Arbeit also die Bildung von 3-Hydroxipropionaldehyd:

$$c_2 = \frac{k_1}{k_2 - k_1} c_{1,0} [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)] \quad (20)$$

Ferner werden in der vorliegenden Arbeit die Ausgangskonzentrationen von A_2 und A_3 (also: 3-Hydroxipropionaldehyd und 1,3-Propandiol) gleich Null angenommen, es gilt also:

$$c_1 + c_2 + c_3 = c_{1,0} \quad (21)$$

Für den zeitlichen Konzentrationsverlauf des finalen Produkts A_3 (1,3-Propandiol) folgt somit:

$$c_3 = c_{1,0} \left[1 + \frac{1}{k_2 - k_1} (k_2 \exp(-k_1 t) - k_1 \exp(-k_2 t)) \right] \quad (22)$$

Der zeitliche Verlauf der Produktbildung c_3 hängt bei dieser zweistufigen Reaktion in charakteristischer Weise vom Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 ab. Es können für diese zweistufigen Folgereaktionen drei Fälle unterschieden werden: Ist $k_1 \gg k_2$, wird das Intermediat sehr viel langsamer als das Ausgangssubstrat transformiert. Es liegt somit eine temporäre Akkumulation des Intermediates A_2 vor, während A_1 bereits weitestgehend transformiert wurde.

Gilt dagegen, dass k_1 und k_2 in etwa gleich groß sind, so liegen Ausgangssubstrat A_1 und Intermediat A_2 temporär in ähnlichen Konzentrationen vor. Ferner bildet sich parallel dazu bereits ein erheblicher Anteil des finalen Produktes A_3 .

Der in der vorliegenden Arbeit besonders relevante dritte Fall gilt, wenn $k_1 \ll k_2$. Hier werden nur sehr geringe Konzentrationen des Intermediates A_2 erreicht, d. h., sowohl Stoffmenge, wie auch dessen zeitliche Änderung dc_2/dt sind verglichen zu den anderen Stoffkomponenten A_1 und A_3 sehr gering. In diesem Zustand gilt für die Komponente A_2 das Quasistationaritätsprinzip (Baerns et al. 2007). In **Abbildung 3** sind die drei beschriebenen Fälle für die Relationen von k_1 und k_2 bezüglich ihrer Konzentrations-Zeit-Verlauf skizziert.

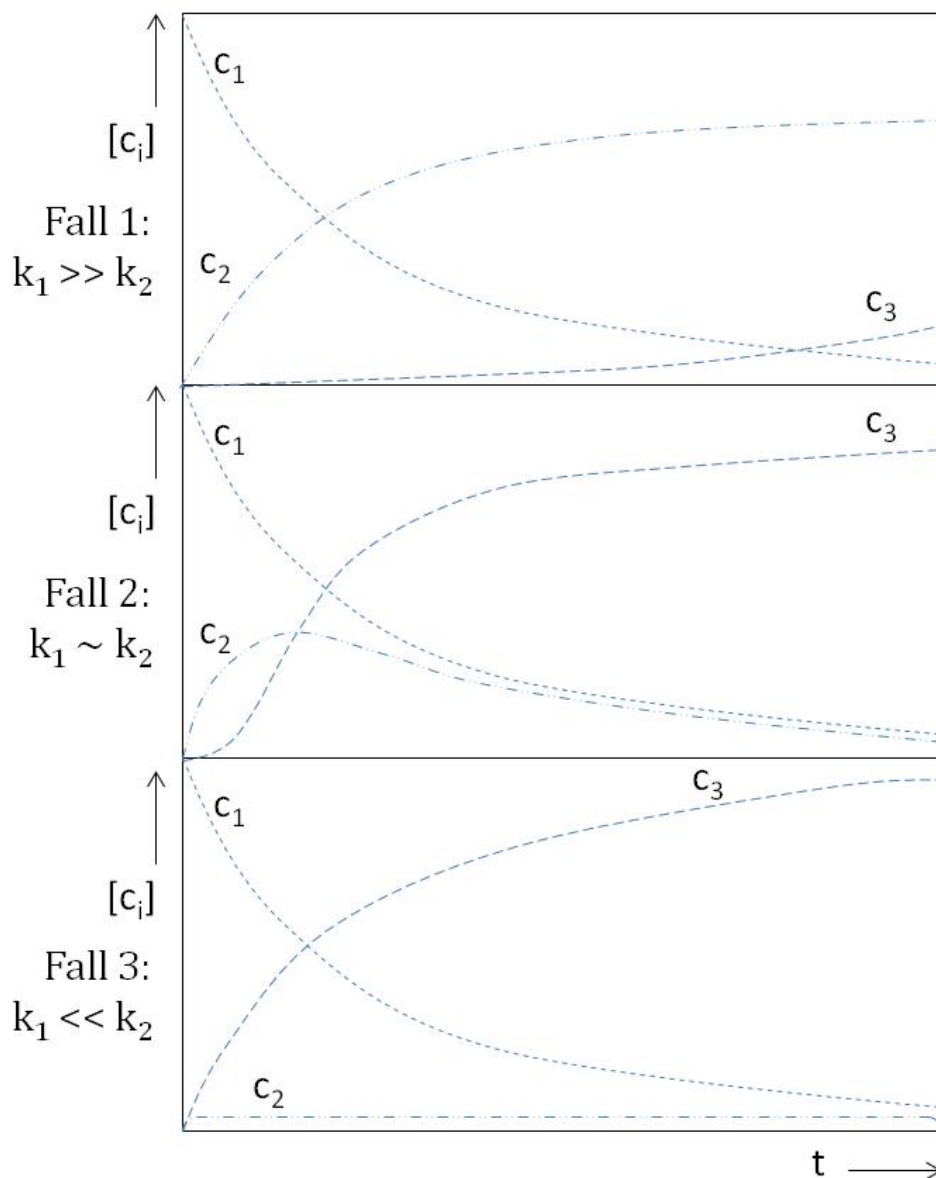


Abbildung 3: Konzentrations-Zeit-Abhängigkeiten für zweistufige Folgereaktionen mit den drei Fällen $k_1 \gg k_2$, $k_1 \sim k_2$ sowie $k_1 \ll k_2$. Fall 3 entspricht hier dem Quasistationaritätsprinzip, welches für den angestrebten Zielprozess der vorliegenden Arbeit von besonderer Bedeutung ist.

2.1.5 Enzym-Substrat-Komplex und Michaelis-Menten-Kinetik

Bei enzymatischen Reaktionen erfolgt die biochemische Umsetzung über die Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes zwischen dem Substrat A_1 und dem Enzym. Es kann angenommen werden, dass die Gleichgewichtseinstellung verglichen mit der Weiterreaktion zu A_2 sehr schnell ist (Bisswanger 2000).



Daraus folgt, dass das Gleichgewicht zwischen dem Enzym-Substrat-Komplex sowie dem Substrat A_1 und dem gelösten Enzym durch die langsame Umwandlung des Komplexes kaum beeinflusst wird (Baerns et al. 2007). Wird die Enzymkonzentration gegenüber der Substratkonzentration als klein angenommen, wie es in biochemischen Reaktionen sinnvoll ist, wird ein großer Teil der Enzymkonzentration für die Etablierung einer quasistationären Konzentration c_{Komplex} des Komplexes benötigt (Bisswanger 2000). Es folgt:

$$c_{\text{Enz},0} - c_{\text{Komplex}} = c_{\text{Enz}} \quad (24)$$

$$c_1 - c_{\text{Komplex}} \sim c_1 \quad (25)$$

Die Gleichgewichtskonstante entspricht somit

$$K = \frac{c_{\text{Komplex}}}{(c_{\text{Enz},0} - c_{\text{Komplex}})c_1} \quad (26)$$

und es gilt

$$c_{\text{Komplex}} = \frac{K c_{\text{Enz},0} c_1}{1 + K c_1} \quad (27)$$

In der Michaelis-Menten-Kinetik (Bisswanger 2000) entspricht die Größe $1/K$ der Gleichgewichtskonstanten K_s , welche sich als ein Verhältnis der Gleichgewichtskonstanten der Bildung und Dissoziation des Substrat-Enzym-Komplexes verstehen

lässt. Die Geschwindigkeit der katalytischen Reaktion steht im proportionalen Verhältnis zum Substrat-Enzym-Komplex und ist nicht mehr direkt abhängig von der Substratkonzentration. Es ergibt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit der Ausdruck:

$$v = k_{\text{cat}} c_{\text{Komplex}} \quad (28)$$

Die Konzentration von c_{Komplex} hängt hyperbolisch mit der Konzentration des Substrats c_1 zusammen (Illanes 2008). Dieser Zusammenhang wird in folgender Gleichung erfasst:

$$c_{\text{Komplex}} = \frac{c_{\text{Enz}} c_1}{K_m + c_1} \quad (29)$$

Die tatsächliche Reaktionsgeschwindigkeit wird durch Kombination von Gl. (27) und (28) erhalten:

$$v = \frac{k_{\text{cat}} c_{\text{Enz}} c_1}{K_m + c_1} \quad (30)$$

Dabei stellt K_m die Michaelis-Menten-Konstante dar, welcher jener Substratkonzentration entspricht, bei welcher das Enzym zur Hälfte gesättigt, d. h. die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit, vorliegt. Da der Term $(k_{\text{cat}} c_{\text{Enz}})$ der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} entspricht, gilt ferner:

$$v = \frac{V_{\text{max}} c_1}{K_m + c_1} \quad (31)$$

Für tiefere, theoretische Hintergründe der Michaelis-Menten-Kinetik wird an dieser Stelle auf weiterführende Literatur verwiesen (Bisswanger 2000, Pandey et al. 2005, Illanes 2008).

2.2 Enzyminhibition

Neben der Reaktionskinetik von Enzymen ist in der vorliegenden Arbeit auch das Verständnis für die Inhibierung von Enzymen von Bedeutung, um die Durchführung eines enzymatischen Produktionsprozesses zu gewährleisten. Im Folgenden werden die Enzyminhibierungsarten Substratüberschusshemmung, Produkthemmung sowie die irreversible Hemmung vorgestellt, welche für den Zielprozess und dessen Enzyme besonders relevant sind. Obwohl noch weitere Enzyminhibierungsarten bekannt und eingehend beschrieben sind (Pandey et al. 2005), wird auf die detaillierte Beschreibung dieser für die vorliegende Arbeit weniger relevanten Hemmungsarten verzichtet.

2.2.1 Reversible Hemmung

Reversible Enzyminhibierungen zeichnen sich dadurch aus, dass der Inhibitor vom Enzym reversibel losgelöst werden kann. Vor allem für die intrazelluläre Steuerung von Stoffwechselwegen wird diese Art der Enzymhemmung durch den Organismus genutzt, um Stoffwechselwege temporär zu unterbinden. An reversiblen Inhibitionen sind für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme die Substratüberschusshemmung sowie die Produkthemmung von Bedeutung, welche beide zu den kompetitiven Inhibitionsarten gehören. Nicht betrachtet werden in diesem Abschnitt die sogenannten nicht-kompetitiven Hemmungen, wie beispielsweise allosterische Inhibition, da diese für die entsprechenden Enzyme nicht bekannt sind.

Die Substratüberschusshemmung vollzieht sich in der Weise, dass es bei sehr hohen Substratkonzentrationen zu der Bindung eines zweiten Substratmoleküls an das aktive Zentrum des Enzyms kommt. Hierdurch entsteht ein Enzym-Substrat-Substrat-Komplex, welcher nicht in der Lage ist, in das Produkt und das freie Enzym zu dissoziieren. Die Geschwindigkeitsgleichung dieses Reaktionsmechanismus lautet

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{c_{1,0}} + \frac{c_{1,0}}{K_i}} \quad (32)$$

wobei K_i die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Substrat-Komplexes ist. Um eine optimale Prozessführung im Zielprozess zu gewährleisten, muss eine Substrat-

überschussinhibierung durch entsprechende Substratkonzentrationsanpassung umgangen werden (Bisswanger 2000).

Die Produkthemmung gehört ebenfalls zu den reversiblen Enzyminhibierungen. Auch die Produkthemmung eignet sich intrazellulär hervorragend zur zeitlich begrenzten Inaktivierung von Stoffwechselwegen, sofern eine ausreichende Menge an Produkt vorhanden ist. Durch eine prozessintegrierte Produktseparation kann im Falle hoher Produktakkumulationen im *in vitro* Prozess eine Produktinhibition und somit eine verringerte Produktionsrate vermieden werden, falls notwendig.

2.2.2 Irreversible Hemmung

Die irreversible Enzymhemmung ist ein Phänomen, welches nicht zur Steuerung der Stoffwechselaktivitäten dient, sondern meist mit einer Schädigung des Enzyms und somit dem Verlust der entsprechenden Aktivität einhergeht. Durch eine irreversible Bindung des Inhibitors wird eine Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes unmöglich. Die Aktivität hängt hier linear mit der Inhibitorkonzentration zusammen (Bisswanger 2000). Es werden hier die Fälle der vollständigen Inhibition sowie der partiellen Inhibition unterschieden. Während bei der vollständigen Inhibition durch konstante Erhöhung der Inhibitorkonzentration die absolute Enzymaktivität auf Null reduziert werden kann, wird bei der partiellen Hemmung auch mit sehr hohen Inhibitorkonzentrationen keine vollständige Enzyminaktivität erreicht (Pandey et al. 2005). Die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion des Inhibitors mit dem Enzym kann als pseudo-erster Ordnung betrachtet werden, sofern die Inhibitorkonzentration höher als die des Enzyms vorliegt.

$$-\frac{dc_{Enz}}{dt} = -\frac{dA}{dt} = k c_{I,0} c_{Enz} \quad (32)$$

A steht hierbei für die Enzymaktivität. Obwohl die Substratkonzentration c_1 in oben stehender Gleichung nicht auftritt, ist die Geschwindigkeitskonstante k in dieser Gleichung abhängig von der Konzentration des vorliegenden Substrates, da das Vorhandensein von Substrat in der Regel das Enzym vor der Inaktivierung schützt (Illanes 2008). Ausnahme hiervon bilden die sogenannten Suizidsubstrate, welche eine

kovalente Bindung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms eingehen und dieses somit dauerhaft schädigen. Da hier Substrat und Inhibitor dieselbe Komponente sind, wirkt eine erhöhte Substratkonzentration natürlich nicht schützend, sondern stärker inhibierend. In der vorliegenden Arbeit ist diese Art der Hemmung für die Glyceroldehydratase von besonderer Bedeutung und wird im folgenden Kapitel näher beleuchtet.

2.3 Mechanismusbasierter Suizideffekt der Glyceroldehydratase

Die Glyceroldehydratase (E. C. 4.2.1.30) ist ein Enzym, welches die Adenosylcobalamin- d. h. Coenzym-B12-abhängige Konversion von Glycerol, 1,2-Propandiol sowie 1,2-Ethandiol zu den entsprechenden Aldehyden katalysiert (Smiley et al. 1962, Pawelkiewicz et al. 1965, Toraya 1994). Das Enzym ist an der Entstehung von Hydroxipropionaldehyd, einem Elektronenakzeptor in der Glycerolfermentation, involviert (Toraya et al. 1980, Forage et al. 1982). Obwohl das Enzym von entsprechenden Bakterien, wie Klebsiellen und anderen Enterobakterien, zur Glycerolverstoffwechslung genutzt wird, ist ein mechanismusbasierter Suizideffekt, d. h. eine substratinitiierte Inhibierung im Zusammenhang mit Glycerol zu beobachten (Schneider et al. 1966, Poznanskaya et al. 1977). In permeabilisierten *K. pneumonia*-Zellen (in situ) kann das Enzym nach erfolgter Inaktivierung durch den Austausch mit Enzym nebst intaktem Coenzym-B12, sowie unter Präsenz von Magnesiumionen und ATP zügig reaktiviert werden (Honda et al. 1980, Ushio et al. 1982). Auch Dioldehydrasen (E. C. 4.2.1.28) weisen ebenfalls den besagten mechanismusbasierten Suizideffekt auf (Toraya et al. 1979). Es handelt sich bei Dioldehydrasen um isofunktionale Enzyme, welche durch Enterobakterien zur 1,2-Propandioltransformation verwendet werden (Kaijura et al. 2001).

Der Mechanismus der Glyceroldehydratase sowie dessen Inaktivierung wurden erstmals durch Toraya et al. 1977b beschrieben. In **Abbildung 4** werden Mechanismus und Inaktivierung in ihren Einzelschritten zusammengefasst.

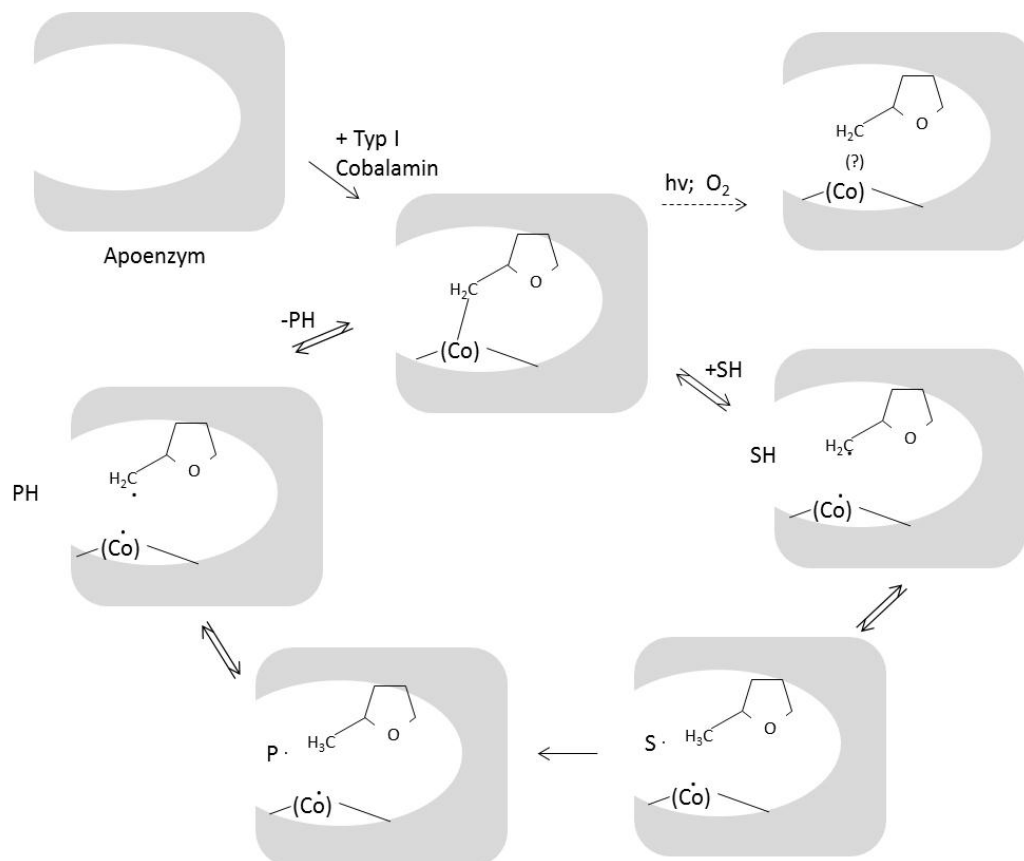


Abbildung 4: Mechanismus und Inaktivierung der Glyceroldehydratase.

Eigene Darstellung, angelehnt an Toraya et al. 1977b.

SH = Substrat, PH = Produkt, S \cdot = Substratradikal, P \cdot = Produktradikal.

Zunächst liegt die Glyceroldehydratase als Apoenzym ohne Coenzym-B12 vor. Durch intrazelluläre Diffusion gelangt Coenzym-B12 (in **Abbildung 4** als Typ-1-Cobalamin bezeichnet) in das aktive Zentrum der Glyceroldehydratase. Hierzu ist zunächst weder ein Kofaktor oder Hilfsenzym, noch der Aufwand von Energie notwendig. Nach der korrekten, energetisch günstigsten Einlagerung des Coenzym-B12 in das Enzym liegt dieses in seiner aktiven Form vor.

Ebenfalls durch Diffusion gelangt das Substrat Glycerol (SH) in das aktive Zentrum des Enzyms. Hier wird eine kovalente Bindung des Coenzym-B12 durch das Substrat aufgebrochen, sodass diese nun in Radikalen vorliegt. Durch eine konzertierte Elektronenbewegung wird das Substratradikal Glycerol (S \cdot) schrittweise zum Produktradikal, nämlich der hydratisierten Form von 3-Hydroxypropionaldehyd (P \cdot) umgewandelt. Die Irreversibilität dieses Teilreaktionsschrittes verleiht der gesamten enzymatischen Dehydratisierungsreaktion ihren irreversiblen Charakter. Die

Glyceroldehydratase ist somit nur in der Lage, Glycerol zu 3-Hydroxypropionaldehyd zu transformieren, nicht aber die Rückreaktion zu realisieren.

Das enzymatische Produkt, die hydratisierte Form von 3-Hydroxypropionaldehyd, zerfällt nun aufgrund eines zugrunde liegenden chemischen Gleichgewichtes zu 3-Hydroxypropionaldehyd und Wasser. Bei lokal geringen Konzentrationen liegt dieses chemische Gleichgewicht zu mehr als 99% auf Seiten der reinen Form von 3-Hydroxypropionaldehyd (Vollenweider et al. 2001). Das Produkt diffundiert nun aus dem aktiven Zentrum des Enzyms in das umgebende Medium.

Durch unterschiedliche Faktoren kann es jedoch zu einer unerwünschten Aktivierung der kovalenten Bindung im Coenzym-B12-Molekül kommen. Diese Faktoren können Licht (Anregung durch Schwingung), Sauerstoff (Radikalträger) sowie hochaktives Intermediat in Form eines 3-Hydroxypropionaldehydradikals (vgl. P[•] in **Abbildung 4**) sein. In diesem Fall kommt es zu unerwünschten konzertierten Elektronenbewegungen innerhalb des Coenzym-B12-Moleküls, welche in der Ausbildung einer kovalenten Bindung an beliebiger Position resultiert, in **Abbildung 4** dargestellt durch (?). Diese neue kovalente Bindung an einer völlig neuen Position kann nun nicht mehr durch heran diffundierendes Substrat (SH) aktiviert werden, das Enzym ist somit irreversibel und vollständig inaktiviert (vgl. **Abschnitt 2.2.2**).

In vivo kann die inaktivierte Glyceroldehydratase mittels Magnesium sowie dem entsprechenden GDHt-Reaktivierungsfaktor (GDHt-RF) reaktiviert werden (Honda et al. 1980, Ushio et al. 1982). Kajiura et al. (2001) schlagen hierzu folgenden zweistufigen Reaktivierungsmechanismus vor, welcher in **Abbildung 5** dargestellt ist.

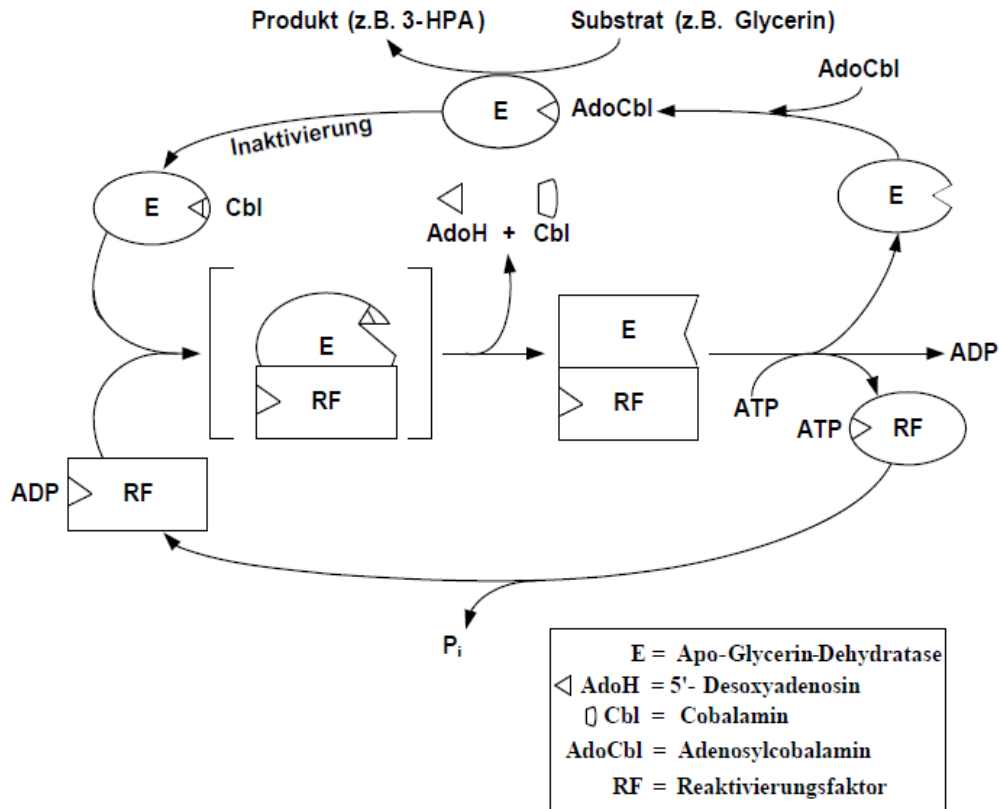


Abbildung 5: Vorgeschlagener, zweistufiger Mechanismus zur Reaktivierung der GDHt durch einen Reaktivierungsfaktor (nach Kajjura et al. 2001, Abbildung entnommen aus Ulmer 2009).

Im Falle einer irreversiblen Inaktivierung des Coenzym-B12-Moleküls durch eine unerwünschte, intramolekulare Radikalreaktion, bindet der Reaktivierungsfaktor (in **Abbildung 5** als RF bezeichnet) ohne zellulären Energieaufwand an das Enzym E. Diese Bindung bewirkt eine Konformationsänderung, sodass das beschädigte Coenzym-B12-Fragment heraus diffundieren kann und im Folgenden von der Zelle abgebaut wird. Das darauf folgende Loslösen des Reaktivierungsfaktors benötigt Energie in Form von ATP. Durch Diffusion gelangt nun ein frisches Coenzym-B12-Molekül in das aktive Zentrum des Enzyms, sodass die Glyceroldehydratase erneut aktiv vorliegt.

2.4 Wasserstoffhydrogenase als NADPH-Regenerationsenzym

Allgemeine Eigenschaften der Wasserstoffhydrogenase I (E.C. 1.18.99.1, H₂ase) aus *P. furiosus* werden im Kapitel Material und Methoden beschrieben (vgl. Abschnitt 3.2.4). Die im Folgenden beschriebenen theoretischen Grundlagen beziehen sich lediglich auf den Aspekt der NADPH-Regeneration mittels der H₂ase. Die Grundproblematik stellt hierbei nach der Verwendbarkeit des hyperthermophilen Enzyms bei Raumtemperatur dar. Ihre hohe spezifische Aktivität von 34U/mg entfaltet sie bei einer optimalen Reaktionstemperatur von 85°C (Adams et al. 2001, Adams et al. 1988, Vignais et al. 2007). Da bei solchen Temperaturen eine entsprechende NADPH-Stabilität nicht gewährleistet ist, muss die H₂ase bei moderaten Temperaturen im Prozess verwendet werden. Mertens et al. (2003) konnten in diversen Experimenten bei einer verwendeten Betriebstemperatur von 37–40°C immerhin noch eine Basisaktivität von 1,55U/mg verzeichnen (van Haaster et al. 2007, Mertens et al. 2003). Auch die grundsätzliche Einsetzbarkeit des Enzyms als NADPH-Regenerationsfaktor wurde in dieser Arbeit bestätigt. Mertens et al. entwickelten hier einen Produktionsprozess NADPH aus NADP mittels Reduktion durch gelösten Wasserstoff bei 40°C. Dabei blieb das Enzym für einen Zeitraum von über 57h aktiv, ohne signifikante Aktivitätsänderungen aufzuweisen. Eine Halbwertszeit der spezifischen Aktivität bei dieser moderaten Temperatur von 208h wurde ermittelt. Aufgrund dieser Bedingungen konnte durch Mertens et al. (2003) ein wiederholender Batchmodus (Repetitive Batch Mode) mit acht aufeinander folgenden Zyklen angewandt werden. Wechselzahlen von bis zu 44h⁻¹ wurden erreicht (Wechselzahl: Mol Substrat transformiert durch Mol Enzym).

Mertens et al. erachten die thermophile Wasserstoffhydrogenase als ein hervorragendes Instrument zur enzymatischen NADP-Reduktion. Der thermophile Charakter stellt hierbei keinen Nachteil, sondern einen entscheidenden Vorteil bezüglich der Langzeitstabilität des Enzyms und somit des Prozesses dar: Wie viele thermophile Enzyme ist die Wasserstoffhydrogenase bei Raumtemperatur ungewöhnlich stabil, verglichen mit mesophilen Enzymen; ihre spezifische Aktivität ist unter entsprechenden Bedingungen ausreichend hoch.

3 Material und Methoden

Im vorliegenden Kapitel 3 werden verwendetes Material und angewandte Methoden beschrieben. Das Kapitel beschreibt kurz die verwendeten Mikroorganismen, Chemikalien und Enzyme, sowie deren Produktion, Darstellung und Aufreinigung. Ferner wird das experimentelle Vorgehen bezüglich Konzeption und Realisierung des synthetischen Produktionsverfahrens für 1,3-PDO skizziert.

3.1 Mikroorganismen

3.1.1 *Lactobacillus reuteri*

Lactobacillus reuteri (DSM 17938) wurde in der vorliegenden Arbeit zwecks Biomassegewinnung in einem Maßstab von bis zu 30L anaerob kultiviert, um die Glyceroldehydrataseaktivität (GDHt-Aktivität) des zellfreien Extrakts zu nutzen, welche Anwendung in dem hier entwickelten enzymatischen Produktionsprozess findet. Im Gegensatz zu Klebsiellen weisen Lactobazillen keine Glyceroldehydrogenaseaktivität (GDH-Aktivität) auf, sodass die Glyceroldehydratase GDHt das einzige glyceroltransformierende Enzym des Organismus ist. Dies war für die Entwicklung der synthetischen Stoffwechselwege von essentieller Bedeutung, da somit zellfreier Extrakt zur Glycerolkonversion eingesetzt werden konnte, ohne dabei Glycerol in unerwünschte Nebenprodukte zu transformieren. Eine derartige Transformation ohne Nebenproduktbildung war auf Basis von zellfreiem Extrakt von *Klebsiella pneumonia* nicht möglich.

3.1.2 *Klebsiella pneumonia*

Auch *Klebsiella pneumonia* (DSM 2606) wurde in der vorliegenden Arbeit zur Biomassegenerierung anaerob kultiviert, ebenfalls um die Glyceroldehydrataseaktivität (GDHt-Aktivität) des zellfreien Extrakts zu nutzen. Da es sich bei Klebsiellen um humanpathogene Organismen der Sicherheitsstufe 2 handelt, wurden diese ausschließlich in entsprechenden Laboren kultiviert und verarbeitet. Im Gegensatz zu Lactobazillen weisen Klebsiellen jedoch neben der GDHt-Aktivität auch

Glyceroldehydrogenaseaktivität (GDH-Aktivität) auf, sodass eine parallele Glyceroltransformation zu beobachten ist (vgl. **Abbildung 6**).

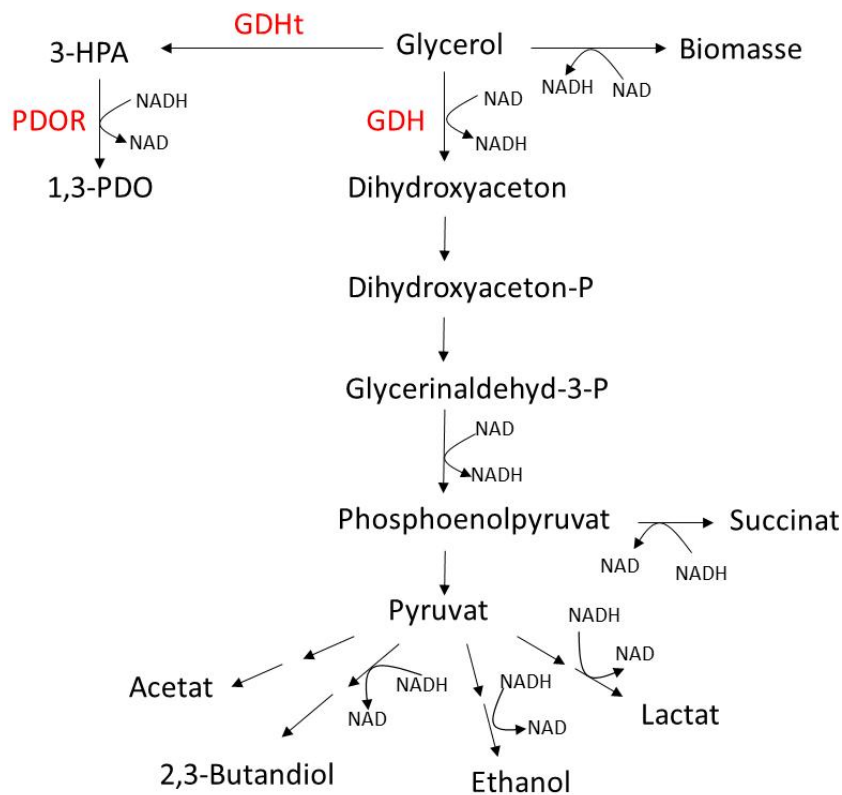


Abbildung 6: Glycerolstoffwechselwege von *Klebsiellen*, vereinfacht, Fokus auf NAD(H)-Nettoumsatz. Zu erkennen ist die Möglichkeit zur parallelen Glyceroltransformation in einem reduktiven (mittels GDH) und einem oxidativen (GDHt) Stoffwechselweg (Eigene Darstellung in Anlehnung an Biebl et al. 1999 und Zhang et al. 2009).

3.1.3 *Escherichia coli*

Der gängigste Modellorganismus der Biotechnologie, *Escherichia coli*, wird in der vorliegenden Arbeit in mehrfacher Hinsicht verwendet:

1. Als sogenannter *cloning host* (*E. coli* DH5a), in welchem konstruierte Vektoren in hohen Anzahlen identischer Kopien repliziert werden können.
2. Als *expression host* (*E. coli* BL21), in welchem die IPTG-induzierte Enzymexpression aufgrund von zusätzlich eingefügter Vektoren mit vervollständigender tRNA-Information besonders gut gelingt.

3. Als Quelle für genomische DNA (*E. coli* BL21) zur Amplifikation des Zielgens *yqhD*, welches die Information des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym trägt.

3.1.4 *Pyrococcus furiosus*

Das Archaeon *Pyrococcus furiosus* wurde erstmalig aus heißen Quellen der italienischen Insel Vulcano isoliert (Fiala et al. 1986). Phylogenetisch ist es eng mit der Gattung der Thermococcen verwandt und gehört mit ihnen gemeinsam zu der Familie der Thermococcaceae.

Bei *P. furiosus* handelt es sich um einen strikt anaeroben, heterotroph lebenden Mikroorganismus mit einem Durchmesser von ca. 2 μm .

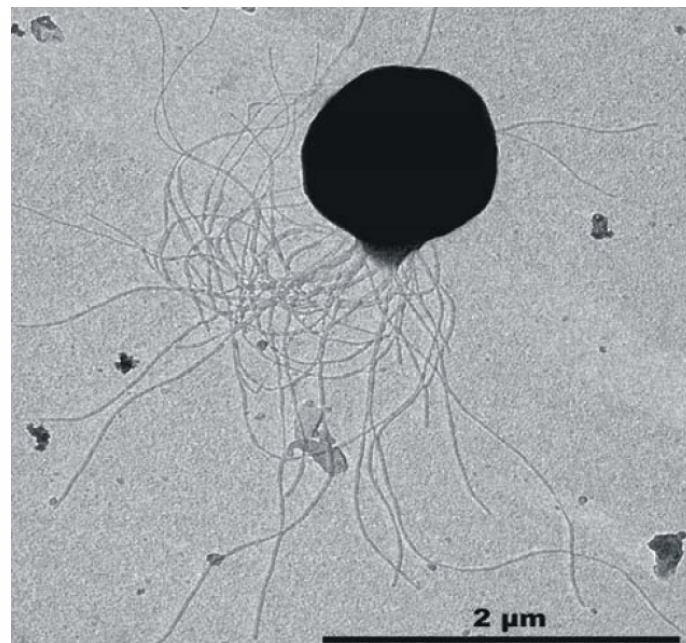


Abbildung 7: *P. furiosus* (Näther 2007).

Unter optimalen Wachstumsbedingungen von 90°C, pH 6,5 und relativ hohen Salzkonzentrationen kann nach Biller et al. (2002) ein μ_{max} von 0,32 h^{-1} erreicht werden. Wie bei vielen marinen Mikroorganismen können hohe *P. furiosus*-Zelldichten nur unter erheblichem verfahrenstechnischen Aufwand erreicht werden (Krahe 1998, Kube 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde *P. furiosus* (DSM 3638) zwecks Biomassegewinnung in einem Maßstab von bis zu 300L anaerob kultiviert, um die Wasserstoffhydrogenase I des Archaeons zu isolieren, welche Anwendung in dem hier entwickelten enzymatischen Produktionsprozess findet.

3.2 Enzyme

3.2.1 Glyceroldehydratase

Die Glyceroldehydratase (GDHt, E.C. 4.2.1.30) katalysiert vorwiegend die Reaktion von Glycerol zu 3-Hydroxipropionaldehyd (3-HPA) unter Abspaltung von Wasser, kann jedoch darüber hinaus auch die Reaktion von 1,2-Propandiol zu Propanaldehyd und 1,2-Ethandiol zu Acetaldehyd katalysieren.

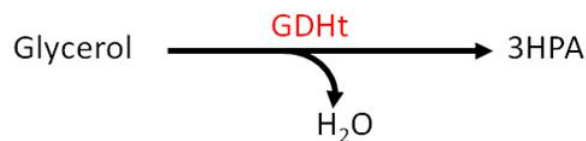


Abbildung 8: Katalytische Reaktion der Glyceroldehydratase.

Vor allem die katalytische Aktivität der GDHt mit 1,2-Propandiol wird sich im Allgemeinen für Enzymaktivitätstests zu Nutze gemacht, da weder Substrat, noch Produkt einen aktivitätshemmenden Einfluss auf das in der Regel Coenzym-B12-abhängige Enzym ausüben (Toraya et al. 1977a). Glycerol und vor allem dessen katalytisches Produkt 3-Hydroxipropionaldehyd weisen dagegen *in vitro* einen stark aktivitätsinhibierenden Charakter auf (Schneider und Pawelkiewicz, 1966; Toraya et al. 1976; Poznanskaya et al. 1977; Bachovchin et al. 1977). Dabei ist eine Reaktivierung der GDHt durch Zugabe von Mg²⁺/Mn²⁺, ATP und Adenosylcobalamin (Coenzym B12) *in situ* (durch Toluol permeabilisierte Zellen) möglich.

Auch durch Sauerstoff wird die GDHt irreversibel inaktiviert (Schneider et al. 1970, Poznanskaya und Yakusheva 1979).

Bezüglich der Reaktivierung werden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen (vgl. **Abschnitt 2.3**). Bei der Reaktivierung mit Mg²⁺, ATP und Adenosylcobalamin (Coenzym B12) *in situ* wird das Coenzym vollständig aus dem Apoenzym gelöst. Ferner ist neben den genannten Faktoren ein Reaktivierungsfaktor GDHt-RF notwendig (Kajiura et al. 2001, Tombimastu et al. 1999). In Gegenwart von ATP, Mg²⁺ und Coenzym B12 vermittelt dieser den Austausch von enzymgebundenem Cobalamin mit freiem Adenosylcobalamin.

Clostridien enthalten nach Sarcabl et al. (2001) und Raynaud et al. (2003) Coenzym-B12-unabhängige GDHts, wobei auch diese *in vitro* durch die beschriebenen Faktoren

inaktiviert werden (Ulmer 2009). Statt der Coenzym-B12-Abhängigkeit liegt hier eine S-Adenosyl-Methionin-Abhängigkeit vor. In der vorliegenden Arbeit wurden aus ökonomischen Gründen lediglich verschiedene Coenzym-B12-abhängige GDHs verwendet, da der Marktpreis für den Kofaktor Coenzym-B12 wesentlich niedriger liegt, als jener für S-Adenosyl-Methionin.

3.2.2 Propandioloxidoreduktase-Isoenzym

Das Propandioloxidoreduktase-Isoenzym (PDORI, E.C. 1.1.1.2) aus *E. coli* ist eine nicht-spezifische, NADPH-abhängige Aldehydreduktase und wird durch die Gensequenz *yqhD* codiert. Eine ganze Reihe an kurzkettigen Alkoholen, wie Butyraldehyd, Glyceraldehyd, Isobutyraldehyd und Propanaldehyd, etc. (Perez et al. 2008, Lee et al. 2010, Atsumi et al. 2010, Miller et al. 2009, Li et al. 2008), können als Substrate verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wird die PDORI als Reduktase für 3-Hydroxipropionaldehyd (3-HPA) genutzt, welches unter NADPH-Oxidation zu 1,3-PDO reduziert (Jarboe et al. 2011).

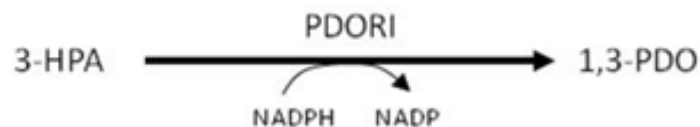


Abbildung 9: Oxidoreduktion von 3-HPA und NADPH zu 1,3-PDO und NADP , katalysiert durch das Propandioloxidoreduktase-Isoenzym.

Wie bei den meisten Oxidoreduktasen kann auch hier beobachtet werden, dass die Reaktion auch reversibel ablaufen kann. Dieser Sachverhalt wird sich insbesondere bei allgemeinen Aktivitätsnachweisen zu Nutze gemacht (Forage et al. 1982, Zhu et al. 2009), wobei 1,3-PDO als Substrat verwendet wird, da 3-HPA kommerziell nicht erhältlich ist.

Im natürlichen Organismus *E. coli* fungiert das PDORI als Schutzmechanismus gegenüber den bereits erwähnten toxischen Aldehyden, welche im Allgemeinen durch Peroxidation von Fettsäuren intrazellulär gebildet werden (Lee et al. 2010). Durch gezielte Ausschaltung des Gens *yqhD* kann gezeigt werden, dass sich die

Wachstumssensitivität des Organismus gegenüber der entsprechenden Alkohole und Aldehyde erhöht (Perez et al. 2008).

Für oben abgebildete Reaktion wurde bezüglich 3-HPA durch Li et al. (2008) ein K_M von 17 mM und ein k_{cat} von $2,2 \cdot 10^{-3}$ ermittelt. Die K_M für NADPH in der entsprechenden Reaktion wurde mit 0,008 mM bestimmt (37°C, pH7). Die Struktur des Enzyms ist ebenfalls bereits aufgeklärt. Als zentrales Ion wurde ein Zinkatom im aktiven Zentrum des Homodimers detektiert. Auf einem Agarosegel erscheint das denaturierte Enzym als einzelne Bande bei ca. 40kDa.

3.2.3 Glukose-6-Phosphatdehydrogenase

Die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G6P-DH, E.C. 1.1.1.49), auch Glukose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase, katalysiert die NADP-abhängige Reaktion von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphoglukonat.



Abbildung 10: NADP-abhängige Reaktion von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphoglukonat, katalysiert durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase.

Als Teil des natürlichen Pentosephosphatstoffwechselweges ist es das einzige in der vorliegenden Arbeit verwendete Enzym, das kommerziell erhältlich ist und nicht zuvor aus den entsprechenden Organismus isoliert werden musste. Die Oxidoreduktase liegt als Homodimer vor, deren denaturierte Untereinheiten auf einem Agarosegel bei ca. 59kDa sichtbar sind.

Im synthetischen 1,3PDO-Produktionsprozess kann es, so wie auch die Wasserstoffhydrogenase, als kofaktorregenerierendes Enzym eingesetzt werden. Da es im Gegensatz zur Wasserstoffhydrogenase kommerziell erhältlich ist, bildet es also eine technisch leichter zu realisierende Alternative zur Kofaktorregeneration, die hier jedoch nur als vorläufiges Modellsystem betrachtet wird.

3.2.4 Wasserstoffhydrogenase

Die Wasserstoffhydrogenase I (E.C. 1.18.99.1, in der vorliegenden Arbeit mit H₂ase bezeichnet) aus *P. furiosus* stellt eine im Cytoplasma gelöste Wasserstoffhydrogenase dar. Als Nickel-Eisen-Hydrogenase ([NiFe]- H₂ase) reduziert sie NADP unter Wasserstoffaufnahme zu NADPH. Da sie bidirektional fungiert, kann die reverse Reaktion abhängig vom thermodynamischen Gleichgewicht ebenfalls durchgeführt werden. Ihre spezifische Aktivität von 34U/mg entfaltet sie bei einer optimalen Reaktionstemperatur von 85°C, wobei sie eine hohe Thermostabilität aufweist (Adams et al. 2001, Adams et al. 1988, Vignais et al. 2007).

Bei der in den Experimenten der vorliegenden Arbeit verwendete Betriebstemperatur von 37–40°C ist immerhin noch eine Basisaktivität von 1,55U/mg zu verzeichnen (van Haaster et al. 2007, Mertens et al. 2003). Bereits in früheren Arbeiten wurde diese partiell aufgereinigte H₂ase erfolgreich in technischen NADPH-Produktionssystemen in Temperaturbereichen von 37-40°C angewendet (Mertens et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit soll die H₂ase dem enzymatischen Produktionsprozess für 1,3-PDO kontinuierlich NADPH zur Verfügung stellen, welches aus gelöstem Wasserstoff und NADP katalytisch generiert wird.

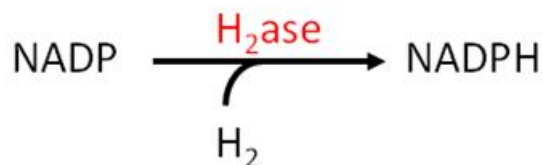


Abbildung 11: NADP-Reduktionsreaktion unter Wasserstoffaufnahme der Wasserstoffhydrogenase I aus *P. furiosus*.

3.3 Stoffwechselprodukte des 1,3-Propandiolsynthesewegs

Abbildung 12 fasst die Stoffwechselintermediate und –produkte des enzymatischen 1,3-PDO-Syntheseweges zusammen. Es handelt sich um sechs verschiedene Komponenten (Glycerol, Wasser (H₂O), 3-Hydroxipropionaldehyd (3-HPA), 1,3-PDO (1,3-PDO), Nicotinamidadenindinukleotidphosphat und dessen reduzierte Form (NADP/NADPH). Ergänzt wird der synthetische Produktionsprozess durch das

Kofaktorregenerierungssystem, in welchem ferner die Komponenten Glukose-6-phosphat (G6P), 6-Phosphoglukonat (6PG) bzw. Wasserstoff (H_2).

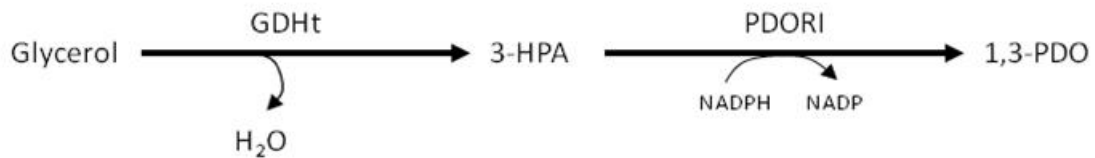


Abbildung 12: Stoffwechselprodukte und Enzyme des synthetischen PDO-Produktionsweges (ohne Kofaktorregenerierungssystem).

Die Eigenschaften der Stoffwechselprodukte werden im Folgenden kurz erläutert.

3.3.1 Glycerin

Glycerin (Glycerol, 1,2,3-Propantriol, Propantriol), mit der Summenformel $C_3H_8O_3$ ist ein dreiwertiger Alkohol. Es weist eine molare Masse von 92,10 g/mol auf und ist mit einer Dichte von $1,26\text{g/cm}^3$ deutlich dichter als Wasser. Bei Raumtemperatur ist Glycerin eine farb- und geruchslose, viskose und hygroskopische Flüssigkeit, die süßlich schmeckt. Heutzutage fällt Glycerin als Nebenprodukt vieler chemischer und pharmazeutischer Produktionsprozesse an und stellt daher einen preiswerten und leicht zugänglichen Rohstoff dar. Es ist in hoher Reinheit kommerziell erhältlich.

3.3.2 3-Hydroxypropionaldehyd

3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA), in rationaler Nomenklatur 3-Hydroxypropanal, mit der Summenformel $C_3H_6O_2$ ist ein Aldehyd. Die CAS-Nummer lautet 2134-29-4. In der vorliegenden Arbeit dient es dem Propandioloxidoreduktase-Isoenzym als Substrat für die NADPH-abhängige 1,3-Propandiolproduktion. 3-HPA bildet in wässriger Lösung ein dynamisches Gleichgewichtsgemisch. Nach Vollenweider et al. (2003) stehen bei neutralem pH-Wert und 20°C 3-HPA, hydratisierter 3-HPA (1,1,3-Trihydroxypropan) und cyclischer 3-HPA (2-(2-Hydroxyethyl)-4-hydroxy-1,3-dioxan) im Gleichgewicht:

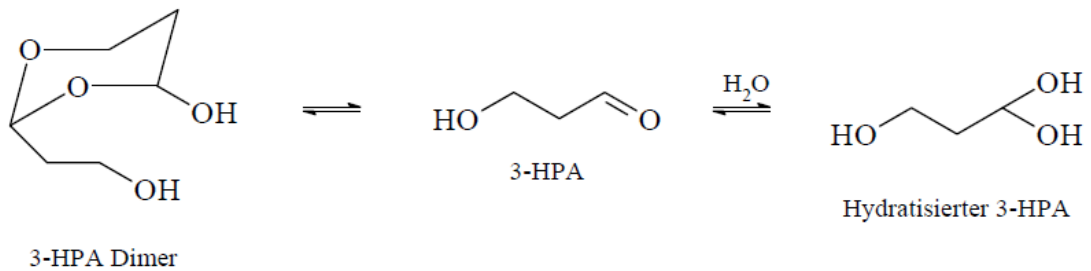


Abbildung 13: Vollenweider et al. 2003: Dynamisches Gleichgewicht 3HPA und dessen Derivate.

Dieses Gleichgewicht kann bei neutralem pH als eine Funktion der Molfraktion über der 3-HPA-Konzentration in Wasser dargestellt werden:

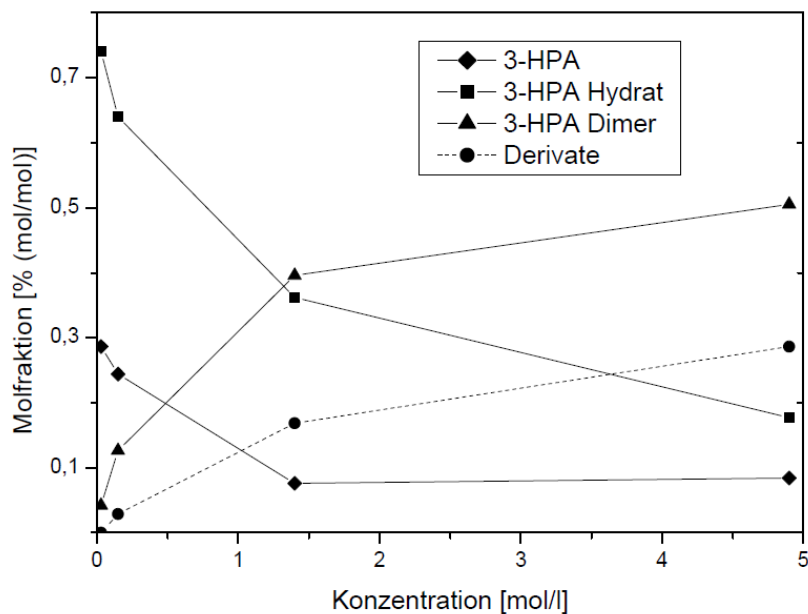


Abbildung 14: Konzentrationsabhängigkeit der Gleichgewichtszusammensetzung von 3HPA und dessen Derivate (Vollenweider et al. 2003).

3-HPA musste in der vorliegenden Arbeit chemisch synthetisiert werden, da es nicht kommerziell erhältlich ist. Dazu wurden 75mL 92%iges Acrolein mit 100mL 1,5M Schwefelsäure und 325mL Wasser versetzt und für 2h bei 50°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf ca. 0°C gekühlt, mit Hepes (finale Konzentration: 50mM) versetzt, und der pH mit 5M NaOH auf 6,8 eingestellt. Das Produkt enthielt ca. 95% 3-HPA und dessen Derivate mit Resten an nicht reagiertem Acrolein, das mittels Chloroform extrahiert werden konnte.

Der Nachweis der 3-HPA-Konzentration erfolgte über eine Farbreaktion mit Tryptophan (Tryptophantest nach Cirle et al. 1945). Dazu wurden 250µL Probe mit 500µL 37%iger HCl und 125µL Tryptophanlösung (Cirle et al. 1945) versetzt und

40min bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion wurde anschließend bei 560nm photometrisch analysiert und die 3-HPA-Konzentration mittels zuvor aufgenommener Kalibriergerade errechnet. Die entsprechende Kalibriergerade ist in der folgenden **Abbildung 15** dargestellt:

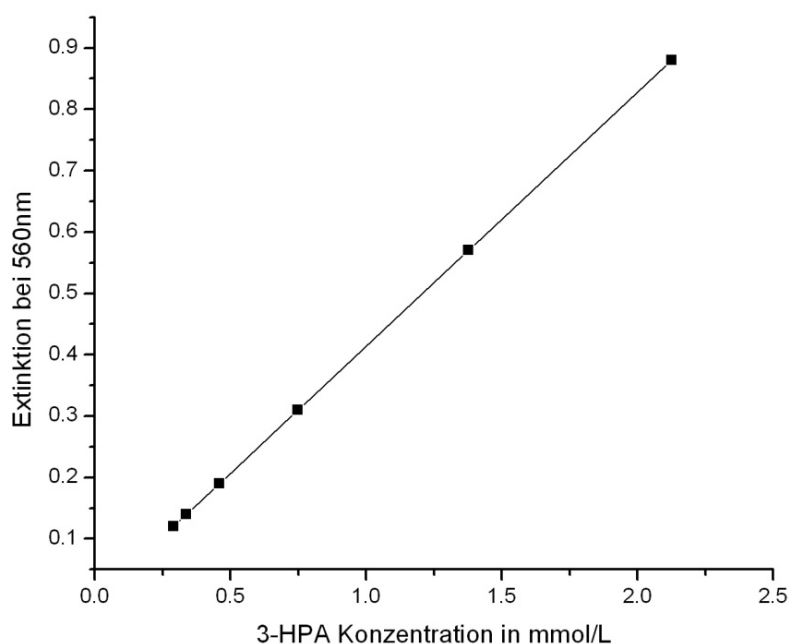


Abbildung 15: Kalibriergerade Extinktion über 3-HPA Konzentration.

Direkt nach der Synthese enthielt die wässrige Phase nach Acroleinextraktion mittels Chloroform 2,09M 3-HPA. Die Lösung wies bezüglich der 3-HPA-Konzentration bei Lagerung bei 4°C eine Halbwertszeit von ca. fünf Tagen auf. Es ist anzunehmen, dass 3-HPA mit der Zeit polymerisiert und ausfällt (Ulmer 2009), was zur Abnahme der 3-HPA-Monomerkonzentration führt. Um die katalytische Aktivität des PDORI zu verifizieren, wurde stets mit frischer 3HPA-Lösung gearbeitet, die weniger als 12 Stunden alt war.

3.3.3 1,3-Propandiol

1,3-Propandiol (PDO, Propan-1,3-diol, Trimethylenglycol, 1,3-Dihydroxypropan) mit der Summenformel $C_3H_8O_2$ besitzt eine molare Masse von 76g/mol und ist mit einer Dichte von $1,05\text{g/cm}^3$ geringfügig dichter als Wasser. Es besteht aus dem Grundgerüst

des Propans an dessen terminalen Positionen sich jeweils eine Hydroxylgruppe auffindet. 1,3-PDO gehört zu den zweiwertigen Alkoholen. Es handelt sich um eine farblose Flüssigkeit mit nur schwachem Eigengeruch. Anwendung findet es als Massenchemikalie vor allem in der chemischen Industrie als chemische Schutzgruppe und als Zwischenprodukt zur chemischen Weiterverarbeitung. Es ist in hoher Reinheit kommerziell erhältlich.

3.3.4 Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

In dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten 1,3PDO-Syntheseweg fungiert Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) in der zweiten Prozessstufe als hydridionenübertragendes Koenzym (Übertragung eines Protons und zweier Elektronen). Kommerziell erhältlich liegt es als farbloser, hygroskopischer amorpher Feststoff vor.

Wie alle Coenzyme unterliegt auch NADP in technischen Reaktorsystemen (in vitro) einer begrenzten Halbwertszeit. Während in einer lebenden Zelle (in vivo) degradiertes NADP vollständig abgebaut und parallel frisches NADP generiert wird, kann in einem synthetischen Prozess degradiertes NADP nur durch externe Zufuhr ersetzt werden. Daher ist das Wissen um die Degradationseffekte, hervorgerufen durch verschiedenen Bedingungen im Medium, von hoher Bedeutung. Vor allem die reduzierte Form NADPH unterliegt bei niedrigen pH-Werten und hohen Temperaturen einer geringen Halbwertszeit. Wu et al. (1987) untersuchte NADP und dessen reduzierte Form eingehend auf temperatur- und pH-abhängige Stabilität. In der folgenden **Tabelle 1** werden die Halbwertszeiten von NADPH bei verschiedenen pH-Werten zusammengefasst:

Tabelle 1: pH-wertabhängige Halbwertszeiten von NADPH bei 30°C (Wu et al. 1987).

pH	Halbwertszeit [min]	
3,0	2,7	
5,0	38	
6,0	141	(ca. 2,5 Stunden)
7,0	517	(ca. 9 Stunden)
9,0	25500	(ca. 17 Tage)

Aus der vorliegenden **Tabelle 1** ist der Trend der steigenden Stabilität mit steigendem pH-Wert klar zu erkennen. Im basischen Milieu liegt somit eine relativ hohe Stabilität vor. Ferner werden in der folgenden **Tabelle 2** die Halbwertszeiten von NADPH bei verschiedenen Temperaturen bei pH6,0 zusammengefasst.

Tabelle 2: Temperaturabhängige Halbwertszeiten von NADPH bei pH6,0 (Wu et al. 1987).

Temperatur [°C]	Halbwertszeit [min]	
19	525	(ca. 9 Stunden)
30	141	(ca. 2,5 Stunden)
41	55	(ca. 1 Stunde)

Auch hier ist der Trend der steigenden Stabilität mit sinkender Temperatur klar zu erkennen. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass die Daten in leicht saurem Milieu bei einem pH-Wert von 6,0 erhoben wurden. Im basischen Milieu ist von wesentlich höheren Stabilitäten bei den betrachteten Temperaturen auszugehen.

3.4 Molekularbiologische Methoden zur Vektor- und Stammkonstruktion

Als Expressionssystem für das Enzym PDORI wurde ein pET15b-Expressionsvektor konstruiert, welcher die Sequenz von *YqhD* nebst N-terminalen His-Tag enthielt. Durch den dem *YqhD*-Gen vorgeschalteten lac-Promotor konnte die Enzymexpression in *E. coli* BL21 mittels IPTG-Induktion manuell eingeleitet werden. Das Expressionssystem wurde durch die im Folgenden dargestellten Schritte generiert.

3.4.1 Genamplifikation mittels PCR

Mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) und folgender Primer (bereitgestellt durch Fa. Invitrogen) wurde das Zielgen *YqhD* aus genomischer *E. coli*-DNA amplifiziert:

Forward: CTG ACT CGA GAT GAA CAA CTT TAA TCT GCA CAC C

Reverse: ATA TGG ATC CTT AGC GGG CGG CTT CGT ATA T

Genutzt wurde ein PCR-Cycler der Firma VWR (Seriennummer: 1210-0363). Die Amplifikationszyklen beliefen sich auf 95°C für 5 min, gefolgt von 30 Zyklen bei 95°C für 30 Sekunden, 55°C für 30 Sekunden, 72°C für 90 Sekunden, und endeten in einem Extensionsschritt von 72°C für 10min. Der PCR-Ansatz bestand aus 1ng Template, je 200mM dNTP, je 20mM Primer (s.o.) 2,5µL *Pfu*-Polymerasepuffer und 0,3µL *Pfu*-Polymerase. Das PCR-Produkt wurde auf ein 1%iges Agarosegel geladen und nach entsprechender Sybergreenfärbung aus dem Gel geschnitten, um das Amplifikat von nicht amplifizierter DNA zu isolieren. Anschließend wurde es mit Restriktionsenzymen XhoI und BamHI geschnitten, um es für die Ligation mit dem pET15b-Expressionsvektoren vorzubereiten.

3.4.2 Restriktion und Dephosphorylierung des Expressionsvektors

Der „leere“ Expressionsvektor pET15b wurde aus *E. coli* DH5α mittels eines Plasmidextraktionskits (NucleoSpinPlasmid) der Firma Macherey-Nagel isoliert. Um den Vektor pET15b für die Ligation mit dem PCR-Produkt vorzubereiten, wurde er mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI geschnitten und in eine lineare Form gebracht, anschließend durch eine Dephosphorylierung stabilisiert, welche ein Rezirkulierung des Plasmids verhinderte. Das Produkt der Restriktion und Dephosphorylierung wurde auf ein 1%iges Agarosegel geladen und nach Sybergreenfärbung von nicht geschnittener bzw. nicht dephosphorylierter DNA getrennt.

3.4.3 Ligation

Nach der Restriktion des Zielgenamplikats mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI und der Restriktion und Dephosphorylierung des Expressionsvektors waren nun die Voraussetzungen für die erfolgreiche Ligation geschaffen. Mittels einer Polymerase aus *P. furiosus* (*Pfu*-Polymerase) wurde die Ligation über Nacht bei 4°C durchgeführt.

Parallel dazu ist ein Reaktionsansatz mit beiden DNA-Fragmenten, jedoch ohne Ligase über Nacht inkubiert worden. Beide Ansätze wurden auf einem 1%igem Agarosegel visualisiert.

3.4.4 Transformation

Die Transformation des Ligationsprodukts in *E. coli* DH5 α (cloning-host) und *E. coli* BL 21 (expression-host) wurde mittels Hitzeschock durchgeführt. Nach Ausstreichung auf ampicillinhaltigem Medium wurden einzelne Kolonien ausgewählt und deren Plasmide isoliert und analysiert. Aufgrund der Ampicillinresistenz der ausgewählten Stämme, konnte auf eine erfolgreiche Transformation geschlossen werden. Die Isolation der Plasmide diente der Differenzierung zwischen Transformanten, die einen Vektor mit inseriertem Zielgen besaßen und jenen Transformanten, deren Vektor keine Insertion des Zielgens aufwies.

3.5 Biomasseproduktion rekombinanter *E. coli*-Stämme

Die mikrobielle Enzymproduktion via Kultivierung bzw. Fermentation gestaltete sich in Abhängigkeit des Zielproteins völlig unterschiedlich. Während für rekombinante Enzyme, wie z.B. das PDORI, die Produktion aufgrund starker Überproduktion im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt werden konnte, musste die Produktion natürlicher Enzyme, wie der Wasserstoffhydrogenase, im 30L-Reaktor und 300L-Reaktor vollzogen werden, um ausreichende Mengen an Biomasse zu generieren. Im Folgenden werden die Parameter der Überexpression dargestellt.

3.5.1 Stammhaltung, Medien und Puffer für *E. coli*

Die rekombinanten *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Mediumplatten (Hefeextrakt 5g/L, Pepton 10g/L und NaCl 5g/L, 5% Agarose, 0,1mM Ampicillin) bei 4°C gelagert. Zwecks Kultivierung wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze Zellmaterial entnommen und in Flüssigkultur resuspendiert. Für rekombinante Überexpressionen von Enzymen in *E. coli* wurde einfaches LB-Medium (pH7) genutzt. Es setzte sich

zusammen aus Hefeextrakt (5g/L), Pepton (10g/L) und NaCl (5g/L). Zusätzlich wurden vektorabhängig Antibiotika zugesetzt, z.B. 0,1mM Ampicillin für pET15b-Vektoren.

3.5.2 Expression im Schüttelkolben (*E. coli*)

Nach der Inokulation mit den entsprechenden Mikroorganismen des mit Antibiotika versetzten LB-Mediums wurde der Kolben für einige Stunden bei 37°C und 120rpm inkubiert. Bei einer $OD_{600nm}=0,4$ wurde unter sterilen Bedingungen die Induktion mittels IPTG vollzogen und die Enzymexpression über Nacht bei 20°C und 100rpm durchgeführt. Anschließend folgte die Zellernte.

3.5.3 IPTG-Induktion

Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) ist ein Galactose-Thioglycosid, welches als künstlicher Induktor des Lactose-Operons in *E. coli* verwendet wird. Es wirkt als Aktivator des Lac-Operons, indem es an den Lac-Repressor bindet. Dadurch folgt eine allosterische Konformationsänderung des Repressors, die seine Wechselwirkung mit den Lac-Operatoren inhibiert. IPTG wird im Gegensatz zu Laktose nicht verstoffwechselt.

Zur Induktion der Enzymexpression des IPTG-induzierbaren Vektors pET15b wurde eine finale IPTG-Konzentration von 0,1mM gewählt.

3.6 Biomasseproduktion von *P. furiosus*

3.6.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte in Roti®-Store Kryoröhrchen. Diese wurden mit ca. 500 μ L einer sich in der exponentiellen Phase befindlichen Kultur von *P. furiosus* gefüllt, kurz inkubiert durch vorsichtiges Schütteln, und anschließend vom Überstand befreit. Die Lagerung erfolgte bei -80°C und erwies sich als stabil rekultivierbar über mehrere Jahre. Eine Rekultivierung der *P. furiosus*-Kultur erwies sich als so robust, dass wenige der in

den Roti®-Store Kryoröhrchen enthaltenen Kügelchen ausreichen, um einen 1,5L-Reaktor anzuimpfen.

3.6.2 Medien und Puffer

Für die Kultivierung von *P. furiosus* zur Produktion der natürlichen Wasserstoffhydrogenase, wurde auf ein komplexeres Medium nach Biller et al. (2002) zurückgegriffen. Es setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen (vgl. **Tabelle 3**):

Tabelle 3: Medienzusammensetzung *P. furiosus* nach Biller et al. (2002).

Medium	g/L	
NaCl	30	
KH ₂ PO ₄	1,4	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,3	
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,25	
FeSO ₄ x7H ₂ O	0,035	
CysteinixHCl _x	0,5	
Trypton	1	
Hefeext.	1	
Maltose	6,5	alternativ: Stärke 13g/L
Na ₂ WO ₄ x2H ₂ O	0,0033	
NiCl ₂ x6H ₂ O	0,1	
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,2	
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,05	
CaCl ₂ x2H ₂ O	0,05	
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,05	
Na ₂ SeO ₃ x5H ₂ O	0,005	
MnCl ₂ x4H ₂ O	0,1	

3.6.3 Allgemeine Kultivierungstechniken *P. furiosus*

Grundsätzlich wurde *P. furiosus* bei einem pH-Wert von 6,5 und einer Temperatur von 90°C kultiviert. Hier kamen folgende Kultivierungsvolumina zum Einsatz: 100mL-Anaerobenflaschen, 1,5L-Reaktor, 30L-Reaktor und 300L-Reaktor. Die Inokulation für 100mL-Flaschen und 1,5L-Reaktoren erfolgte ausgehend von den oben beschriebenen Roti®-Store Kryoröhrchen unter der Anaerobenbank. Dazu wurde aus dem vorbereiteten Kultivierungsgefäß (pH6,5, T=90°C, sauerstofffrei) 15mL heißes Medium (s.o.) in ein 15mL-Falkon abgefüllt und sauerstofffrei in die Anaerobenbank eingeschleust. Ein Cryo-Bead aus den Roti®-Store Kryoröhrchen wurde nun in das

15mL-Falkon übertragen, welches verschlossen zum Reaktor/Gefäß transportiert und dessen Inhalt überführt werden konnte. Eine Begasung von 0,4vvm erfolgte für alle Reaktorgrößen. Die optimale Rührerdrehzahl von 1800rpm für den 1,5L-Reaktor, ermittelt durch Krahe (1998), wurde verwendet. Für größere Reaktorvolumina wurde die Drehzahl entsprechend modifiziert unter Beibehaltung eines konstanten volumetrischen Leistungseintrags (siehe Ergebnisteil). Mittels 2M NaOH wurde der pH-Wert auf 6,5 konstant gehalten. Das Wachstum bei 90°C wurde mittels Zellzahlbestimmung, optischer Dichte (OD) und Biotrockenmasse (BTM) dokumentiert und dessen Kinetik ermittelt.

3.6.4 Produktion im 30L-Fermenter (*P. furiosus*)

Zur Biomassegenerierung von *P. furiosus* wurde unter anderem auf die Fermentation im 30L-Reaktor (22L working volume) der Firma Bioengineering zurückgegriffen. Dabei wurden im Wesentlichen die Fermentationsstrategien von Kube (2007), Biller (2002) und Krahe (1998) im vergrößerten Maßstab (Scale-up) reproduziert.

Verwendet wurde ein 30L-Reaktor der Firma Bioengineering mit Scheibenrotor. Über das zugehörige Prozessleitsystem ließen sich Temperatur, pH-Wert, Begasungsrate und Rührgeschwindigkeit automatisch regeln.

Zunächst wurden 20L des entsprechende Mediums (vergleiche Abschnitt Medium 3.5.1) im Reaktor auf 90°C erhitzt, wodurch eine Autoklavierung von Medium und Reaktor nicht erforderlich waren. Eine Begasungsrate von 0,4vvm (75% N₂, 25% CO₂) und eine Rührgeschwindigkeit von 800rpm wurden 30min vor Inokulation angesetzt, um den gelösten Sauerstoff aus dem System zu entfernen. 1mL Antischaummittel Desmophen (Fa. Bayer AG) reduzierten die Schaumentwicklung auf ein Minimum. Eine zuvor anaerob gewachsene Vorkultur (1,5L-Reaktor) diente anschließend als Inokulum. Mittels 2M NaOH wurde der pH-Wert auf 6,5 konstant gehalten. Das Wachstum bei 90°C wurde mittels Zellzahlbestimmung, optischer Dichte (OD) und Biotrockenmasse (BTM) dokumentiert und dessen Kinetik ermittelt. Nach erfolgreicher Kultivierung folgte die Zellernte mittels Contifuge.

3.6.5 Produktion im 300L-Fermenter (*P. furiosus*)

Schließlich kam für eine weitere Steigerung der *P. furiosus* Biomasseerzeugung ein 300L-Reaktor der Firma Bioengineering mit Scheibenrotor zu Einsatz. Über das zugehörige Prozessleitsystem ließen sich wie beim 30L-Reaktor Temperatur, pH-Wert, Begasungsrate und Rührgeschwindigkeit automatisch regeln.

Zunächst wurden 200L des entsprechenden Mediums (vergleich Abschnitt Medium 3.5.1) im Reaktor auf 90°C erhitzt, wodurch eine Autoklavierung von Medium und Reaktor nicht erforderlich war. Eine Begasungsrate von 0,4vvm (75% N₂, 25% CO₂) und eine Rührgeschwindigkeit von 450rpm wurden 30min vor Inokulation angesetzt, um den gelösten Sauerstoff aus dem System zu entfernen. 5mL Antischaummittel Desmophen (Fa. Bayer AG) wurden hinzugegeben. Als Inokulum diente eine für zehn Stunden im 1,5L-Reaktor unter oben genannten Bedingungen fermentierte Kultur, die während der exponentiellen Phase in den 300L-Reaktor überführt wurde. Die Überführung erfolgte durch direkte Schlauchverbindungen zwischen den Reaktoren, sodass eine ungünstige „Fermentationsunterbrechung“ durch Ernte der 1,5L-Kultur und anschließende Inokulation des 300L-Reaktors nicht notwendig war.

Mittels 2M NaOH wurde der pH-Wert auf 6,5 konstant gehalten. Das Wachstum bei 90°C und 450rpm wurde mittels Zellzahlbestimmung, optischer Dichte (OD) und Biotrockenmasse (BTM) dokumentiert und dessen Kinetik ermittelt. Es folgte die Zellernte mittels Separator.

3.7 Biomasseproduktion der Glyceroldehydratase-Systeme

3.7.1 Produktion von *L. reuteri*-Biomasse

Für die Kultivierung von *L. reuteri* zur Biomasseproduktion mit GDHt-Aktivität wurde MRS⁺-Bouillon verwendet (Peng et al. 2002). Diese setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen (vgl. **Tabelle 4**):

Tabelle 4: Medienzusammensetzung zur Kultivierung von *L. reuteri* nach Peng et al. (2002).

Medium	[g/L]
Hefeextrakt	5
Trypton	10
Fleischextrakt	5
K ₂ HPO ₄	2
Ammoniumzitrat	2
Natriumacetat	5
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,1
Mangansulfat	0,05
Glukose	20
Glycerol	5

Zu beachten ist dabei, dass Glukose getrennt von den übrigen Mediumbestandteilen zu autoklavieren war, um die unerwünschte Maillardreaktion zu vermeiden.

Zur Biomassegenerierung von *L. reuteri* wurde auf die Fermentation im 30L-Reaktor (22L working volume) zurückgegriffen. Verwendet wurde auch hier der 30L-Reaktor der Firma Bioengineering mit Scheibenrotor. Über das zugehörige Prozessleitsystem ließen sich Temperatur, pH-Wert, Begasungsrate und Rührgeschwindigkeit automatisch regeln.

Zunächst wurden 20L des entsprechenden Mediums ohne den Glukoseanteil im Reaktor autoklaviert. 1mL Antischaummittel Desmophen (Fa. Bayer AG) reduzierten die Schaumentwicklung auf ein Minimum. Parallel erfolgte die Sterilisation der Glukoselösung im Autoklaven. Nach aseptischer Vereinigung von Glukose und MRS⁺-Boullion diente eine über Nacht anaerob gewachsene Vorkultur (2L Schottflasche) anschließend als Inokulum. Auf das Ausstrippen von Sauerstoff durch Stickstoffbegasung wurde verzichtet, da es sich bei *L. reuteri* um einen fakultativ anaeroben Stamm handelt. Mittels 2M NaOH wurde der pH-Wert auf 5,5 konstant gehalten. Das Wachstum bei 37°C wurde mittels optischer Dichte (OD) dokumentiert. Nach erfolgreicher Kultivierung folgte die Zellernte mittels Contifuge (s.u.).

3.7.2 Produktion von *K. pneumonia*-Biomasse

K. pneumonia wurde in anaeroben Flaschen (100mL) bei 37°C und pH7,0 für 24h kultiviert. Verwendung fand dabei ein modifiziertes Medium gemäß Menzel, Zeng und Deckwer (1997). Mit Beendigung der Kultivierung wurde die Kultur unter Sauerstoffausschluss in der Anaerobenbank in die Zentrifugenbecher überführt, diese

luftdicht verschlossen und zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes konnten die geernteten Zellen sauerstofffrei bei -20°C gelagert werden. Die folgende **Tabelle 5** gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des von Sauerstoff befreiten Mediums.

Tabelle 5: Medienzusammensetzung zur anaeroben Kultivierung von *K. pneumonia*.

Medium	Konzentration
KCl	0,75 g/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1,38 g/L
NH ₄ Cl	5,35 g/L
Na ₂ SO ₄	0,28 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,26 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,29 g/L
Zitronensäure ·H ₂ O	0,42 g/L
Hefeextrakt	1,0 g/L
Glycerol	20g/L
ZnCl ₂ ·6H ₂ O	3,4 mg/L
FeCl ₂ ·6H ₂ O	27 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10 mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,85 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,35mg/L
H ₃ BO ₃	0,5 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25mg/L
Desmophen	0,1 ml/L

3.8 Zellernte

Abhängig vom Kultivierungs- bzw. Fermentationsvolumen wurde zur Zellernte entweder eine diskontinuierliche Zentrifuge für Fermentationsvolumina von 200mL bis zu 2L genutzt (*E. coli*, *K. pneumonia*), eine kontinuierliche Zentrifuge (Contifuge) für Fermentationsvolumina von ca. 20L (*L. reuteri*, *P. furiosus*) oder ein Separator für Fermentationsvolumina von ca. 200L (*P. furiosus*) verwendet.

3.8.1 Diskontinuierliche Zellernte mittels Zentrifuge (*E. coli* und *K. pneumonia*)

Diskontinuierlich erfolgte die Zellernte für geringe Fermentationsvolumina von bis zu 2L. Verwendet wurde hierzu eine Zentrifuge der Firma Beckman des Typs J2-HS mit einem Rotor des Typs Beckman, JA-20.1 Fixed Angle Rotor. Ausgestattet mit sechs Einsätzen für Zentrifugenbecher mit einem Fassungsvermögen von je 500mL (empfohlene Füllhöhe 333mL) konnten so bis zu 2L zeitgleich zentrifugiert werden.

Aufgrund dieser geringen Volumenkapazität kam der diskontinuierliche Erntevorgang nur für Expressionssysteme rekombinanter Enzyme zum Einsatz, da hier die Kultivierungsvolumina gering ausfielen.

Die Fermentationsbrühe rekombinanter *E. coli* – Zellen wurde bei 5000rpm für 15min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend in gleichem Volumen TrisHCl-Puffer (pH7,5) resuspendiert. Dabei wurden membrangebundene Salze gelöst und entfernt. Es folgte eine erneute Zentrifugation und Resuspendierung in TrisHCl-Puffer (pH 7,5). Das resuspendierte Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung (z.B. Zellaufschluss) bei -20°C gefroren. Während des Ernteprozesses wurde ein TrisHCl-Puffer (pH7,5) verwendet: (TrisHCl-Puffer für Zellernte: 20mM Tris, pH7,5 mit HCl einstellen).

Nach Beendigung der Kultivierung von *K. pneumonia* wurde die Kultur unter Sauerstoffausschluss innerhalb der Anaerobenbank in Zentrifugenbecher überführt, diese luftdicht verschlossen und diskontinuierlich bei 5000rpm für 15min bei 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes konnten die geernteten *K. pneumonia*-Zellen sauerstofffrei bei -20°C gelagert werden.

3.8.2 Kontinuierliche Zellernte mittels Contifuge (*P. furiosus* und *L. reuteri*)

Kontinuierlich erfolgte die Zellernte für Fermentationsvolumina von ca. 20L. Verwendet wurde hierzu eine Zentrifuge der Firma Beckman des Typs J2-HS mit einem kontinuierlichen Rotor des Typs Beckman JCF-Z *Zonal and Continuous Flow Rotor*. **Abbildung 16** verdeutlicht die verfahrenstechnischen Grundoperationen des Aufbaus zur Ernte einfacher Batch-Fermentationen. Die kontinuierliche Zentrifugation kam sowohl bei der Biomassegewinnung von *P. furiosus*, als auch bei *L. reuteri* zum Einsatz. Bei Erreichung entsprechender Zelldichten der *P. furiosus*-Kultur wurde die 90°C heiße Fermentationsbrühe zunächst durch zwei Wärmetauscher geleitet. Der erste Wärmetauscher wurde mit einem -15°C kalten Ethanol/Eis gekühlt und sorgte für eine rapide Abkühlung der Fermentationsbrühe auf ca. 15°C bis 20°C. Der zweite Wärmetauscher erfuhr Kühlung durch ein 0°C kaltes Wasser/Eis-Gemisch, sodass sich die Temperatur der Fermentationsbrühe beim Durchströmen des zweiten Wärmetauschers langsam der 4°C annäherte. Ein Zufrieren mit einhergehender

Unterbrechung des kontinuierlichen Flusses konnte so ausgeschlossen werden. Eine darauf folgende Pumpe beförderte die Zellsuspension konstant mit einer Durchflussrate von 45L/h in eine angeschlossene Blasenfalle, welche die Pulsation der Pumpe herabsetzte und damit die empfindliche Contifuge entlastete. Darüber hinaus verhinderte die Blasenfalle den Eintrag von Gasblasen in die Contifuge, welche bei 4°C und 20000rpm betrieben wurde.

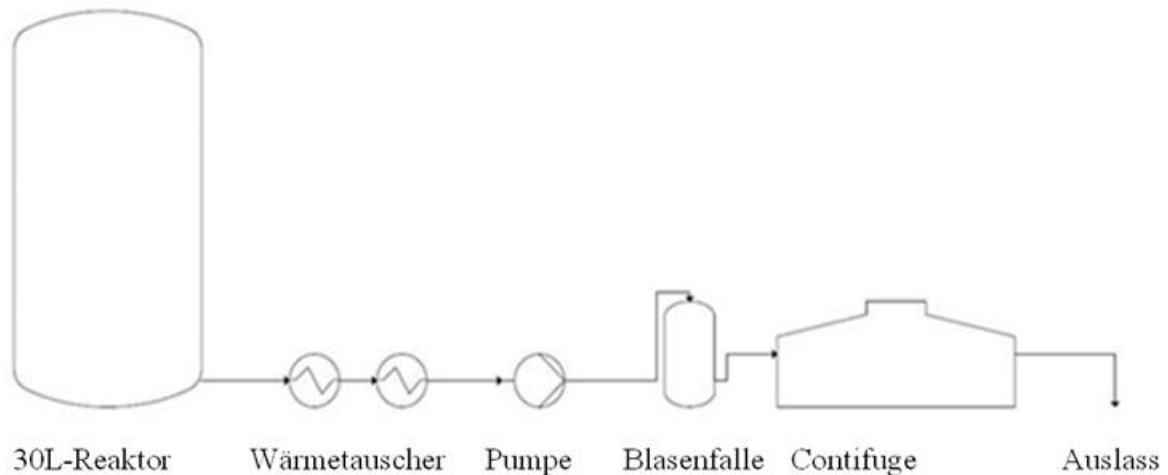


Abbildung 16: Aufbau der Grundoperationen für Ernte mittels Contifuge.

Die maximale Durchflussrate von 45L/h begrenzte das Zeitfenster für die Zellernte auf 30min für 22L Fermentationsbrühe (30L-Reaktor). Messung von Temperatur und OD am Zu- und Ablauf während des gesamten Ernteprozesses verifizierten die fortlaufende Funktionsfähigkeit des Systems. Das in etwas Fermentationsbrühe resuspendierte Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung (z.B. Zellaufschluss) anaerob bei -20°C gelagert.

Die Zellernte von *L. reuteri* verlief nach demselben Schema mit dem Unterschied, dass beide Wärmetauscher einer Temperatur von 0°C ausgesetzt waren (Wasser/Eis-Gemisch), sodass sich die Temperatur der Fermentationsbrühe (ursprünglich 37°C) beim Durchströmen der beiden Wärmetauscher langsam 4°C annäherte.

3.8.3 Kontinuierliche Zellernte mittels Separator

Die Ernte der Fermentationsbrühe des 300L-Reaktors mittels Separator gestaltete sich weniger kompliziert als mittels Contifuge, da sich der Separator als weniger störanfällig

erwies. Zudem konnten wesentlich höhere Durchflussraten erzielt werden (ca. 120L/h). Verwendung fand ein GEA Westfalia Separator des Typs KA6-86-078 mit einem Trommeldurchmesser von 22cm. Diesem wurde ein Wärmetauscher vorgeschaltet, um die 90°C heiße Fermentationsbrühe zu kühlen (Zieltemperatur ca. 18°C), jedoch konnte auf eine Blasenfalle, wie bei der Ernte mittels kontinuierlicher Zentrifuge, verzichtet werden. Messung von Temperatur und OD am Zu- und Ablauf während des gesamten Ernteprozesses verifizierten die fortlaufende Funktionsfähigkeit des Systems. Das in etwas Fermentationsbrühe resuspendierte Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung (z.B. Zellaufschluss) anaerob bei -20°C gelagert.

3.9 Zellaufschluss

Für die Freilegung von intrazellulären Enzymen und Zellkompartimenten sind verschiedenste biologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren bekannt. Abhängig von Aufschlussvolumen weist jedes Verfahren individuelle Vor- und Nachteile bezüglich des Aufschluss- und des Enzymdenaturierungsgrades auf. In der vorliegenden Arbeit wurden für größere Volumina Ultraschall verwendet, während für analytische Zwecke kleine Volumina mittels FastPrepTM aufgeschlossen wurden. Bei beiden Methoden handelt es sich um mechanische Aufschlussmethoden.

3.9.1 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Durch den Kavitationseffekt von implodierenden Vakuumbblasen in ultrabeschallter Flüssigkeit werden Zellmembranen von Mikroorganismen derartig belastet, dass dies bei wiederholter Einwirkung zur Lyse der Zellmembran führt.

Verwendet wurde für den Zellaufschluss durch Ultraschall ein Branson Sonifier 450. 10mL Zellpellet wurden zu diesem Zweck auf 4°C aufgetaut und unter Kühlung auf Eis in einem 50mL Falkonröhrchen der Ultraschallmembran für 30s ausgesetzt. Um durch die entstehende Hitze den Enzymdenaturierungseffekt so gering wie möglich zu halten, wurde der Ansatz anschließend 2min auf Eis unbeschallt gekühlt. Eine fünfmalige Wiederholung alternierender Beschallung und Nicht-Beschallung resultierte in einen nahezu vollständigen Aufschluss. Optimierungsverfahren zur Proteinfreisetzung bei

möglichst geringen Zyklenzahlen wurden für alle verwendeten Organismen durchgeführt (*K. pneumonia*, *L. reuteri*, *E. coli*, *P. Furiosus*). Die Aufschlussprozedur belief sich damit auf ca. 15min pro 10mL. Die Suspension wurde bei 4°C und 15000rpm für 60min zentrifugiert und das Pellet mit den enthaltenen Zelltrümmern verworfen. Es folgte eine Filtration (0,22µm Porendurchmesser), um restliche Zelltrümmer aus dem Überstand zu entfernen. Die Enzymsuspension (zellfreier Extrakt) wurde unter ständiger Kühlung sofort weiterverarbeitet, um die Enzyme so kurz wie möglich den zelleigenen Proteasen und deren schädigender Wirkung auszusetzen.

3.9.2 Zellaufschluss mittels FastPrep™

Eine wesentlich schnellere Aufschlussmethode verglichen mit Ultrabeschallung stellt der mechanische Zellaufschluss mittels FastPrep™ der Firma Pro-4-Pro dar. Der wesentliche Vorteil des FastPrep™ stellt die Möglichkeit dar, Zellmaterial anaerob aufzuschließen. Allerdings beläuft sich das maximal aufgeschlossene Volumen auf 1mL, sodass der Aufschluss nicht für anschließende Aufreinigung genutzt werden konnte, wohl aber für Analysen und Experimente mit zellfreiem Enzymextrakt. Durch mechanische Scherung der Zellmembran an der Aufschlussmatrix werden die Zellen binnen Sekunden lysiert.

Ein 2mL-Eppendorfgefäß wurde mit 1mL Zellsuspension und 0,5mL zugehöriger Aufschlussmatrix gefüllt und in die Aufschlussprozedur für 20s durchgeführt. Ein sofortiges Kühlen des Eppendorfgefäßes war erforderlich um die lokale Hitzeentwicklung einzudämmen.

3.10 Enzymaufreinigung und Langzeitstabilisierung

Grundsätzlich wurden im Rahmen dieses Projektes die rekombinanten Enzyme, welche mit Histidin-Tags versehen waren, über affinitätschromatographische Methoden aufgereinigt, während natürliche Enzyme über Anionenaustauschchromatographie isoliert wurden.

3.10.1 FPLC

Ein Fast Protein Liquid Chromatograph (FPLC) kann mit verschiedenen Proteinaufreinigungssäulen ausgestattet werden und vereinfacht durch Leitfähigkeits- und UV-Detektoren, visualisierender Software, Mediumentgaser und automatischem Fraktionssammler die automatische Proteinaufreinigung erheblich. Sowohl die bereits beschriebenen Affinitätschromatographiesäulen, als auch Anionenaustauschchromatographiesäulen, konnten mit der FPLC kombiniert werden.

Verwendung fand in der vorliegenden Arbeit ein FPLC-Modul Bioline der Firma Knauer mit der zugehörigen ChromGate-Software EZchrom.

3.10.2 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren zur Isolation eines Analyten aus einer Lösung verschiedener Stoffe. Voraussetzung ist, dass ein geeigneter Ligand (Bindungspartner) zu dem entsprechenden Analyten (Protein) zur Verfügung steht. Sie ist eine der leistungsfähigsten Trennmethoden.

In der vorliegenden Arbeit wurde sich der Metallionenchelate-Technik bedient. Alle rekombinanten Enzyme wurden mit Hilfe molekularbiologischer Methoden mit einem His-Tag versehen (vergleiche Abschnitt „Vektor- und Stammkonstruktion“), sodass über eine Nickel-NTA-Säule (Ni^{2+} -NTA-Matrix Firma Qiagen) die Aufreinigung vollzogen werden konnte.

Die Matrix fand sowohl im kleinen Maßstab in Form sogenannter „Spinn-Eppis“, als auch in 25mL-Säulen für die FPLC Anwendung.

Unter Verwendung der FPLC wurde die Ni^{2+} -NTA-Matrix in der Säule zunächst mit einem 20mM-Imidazolpuffer gespült, um eine Basislinie des UV-Spektrometers bei 256nm zu erzeugen. Dabei wurde eine Durchflussrate von 2mL/min, bei einer Säulentemperatur von 4°C und einem Systemüberdruck von 0,3bar angelegt. Es folgte die Beladung mit gefiltertem zellfreiem Enzymextrakt, welches bis zur Verwendung bei 4°C kühl gelagert wurde. Während dieser Beladung verdrängten die His-Tag-versehenen rekombinanten Enzyme das in der Matrix eingelagerte Imidazol in einer Konkurrenzreaktion. Aufgrund der nur schwachen Wechselwirkung der Matrix mit His-

Tag-freien Proteinen, wurden alle anderen Proteinfractionen schon während dieses Säulenladevorgangs mit dem Durchfluss ausgetragen.

Um eine höhere Reinheit des späteren Eluats zu erzielen, wurde nach abgeschlossener Säulenbeladung ein Reinigungsschritt mit 40mM-Imidazolpuffer durchgeführt. Dieser verdrängte schwach adhärierte Proteine, die aufgrund ihres hohen Histidinanteils Matrixwechselwirkungen aufwiesen. Es folgte ein Elutionsschritt mit 300mM-Imidazolpuffer und die fraktionierte Sammlung des nun aufgereinigten, rekombinanten Enzyms. Zur Entfernung des enzymschädigenden Imidazol in der Elutionsfraktion wurde sofort mit der Fällung und Umpufferung des Enzyms fortgefahren. Die Säule wurde anschließend mit fünf Volumina reinem Wasser gespült und in 20%igem Ethanol gelagert, um Kontamination zu vermeiden.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Affinitätschromatographiedaten.

Säulenvolumen:	25mL
Durchflussrate:	2mL/min
Überdruck im FPLC-System:	0,3bar
Betriebstemperatur:	4°C
UV-Absorption:	256nm
Lagerung der Säule:	20% Ethanollösung
Elutionspuffer:	50mM Na ₃ PO ₄ , 0,3M NaCl, 300mM Imidazol, pH 7
Waschpuffer:	50mM Na ₃ PO ₄ , 0,3M NaCl, 40mM Imidazol, pH 7
Equilibrierungspuffer:	50mM Na ₃ PO ₄ , 0,3M NaCl, 20mM Imidazol, pH 7

3.10.3 Anionenaustauschchromatographie

Zur Aufreinigung natürlicher Enzyme kamen Standardmethoden der Anionenaustauschchromatographie zum Einsatz. Dabei handelt es sich um eine Auftrennung der Proteinfractionen aus einem zellfreien Proteinextrakt, unter Ausnutzung der verschiedenstarken elektromagnetischen Ladungen der Proteine.

Da die Aufreinigung der natürlichen *P. furiosus* – Wasserstoffhydrogenase extern von einem Projektpartner durchgeführt wurde und nicht ein unmittelbarer Teil der vorliegenden Arbeit war, wird das genaue Aufreinigungsverfahren nicht in die Methodenbeschreibung aufgenommen. Zwecks Vollständigkeit sei die Anionenchromatographie als Aufreinigungsmethode lediglich an dieser Stelle genannt.

3.10.4 Fällung und Umpufferung

Die Elutionsfraktion der präparativen Enzymaufreinigung mittels Ni²⁺-NTA-Matrix enthielt neben dem Zielprotein vor allem eine hohe Imidazolkonzentration, welche die Enzymaktivität dauerhaft erheblich herabsetzte. Da auch durch Methoden der Gefriertrocknung das gelöste Imidazol nicht vollständig entfernt werden konnte, war eine Umpufferung des Enzyms unverzichtbar. Dazu wurde die Elutionsfraktion mit Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 37% (w/v) versetzt. Durch vorsichtiges Schütteln der Enzym-Salz-Suspension bei 4°C für 1h wurde dem gelösten Enzym durch die Ammoniumsulfationen die Hydrathülle entzogen, woraus die Präzipitation des Enzyms folgte. Nach Zentrifugation für 10min bei 4°C und 13000rpm konnte der imidazolhaltige Überstand verworfen und das Enzym in gewünschtem Puffer resuspendiert werden. Es folgte entweder die Lagerung im Puffer bei 4°C im Falle der zeitnahen Verwendung des Enzyms; andernfalls im direkten Anschluss an die Umpufferung die Gefriertrocknung.

3.10.5 Gefriertrocknung

Um die gefällten und umpufferten Enzyme langfristig stabil lagern zu können, wurde sich der Gefriertrocknung bedient. Die Gefriertrocknung, oder auch Sublimationstrocknung, ist ein Verfahren zur schonenden Trocknung von hochwertigen Produkten, wie z. B. Enzymen. Bei der Gefriertrocknung sublimieren die Eiskristalle aufgrund des niedrigen Druckes direkt ohne den Übergang in den flüssigen Zustand zu vollziehen.

Verwendung fand in der vorliegenden Arbeit ein Lyophilisator der Firma Christ des Typs Beta 2-8 LD plus. Das im Puffer suspendierte Enzym wurde für diesen Zweck in 2mL-Eppendorfgefäße aufgeteilt und deren Öffnungen mit gaspermeablem Zellulosepapier bedeckt. Das für 4 Stunden angelegte Vakuum im Lyophilisator ließ bei Betriebstemperatur die sublimierte Pufferflüssigkeit durch die Zellulosemembran entweichen und hinterließ getrocknete Enzymkristalle. Gelagert wurde das Enzym bei -20°C.

3.11 Enzymaktivitätstests

Für verschiedene Enzymaktivitätsexperimente kamen v. a. Hepespuffer, Trispuffer, Phosphatpuffer und Carbonatpuffer für enzymatische Aktivitätstest zum Einsatz:

Hepespuffer: 50mM

TrisHCl-Puffer: 50mM

Carbonatpuffer: 50mM

Kaliumphosphatpuffer: 35mM

Zur Verifizierung der katalytischen Aktivität und Abschätzung reaktionskinetischer Parameter wurden verschiedene Enzymaktivitätstests durchgeführt. Alle Reaktionen basierten auf photometrischen Analysen. Verwendung fand ein Photometer der Firma Pharmacia Biotech des Typs Novaspec II und Küvetten der Firma Plastibrand 1,5mL der Katalognummer 7591 50.

Da NADPH ein Produkt der reversiblen Reaktionen sowohl des PDORI als auch der H₂ase darstellt, wurde die Produktgenerierung durch Extinktionsmessung bei 340nm bestimmt. Für die Aktivitätsverifizierung der GDHt wurde die Extinktion von entstehendem Azin bei 305nm vermessen.

1 Unit (U) entspricht der Enzymaktivität bei der pro Minute 1µmol Substrat umgesetzt wird. Die spezifische Aktivität wurde definiert als U/mg Proteinfraction, die volumetrische Aktivität wurde definiert als U/mL Proteinsuspension. Letzte berechnet sich über:

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta A V(\text{Gesamt})}{6,22 V(\text{Enzym})} \quad (34)$$

Mit: ΔA = Änderung der Extinktion pro Minute

$V(\text{Gesamt})$ = Gesamtes Küvettenvolumen in mL

$V(\text{Enzym})$ = Volumen der Enzymsuspension in mL

6,22 = millimolarer Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340nm

Die spezifische Aktivität bezieht sich auf die Enzymmenge in Milligramm, sodass sie über folgende Formel erhalten werden kann:

$$\text{Spez. Aktivität [U/mg]} = \text{volumetrische Aktivität [U/mL]} \cdot \text{Enzymkonzentration [mg/mL]} \quad (35)$$

3.11.1 Propandioloxidoreduktase-Isoenzym Aktivitätstest

Die Aktivität des 1,3-Propandioloxidoreduktase-Isoenzyms wurde sowohl über die Rückreaktion (1,3-PDO \rightarrow 3-HPA) nach Forage et al. (1982), als auch die Vorwärtsreaktion (3-HPA \rightarrow 1,3-PDO) ermittelt.

Der Reaktionsansatz für die Rückreaktion (1,3-PDO \rightarrow 3-HPA) enthielt folgende Substanzen:

0,025M	Carbonatpuffer (pH8)
0,03M	Ammoniumsulfat
0,1M	1,3-Propandiol
0,1mM	NADP

Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe des Enzyms, wobei die Zunahme der Extinktion bei 340nm (NADPH-Entwicklung) dokumentiert wurde.

Der Reaktionsansatz für die Vorwärtsreaktion (3-HPA \rightarrow 1,3-PDO) enthielt folgende Substanzen:

0,025M	Carbonatpuffer (pH8)
0,03M	Ammoniumsulfat
0,01M	3-HPA
0,1mM	NADPH

Dabei wurden zunächst Puffer, Ammoniumsulfat und 3-HPA zugegeben und als Blindwert definiert. Die Zugabe von 0,1mM NADPH führte zu einer Grundextinktion von ca. 0,650 AU bei 340nm. Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe des Enzyms, wobei die Abnahme der Extinktion bei 340nm (NADPH-Abnahme) dokumentiert wurde.

Bei den hier dargestellten Aktivitätstests handelt es sich um die Standardansätze, die auf verschiedene Weisen zur genaueren Analyse der katalytischen Aktivität modifiziert wurden. Die Variationen beliefen sich auf Einsatz von verschiedenen Puffersystemen (TrisHCl-, Hepes-, Carbonatpuffer), auf verschiedene pH-Wertebereiche (pH7-pH10) und auf unterschiedliche Temperaturen (37°C–55°C). Ferner wurde auch der Aktivitätsverlust über die Zeit untersucht, nach Lagerung in diversen Puffern bei 4°C und -20°C und nach Lagerung als gefriergetrocknete Kristalle bei 4°C und -20°C. Schließlich wurde auch der zeitliche Aktivitätsverlust unter Reaktionsbedingungen getestet, d. h. das Enzym wurde längere Zeit diversen Temperaturen ausgesetzt und der Aktivitätsverlust dokumentiert. Diese Informationen waren für das Design entsprechender Teilprozessstufen der synthetischen Produktionsprozesse notwendig.

3.11.2 Glyceroldehydratase Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Aktivität der Glyceroldehydratase wurde die 3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrason-Methode (MBTH) nach Toraya et al. (1977b) verwendet. Es handelt sich im Gegensatz zur NADPH-Extinktionsmethode um eine Endpunktbestimmung. Da das eigentliche Substrat Glycerol sowie das entstehende Produkt 3-HPA die Glyceroldehydratase hemmen (Toraya et al. 1976), erfolgte der grundsätzliche Nachweis der Enzymaktivität mittels des Substrats 1,2-Propandiol. Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

0,035M	Kaliumphosphatpuffer pH8,0
0,05M	KCl
0,2M	1,2-Propandiol
15µM	Coenzym B12

Zunächst wurden die Lösungen entgast, um sie von Sauerstoff zu befreien. Die gesamte Reaktion wurde in Dunkelheit durchgeführt, um das lichtempfindliche Coenzym B12 nicht zu inaktivieren (Abeles et al. 1961). Das Reaktionsvolumen betrug 0,3mL.

Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe des Enzyms. Nach 5min Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1mL 0,1M Kaliumcitratpuffer (pH3,6) gestoppt und 0,5mL MBTH (0,1% w/v) zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für

15min. Aus MBTH und der Carbonylverbindung des gebildeten Propanaldehyds bilden sich während dieser Reaktion Azin (Menzel 1999). Unter entsprechender Verdünnung mit destilliertem Wasser konnte das Azin bei einer Wellenlänge von 305nm vermessen werden. Die Azinmenge konnte aus der Differenz von Enzymprobe und Blindwert ermittelt werden.

3.11.3 Wasserstoffhydrogenase Aktivitätstest

Die Aktivität der NADP-abhängigen H₂ase I wurde nach Mertens et al. (2003) bestimmt. Verwendet wurde eine 3mL Quarzküvette, welche mit einem Septum sauerstofffrei verschlossen werden konnte (Firma Hellma, Mühlheim). Diese wurde mit sauerstofffreien und mit Wasserstoffgas gesättigtem EPPS-Puffer (50mM, pH8,0) gefüllt, welcher ferner 0,4mM NADP enthielt. Nach einer Inkubation von 5min bei 40°C wurde zellfreier Extrakt von *P. furiosus* zugegeben und die steigende Absorption photometrisch bei 340nm detektiert.

3.12 Weitere analytische Methoden

Im Folgenden werden weitere, in der vorliegenden Arbeit verwendete analytische Methoden dargestellt. Es handelt sich dabei ausschließlich um Standardmethoden und werden daher nur kurz skizziert.

3.12.1 HPLC

Die Analysemethode der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) wurde zur quantitativen Bestimmung der Stoffwechselprodukte (1,3-Propandiol und Glycerin) des 1,3-PDO-Syntheseweges genutzt. Verwendung fand dabei eine HPLC-Anlage der Firma Knauer mit einer auf 60°C temperierten Anionenaustauschsäule (Typ HPX-87H) der Firma BioRad. Aufgrund der niedrigen Zersetzungstemperatur von 3-Hydroxypropionaldehyd war dessen quantitative Bestimmung mittels HPLC nicht möglich, weshalb für diesen Zweck auf den Tryptophantest nach Circle zurückgegriffen wurde.

Standardreihen mit Glycerin und 1,3-PDO zeigten, dass eine Messgenauigkeit noch bei geringen Konzentrationen von 0,05g/L gegeben war ($R=99,999$). Bei geringeren Konzentrationen wurde eine entsprechende HPIC verwendet.

3.12.2 HPIC

Zur Messung von Konzentrationen zwischen 50mg/L und 5mg/L wurde eine HPIC der Firma Dionex ICS Series (3000) verwendet. Mittels einer Anionenaustauschsäule (Carbopack PA10) in Kombination mit amperometrischer Messung wurden die entsprechenden Proben analysiert. Auch hier war eine quantitative Bestimmung der 3-HPA-Konzentration nicht möglich (s. o.).

3.12.3 Lyophilisierung

Um selbst beliebig geringe Konzentrationen ($<1\text{mg/L}$) an Substraten, Intermediaten und Produkten der enzymatischen Produktionssysteme nachzuweisen, konnte auf einen Lyophilisator zur Aufkonzentrierung der zu analysierenden Proben zurückgegriffen werden. Verwendung fand in der vorliegenden Arbeit ein Lyophilisator der Firma Christ des Typs Beta 2-8 LD plus. Die Probe in 2mL-Eppendorfgefäßen wurde für diesen Zweck mit gaspermeablem Zellulosepapier bedeckt. Das für 4h angelegte Vakuum im Lyophilisator ließ bei Betriebstemperatur einen definierten Teil des Wassers durch die Zellulosemembran entweichen und hinterließ eine angereicherte Probe. Durch Bestimmung der Probenvolumina vor und nach der Lyophilisierung konnte der Anreicherungsgrad ermittelt werden. Die angereicherten Proben wurden nun mittels HPLC bzw. HPIC analysiert und die ursprüngliche Konzentration der Probe mit Hilfe des Anreicherungsgrades berechnet.

3.12.4 Tryptophantest nach Circle et al. (1945)

Da 3-HPA aufgrund seiner Thermostabilität nicht mittels HPLC analysiert werden konnte, mussten andere Nachweisreaktionen zur Konzentrationsbestimmung dienen. Der Tryptophantest nach Circle et al. (1945) zur quantitativen Analyse der 3-HPA-

Konzentration basiert auf einer säurekatalysierten Verschiebung des chemischen Gleichgewichts von 3-HPA und dessen Derivaten, wie im Abschnitt „3-Hydroxypropionaldehyd“ beschrieben (vgl. **Abschnitt 3.3.2**). Durch den stark sauren pH-Wert reagieren alle Derivate des 3-HPA zu Acrolein, welches nach einer Reaktion mit Tryptophan photometrisch detektiert und somit quantitativ bestimmt werden kann. Dazu wurden 250µL der 3-HPA-haltigen Probe (empfohlener Verdünnungsfaktor 2000 bis 4000) mit 500µL 37%iger HCl und 125µL Tryptophan versetzt und 40min bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 560nm photometrisch analysiert und die 3-HPA-Konzentration mittels zuvor aufgenommener Kalibriergerade bestimmt.

3.12.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteinbestimmungstest nach Bradford ist eine Standardmethode der Biochemie und wird daher hier nur kurz, zwecks Vollständigkeit beschrieben. Er wurde zur quantitativen Enzymmengenbestimmung, z. B. der Elutionsfraktion eines FPLC-Aufreinigungsverfahrens, genutzt.

Dazu wurden 1mL Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung mit 20µL der zu analysierender Probe versetzt und 15min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde photometrisch bei 580nm gemessen und über entsprechende Kalibriergeraden die Proteinkonzentration errechnet.

3.12.6 Gelelektrophoresen

Zu analytischen Zwecken kamen verschiedene Gelelektrophoresen zum Einsatz, deren Prinzip und Funktion in vielen Arbeiten der im Bereich Biochemie und Biotechnologie detailliert beschrieben sind und daher an dieser Stelle lediglich kurz dargestellt werden sollen.

Zur Analyse von DNA-Fragmenten und Vektoren wurde sich 1-1,5%igen Agarosegelelektrophoresen bedient. Verwendet wurde eine Kammer des Typs Powerpac 1000 der Firma BioRad. Zur elektrophoretischen Trennung wurde eine Spannung von 70V angelegt. Die DNA-Fragmente wurden mit SYBRGreen (Fa. Sigma Aldrich) gefärbt und unter UV-Licht visualisiert.

Zwecks Analyse von Proteinfractionen kam eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-Page) des Typs PowerPac HC der Firma BioRad zum Einsatz. Die 12-15%igen Gele wurden einer Spannung von 120V für 1,5h ausgesetzt. Die Färbung der aufgetrennten Proteinfractionen erfolgte mit einer standardisierten Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung.

3.12.7 Zellwachstum und dessen Kinetik

Um den Fermentationsprozess von *P. furiosus* zu analysieren, wurden verschiedene Methoden der Zellwachstumsbestimmung angewandt und daraus die Wachstumskinetik errechnet. Mit Hilfe der gemessenen und errechneten Daten konnte der optimale Erntezeitpunkt (kurz vor Ende der exponentiellen Phase) ermittelt werden, welcher aufgrund der schnellen Zellyse von *P. furiosus* nicht überschritten werden durfte. Darüber hinaus konnte ebenso der optimale Inokulationszeitpunkt (Mitte der exponentiellen Phase) des 300L-Reaktors durch die Vorkultur im 1,5L-Reaktor bzw. 30L-Reaktor bestimmt werden. Die Analysemethoden des Zellwachstums beliefen sich auf die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM), der optischen Dichte (OD) und der mikroskopischen Bestimmung der Zellzahl. Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden wurden anschließend miteinander in Relation gesetzt.

3.12.8 Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden während eines Fermentationsprozesses Proben entnommen und jeweils 1mL Fermentationsbrühe in ein zuvor gewogenes Eppendorfgefäß (1,5mL) überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C für 10min. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Pellet bei 100°C für 24h getrocknet und aus der Gewichts Differenz aus Eppendorfgefäß ohne Pellet und Eppendorfgefäß samt Pellet die BTM/mL bestimmt. Werte für die optische Dichte und die Zellzahl zum selben Zeitpunkt wurden ebenfalls dokumentiert und verglichen.

3.12.9 Optische Dichte

Die optische Dichte (OD) wurde mit Hilfe eines Photometers der Firma Pharmacia Biotech des Typs Novaspec II und Küvetten der Firma Plastibrand 1,5mL der Katalognummer 7591 50 bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 600nm wurden Proben (V=1mL) eines Fermentationsprozesses zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen und dokumentiert, anschließend mit Zellzahl und BTM verglichen.

3.12.10 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl fand eine Neubauer-Zählkammer der Firma Marienfeld EC Verwendung. Ein Kleinquadrat besaß eine Fläche von $0,0025\text{mm}^2$ bei einer Tiefe von $0,02\text{mm}$. Daraus ergibt sich ein Volumen von $5 \cdot 10^{-8}\text{mL/Kleinquadrat}$. Zur Bestimmung der Zellzahl/mL wurde die Zellzahl/Kleinquadrat mikroskopisch ermittelt und durch den Faktor $5 \cdot 10^{-8}$ dividiert.

Auf diese Weise wurde Proben zu verschiedenen Zeitpunkten eines Fermentationsprozesses analysiert und mit zugehöriger OD und BTM in Relation gesetzt.

3.13 Realisierung synthetischer Stoffwechselwege

Im folgenden Abschnitt werden die Experimente der Realisierung von zunächst einzelnen Prozessstufen des synthetischen Produktionsprozesses in verschiedenen Variationen dargestellt. Anschließend wird die experimentelle Gestaltung des gesamten Produktionsprozesses beschrieben.

3.13.1 Konzeption und Realisierung einzelner Produktionsstufen

Innerhalb des synthetischen Produktionsprozesses ließen sich die Teilprozesse in zwei Reaktionsstufen einteilen: „Biobrick 1“, in welcher Glycerol mittels der Glyceroldehydratase unter Abspaltung von Wasser zu 3-Hydroxypropionaldehyd umgesetzt wird und „Biobrick 2“, in welcher 3-Hydroxypropionaldehyd mittels des Propandioloxidoreduktase-Isoenzyms unter NADPH-Oxidation zu 1,3-PDO umgesetzt

wird. In der zweiten Stufe kamen weitere Enzyme (X?) und entsprechende Substrate zur Kofaktorregeneration zum Einsatz.

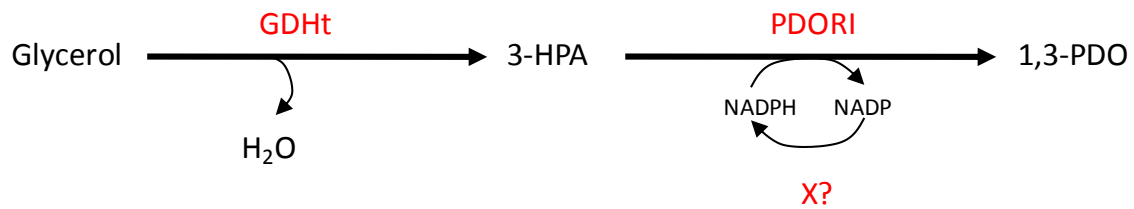


Abbildung 17: Synthetischer Produktionsprozess.

Die einzelnen Prozessstufen waren getrennt voneinander zu etablieren, um für jede Stufe gesonderte reaktionstechnische Daten zu erhalten. Nach erfolgter Entwicklung der Einzelstufen wurde die Zusammenführung zu einem Gesamtprozess angestrebt.

3.13.2 Biobrick 1: Glyceroldehydratase

Aufgrund der besonderen Herausforderungen bezüglich der GDHt-Aktivitäten wurden zur Entwicklung des Biobrick 1 diverse Lösungen angestrebt. Ziel der Entwicklung von Biobrick 1 war es, ein System zu entwickeln, in welchem die GDHt im aktiven Zustand gehalten wird. Dazu wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt:

1. *in vitro* Glycerolkonversion nach Nemeth et al. (2008)
2. Fed-Batch-Ansatz zur GDHt-Regeneration

1. *in vitro* Glycerolkonversion nach Nemeth et al. (2008):

Zur Rekapitulation der *in vitro* Glycerolkonversion nach Nemeth et al. (2008) wurde zunächst der entsprechende Versuch exakt wiederholt. 4g/L Glycerol in Phosphatpuffer (50mM, pH8,0) wurde mit Zellrohextrakt von *K. pneumonia* versetzt und 30 Stunden bei 37°C inkubiert (Gesamtvolumen =20mL). Das Vorhandensein der GDHt-Aktivität im Rohextrakt wurde mit entsprechenden Aktivitätstests zuvor sichergestellt (s.o.). Glycerol- und 1,3PDO-Konzentrationen wurden mittels HPLC determiniert. OD wurde in regelmäßigen Abständen bei 600nm bestimmt. 50µL Proben des Reaktionsansatzes wurden nach Beendigung des Versuchs auf agarosehaltige LB-Mediumplatten verstrichen und die Koloniezahlbildung nach weiterer Inkubation bei 37°C bestimmt.

In einem weiteren Folgeexperiment wurde das oben beschriebene Experiment ein weiteres Mal wiederholt, diesmal unter Zugabe von Antibiotika (Ampicillin 0,1mg/mL und Kanamycin 0,1mg/mL). Auch hier wurden Glycerol- und 1,3PDO-Konzentrationen mittels HPLC determiniert, OD in regelmäßigen Abständen bei 600nm bestimmt sowie 50µL Proben ausplattiert.

2. Fed-Batch-Ansatz zur GDHt-Regeneration:

Das Prinzip des Fed-Batch-Ansatzes zur GDHt-Regeneration bestand in der kontinuierlichen Zugabe der nötigen Faktoren ATP und Coenzym B12 (Feed) zum eigentlichen Reaktionssystem (Batch). Wie im Ansatz von Nemeth et al. (2008) sollte hier das Enzymreaktionssystem aus zellfreiem Extrakt aus *K. pneumonia*, bestehend aus GDHt, PDOR (NADH-abhängig) und GDH (NAD-abhängig), die Transformation von Glycerol zu 1,3-PDO katalysieren (vgl. **Abbildung 18**).

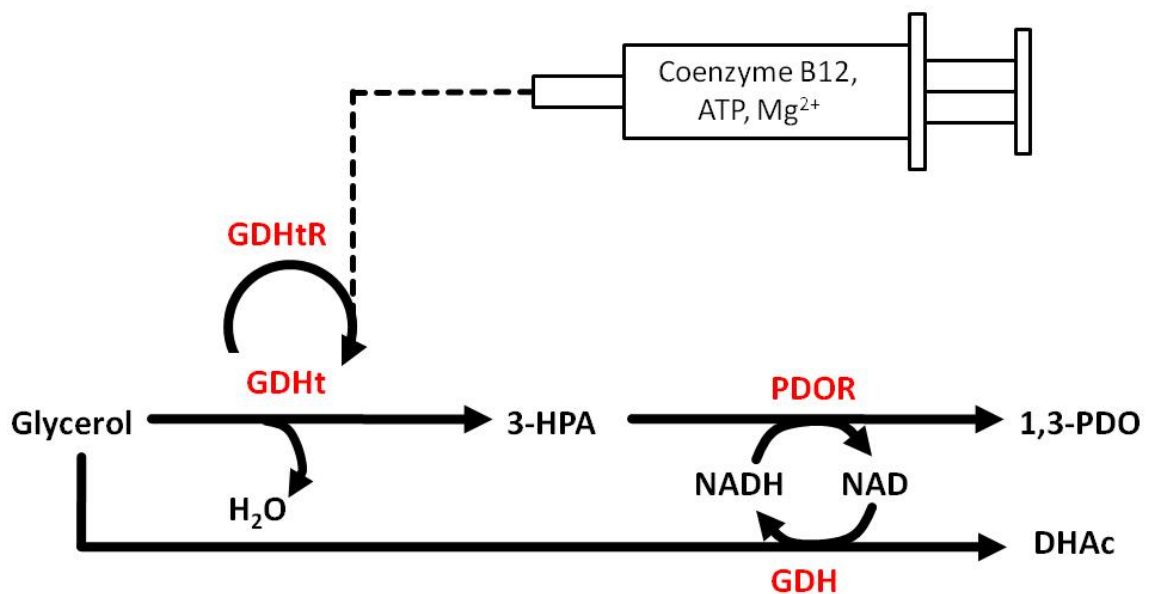


Abbildung 18: Konzept eines in zellfreiem Extrakt (*K. pneumonia*) ablaufenden *in vitro* Prozesses mit kontinuierlicher Zugabe einer Reaktivierungslösung bestehend aus Coenzym B12, ATP und Magnesiumionen zur stetigen Reaktivierung der GDHt.

Dem Batchansatz (V=20 mL) wurde mit einer Flussrate von 1mL/h über einen Zeitraum von 20h eine GDHt-Reaktivierungslösung (Feed) zugeführt. Verwendet wurde eine Spritzenpumpe (WPI-Systems ALADDIN-1010) mit einer 20mL Spritze. Die verwendete Flussrate wurde dabei unter Berücksichtigung von ATP- und Coenzym-B12-Zerfall und -Verbrauch (Cowan et al. 2007) auf 1mL/h fixiert. Für ein erstes Proof

of Concept-Experiment wurden prozesstechnische Parameter wie ATP-Konzentration, Coenzym B12-Konzentration, Glycerolkonzentration sowie initiale GDHt-Units vorerst nicht variiert. Eine iterative Optimierung dieser Parameter wird im **Abschnitt 4.5** beschrieben. In den folgenden Tabellen (**Tabelle 7** und **Tabelle 8**) sind die Zusammensetzungen der Batch- und Feed-Lösungen für Biobrick 1 zusammengefasst:

Tabelle 7: Reaktionsansatz für Biobrick 1 (Batch-Ansatz).

Komponente	Konzentration
Glycerol	3g/L
Desmophen	1 μ L/20mL
ATP	50mmol/L
MgCl ₂	10mmol/L
Coenzym B12	3 μ mol/L
GDHt	10U (aus zellfreiem Extrakt <i>K. pneumonia</i>)
NAD	0,1mmol/L
KCl	0,5mol/L
Ampicillin	0,1mg/mL
Kanamycin	0,1mg/mL
Carbonatpuffer	50mM (pH8,0)
Gesamtvolumen:	20mL

Tabelle 8: Reaktivierungslösung für Biobrick 1 (Feed-Ansatz).

Komponente	Konzentration
ATP	1mol/L (=507g/L)
Coenzym B12	15mmol/L (=9,4mg/L)
MgCl ₂	11mmol/L (=1g/L)
Ampicillin	0,1mg/mL
Kanamycin	0,1mg/mL
Carbonatpuffer	50mM (pH8,0)
Gesamtvolumen:	20mL

Zellaufschluss, Mikrofiltration des Zellysats, sowie der Ansatz aller Lösungen wurden in einer sauerstofffreien Anaerobenbank mit vollständig entgastem Carbonatpuffer durchgeführt. Der Reaktionsansatz der Batchlösung wurde innerhalb der Anaerobenbank mittels einer Spritze in eine vollständig mit Stickstoff gefüllte und mittels Gummiseptum geschlossene Anaerobenflasche (V=50mL) gegeben. Die Reaktivierungslösung wurde ebenfalls innerhalb der Anaerobenbank in eine 20mL-Spritze gefüllt und über einen Gummischlauch (l = 10cm, d = 2,5mm) und eine Kanüle mit der Anaerobenflasche verbunden. Dieses geschlossene System konnte nun außerhalb der Anaerobenbank ohne Gefahr von Sauerstoffeintritt verwendet werden.

Während des Versuchs wurde der Reaktionsansatz in einem temperierbaren Schüttler ($T=37^{\circ}\text{C}$, 120rpm) inkubiert. Der Schüttler befand sich während des Versuchs in einem Kühlraum ($T=4^{\circ}\text{C}$). Außerhalb des Schüttlers wurde die Reaktivierungslösung (Feed) in der 20mL-Spritze bei 4°C gelagert, welche durch die Spritzenpumpe kontinuierlich zu dem Reaktionsansatz in der Anaerobenflasche gegeben wurde. Proben wurden mittels Kanülspritze durch das Gummiseptum der Anaerobenflasche genommen. Zwecks Inaktivierung der Enzyme wurden diese für 10min bei 90°C denaturiert und anschließend bei 4°C gelagert. Glycerol- und 1,3PDO-Konzentrationen wurde mittels HPLC determiniert. Auch die OD wurde in regelmäßigen Abständen bei 600nm bestimmt, um eine Kontamination des Reaktionsansatzes auszuschließen. Der Versuchsaufbau ist in der folgenden **Abbildung 19** skizziert:

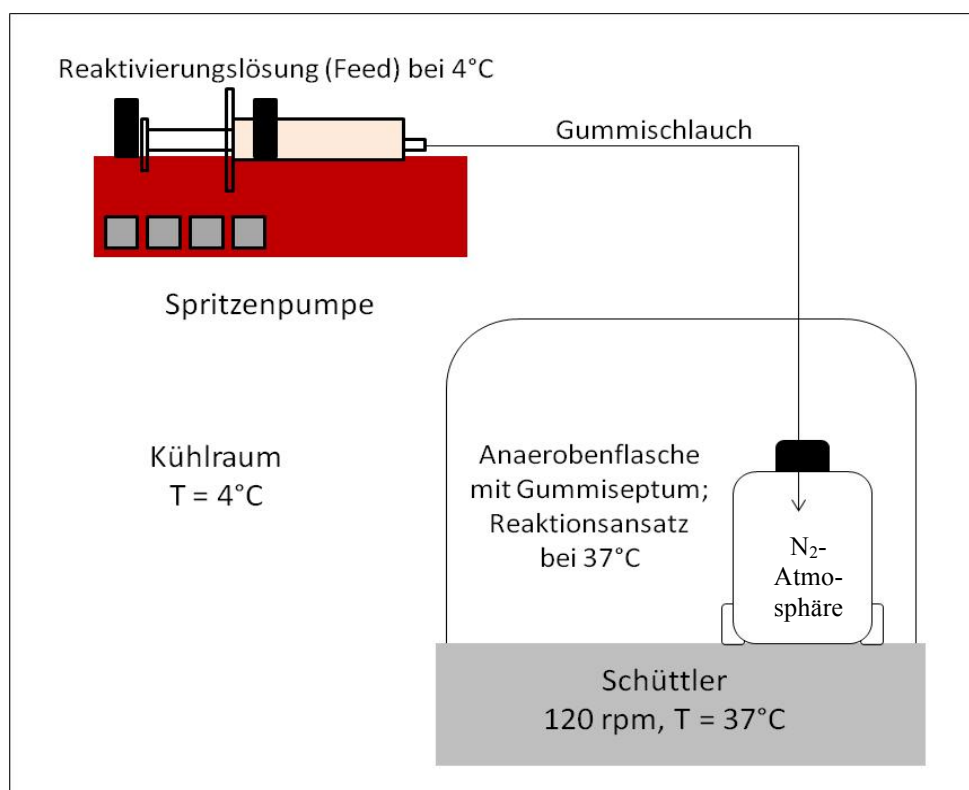


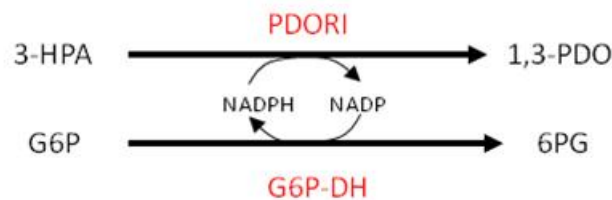
Abbildung 19: Experimenteller Aufbau des Fed-Batch-Ansatzes für Biobrick 1. Während die Feed-Lösung bei 4°C gelagert wird, findet die Reaktion im Schüttler bei 37°C statt. Feed und Batch bilden ein geschlossenes System, der Kopfraum des Batch-Ansatzes war mit sauerstofffreiem Stickstoffgas (leichter Überdruck) gefüllt.

Ein leichter Überdruck des Stickstoffgases in der Flasche während des gesamten Versuchs machte selbst einen minimalen Sauerstoffeintrag in das System entgegen des

Druckgefälles unmöglich. Das Vorliegen des Überdruckes wurde mit jeder manuellen Probennahme insofern aufs Neue bestätigt, da sich der Spritzenzylinder der angesetzten Spritze mit Kanüle nach dem Durchstechen des Gummiseptums von selber ausfuhr.

3.13.3 Biobrick 2a: PDORI und G6P-DH

Eine der Varianten der zweiten Prozessstufe (Biobrick 2) sah eine Kofaktorregenerierung via Glukose-6-Phoshatdehydrogenase (G6P-DH) vor, welche Glukose-6-Phosphat (G6P) und NADP zu 6-Phosphoglukonat und NADPH reduzierte, welches wiederum dem PDORI als Kosubstrat diente.



**Abbildung 20: Produktionsstufe 2 (Biobrick 2) des synthetischen Stoffwechselweges
Variante: PDORI/G6P-DH**

Dieser experimentelle Aufbau stellte zunächst eine Modellvariante dar, in welcher hauptsächlich Integrationsmöglichkeiten des PDORI in die Prozessstufe untersucht wurden. Da sowohl die G6P-DH, als auch das Substrat G6P kommerziell erhältlich waren und dieses Enzym eine hohe spezifische Aktivität von ca. 70U/mg (bei pH8,0, T=37°C) aufwies, erwies sich die Durchführung eines entsprechenden „Proof of concept“-Experiments als zügig realisierbar. Dazu wurden parallel folgender Reaktionsansatz erstellt (vgl. **Tabelle 9**):

Tabelle 9: Reaktionsansatz für Biobrick 2: PDORI und G6P-DH

Komponente	Konzentration
3HPA (ohne Derivate)	3mmol/L
NADPH	0,5mmol/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	30mmol/L
Glukose-6-Phosphat	12mmol/L
G6P-DH	1mg (70U)
PDORI	10U der hier möglichen Reaktionsrichtung
Carbonatpuffer	50mM (pH8,0)
Ampicillin	0,1mg/mL
Kanamycin	0,1mg/mL
Carbonatpuffer	50mM (pH8,0)
Gesamtvolumen	6mL

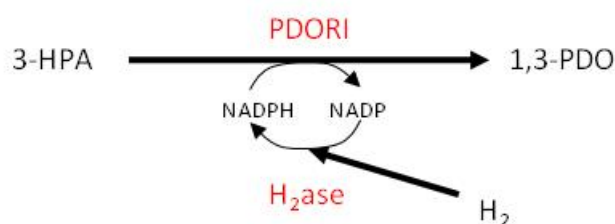
Einige Negativkontrollansätze wurden mit äquivalenter Zusammensetzung, jedoch ohne das Enzym G6P-DH positioniert.

Die ungleichgewichtete Aktivität der beiden verwendeten Enzyme im Reaktionsansatz (10U für PDORI und 70U für G6P-DH) wurde gewählt, sodass PDORI den kinetisch limitierenden Faktor darstellte und die maximale Produktionsgeschwindigkeit bezogen auf die eingesetzte Menge an PDORI ermittelt werden konnte.

Probenahmen erfolgten anfänglich alle 10 Minuten, später stündlich. Nach 26 Stunden wurde die Reaktion gestoppt. Zwecks Inaktivierung der Enzyme wurden die Proben für 10min bei 90°C denaturiert und anschließend bei 4°C gelagert. Es folgte eine Mikrofiltration und Analyse mittels hochsensibler HPIC. Aufgrund der verwendeten geringen Konzentrationen war eine Analyse mittels HPLC nicht möglich.

3.13.4 Biobrick 2b: PDORI und H₂ase

Eine weitere Variante des Biobrick 2 sah eine Kofaktorregenerierung via Wasserstoffhydrogenase vor, welche gelösten Wasserstoff und NADP zu NADPH reduzierte. Es wurden zunächst Experimente mit aufgereinigtem PDORI und zellfreiem Extrakt von *P. furiosus*, welcher Wasserstoffhydrogenaseaktivität aufwies, durchgeführt. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnte der zellfreie Extrakt von *P. furiosus* durch aufgereinigte Wasserstoffhydrogenase I aus *P. furiosus* ersetzt werden.



**Abbildung 21: Produktionsstufe 2 (Biobrick 2) des synthetischen Stoffwechselweges
Variante: PDORI/H₂ase**

Ein grundsätzliches Problem stellten die verschiedenen Temperaturoptima der hier zusammenwirkenden Enzyme dar. Während PDORI aus *E. coli* ein klassisches Temperaturoptimum von 37°C aufwies, belief sich das Temperaturoptimum der Wasserstoffhydrogenase I aus dem thermophilen Organismus *P. furiosus* auf 90°C. Aus vorangegangenen Temperatursensitivitätsexperimenten bzgl. PDORI (vgl. **Abschnitt**

4.2.5) konnte eine höhere Temperatur als 40°C keine langfristige Aktivität gewährleisten, sodass die obere Grenze durch die Thermosensibilität des PDORI gesetzt wurde. Allerdings gelang es Mertens et al. (2003) eine NADPH-Generierung mittels Wasserstoffhydrogenase I aus *P. furiosus* bei einer Betriebstemperatur von 40°C zu realisieren, sodass in der vorliegenden Arbeit Biobrick 2 (PDORI und H₂ase) bei 40°C durchgeführt wurde.

Weniger problematisch stellte sich die Wahl des pH-Wertes von 8,0 dar, da beide Enzyme eine hohe Aktivität in diesem leicht basischen Milieu aufwiesen.

Eines der hier verwendeten Substrate der Wasserstoffhydrogenase I stellte gelöster Wasserstoff dar. Wasserstoff weist unter den im Prozesssystem gegebenen Bedingungen lediglich eine geringe Löslichkeit in Wasser von 0,8 mmol/L (Kaltoven et al. 1998) auf, sodass er durch die suspendierte Wasserstoffhydrogenase I im Batch-Betrieb schnell verbraucht werden würde. Daher musste der während der Reaktion verbrauchte Wasserstoff durch kontinuierlichen Eintrag dem System zugeführt werden. Ein kontinuierliches Begasungssystem erwies sich als zu stör anfällig bezüglich des Feuchtigkeitsaustrags aus dem System. Durch eine Begasung mit trockenem Wasserstoffgas wäre es bei den geringen Volumina der Reaktionsansätze (6-20mL) zu erheblichen, relativen Volumenänderungen und somit Konzentrationsverfälschungen gekommen.

Als technisch einfach realisierbar und zugleich wenig stör anfällig erwies sich dagegen die Verwendung einer mit Wasserstoff gefüllten Anaerobenflasche (V=1L) mit Gummiseptum. Durch das Septum konnte der Reaktionsansatz mittels einer Spritze mit Kanüle zugegeben werden. Durch kontinuierliches Schütteln der Flasche bei hohen Umdrehungszahlen (240rpm) wurde ein steter Gaseintrag sichergestellt. Auch die Probennahme erfolgte mittels Spritze und Kanüle durch das Septum ohne Wasserstoffverlust. Die Präsenz eines leichten Überdrucks der Wasserstoffatmosphäre in der Flasche gab Aufschluss über die Verschlussdichtigkeit des Systems. Dieser Überdruck konnte bei jeder Probennahme aufs Neue bestätigt werden, da das Durchstechen des Septums mit Kanüle und Spritze zu einer zügigen Ausdehnung des Spritzenvolumens (Spritzenzylinder wird nach außen gedrückt) führte. Der Reaktionsansatz in Wasserstoffatmosphäre enthielt folgende Komponenten (vgl. **Tabelle 10**):

Tabelle 10: Reaktionsansatz für Biobrick 2: PDORI und H₂ase

Komponente	Konzentration
3HPA (ohne Derivate)	13mM
NADP	2mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	30mM
Desmophen	1μL/6mL
PDORI	5U der hier möglichen Reaktionsrichtung
H ₂ ase	10U der hier möglichen Reaktionsrichtung
Ampicillin	0,1mg/mL
Kanamycin	0,1mg/mL
Carbonatpuffer	50mM (pH 8,0)
Gesamtvolumen:	6mL-20mL

Negativkontrollansätze wurden mit äquivalenter Zusammensetzung, jedoch in Stickstoffatmosphäre, anstatt in Wasserstoffatmosphäre durchgeführt, um die Regenerationsmöglichkeit des Kofaktors zu unterbinden. Auch hier erfolgten die Probenahmen anfänglich alle 10 Minuten, später stündlich. Nach 26 Stunden wurde die Reaktion gestoppt. Zwecks Inaktivierung der PDORI und NADP(H) wurden die Proben für 10min bei 90°C denaturiert und anschließend bei 4°C gelagert. Obwohl eine Inaktivierung der Wasserstoffhydrogenase I durch die Einwirkung der Temperatur von 90°C unwahrscheinlich ist, konnte ein weiterer Reaktionsverlauf durch Lagerung bei 4°C ausgeschlossen werden. Es folgten Zentrifugation, Mikrofiltration und Analyse mittels hochsensibler HPIC. Auch hier war eine Analyse mittels HPLC aufgrund der verwendeten geringen Konzentrationen nicht möglich. 3-HPA-Konzentrationen wurden mittels Circle-Methode bestimmt.

3.13.5 Konzeption und Realisierung des mehrstufigen Prozesses

Der Gesamtprozess zur enzymatischen Glyceroltransformation zu 1,3-PDO wurde mit den Enzymen GDHt (nebst Regenerationsfaktor GDHtRF), PDORI (NADPH-abhängig) und H₂ase I (NADP-abhängig) durchgeführt. Dabei belief sich die PDORI auf vollständig aufgereinigtes Enzym, während die H₂ase I in Form von zellfreiem Extrakt aus *P. furiosus* verwendet wurde, da *P. furiosus* keine sonstigen Enzyme enthält, die mit den entsprechenden Substraten in unerwünschter Weise interagieren. GDHt und GDHtRF wurden in Form von zellfreiem Extrakt aus *L. reuteri* eingesetzt, um Enzym und Regenerationsfaktor im physiologisch günstigen Verhältnis zur Verfügung zu stellen. Da *L. reuteri* anders als *K. pneumonia* keine GDH-Aktivität aufweist, konnte

eine unerwünschte Glyceroltransformation zu Dihydroxyaceton und anderen Folgeprodukten im zellfreien Extrakt ausgeschlossen werden.

Zur Experimentdurchführung wurden die entsprechenden Aktivitäten der aufgereinigten Enzyme und derer im zellfreien Extrakt bestimmt und ein Einsatzfaktorverhältnis GDHt:PDORI:H₂ase von 1:1:1 (je 10U/20mL) für den Batch-Ansatz gewählt. 3g/L Glycerol dienten in dem Ausgangsversuch als initiale Substratkonzentration.

Dem Batchansatz (V=20 mL) wurde mit einer Flussrate von 1 mL/h über einen Zeitraum von 20 Stunden eine GDHt-Reaktivierungslösung zugeführt. Verwendet wurde eine Spritzenpumpe (WPI-Systems ALADDIN-1010) mit einer 20mL Spritze. In den folgenden Tabellen (vgl. **Tabelle 11** und **Tabelle 12**) sind die Zusammensetzungen von Batch und Feed dargestellt:

Tabelle 11: Reaktionsansatz a) d) für Biobrick 1 (Batch-Ansatz): In Folgeexperimenten wurden Glycerolkonzentration b) c) und GDHt-Units c) zwecks Optimierung iterativ variiert. ATP-, Coenzym B12- und MgCl₂-Konzentrationen ergeben sich aus den Ergebnissen von Xu et al. (2009).

Komponente	Konzentration		
Glycerol	3g/L ^{a)}	10g/L ^{b)}	20g/L ^{c)}
Desmophen	1µL/20mL		
ATP	50mmol/L		
MgCl ₂	10mmol/L		
Coenzym B12	3µmol/L		
GDHt	10U ^{d)} 20U ^{e)} (aus zellfreiem Extrakt <i>L. reuteri</i>)		
PDORI	10U ^{d)} 20U ^{e)} der hier möglichen Reaktionsrichtung		
H ₂ ase	10U ^{d)} 20U ^{e)} der hier möglichen Reaktionsrichtung		
NADP	2mmol/L		
(NH ₄) ₂ SO ₄	30mmol/L		
KCl	0,5mol/L		
Ampicillin	0,1mg/mL		
Kanamycin	0,1mg/mL		
Carbonatpuffer	50mM (pH 8,0)		
Gesamtvolumen:	20mL		

Tabelle 12: Reaktivierungslösung a) (Feed) für den Gesamtprozess: In Folgeexperimenten b) c) d) wurden ATP- und Coenzym B12-Konzentration zwecks Optimierung iterativ variiert.

Komponente	Konzentration			
ATP	507g/L ^{a)}	253g/L ^{b)}	126g/L ^{c)}	63g/L ^{d)}
Coenzym B12	9,4mg/L ^{a)}	4,7g/L ^{b)}	2,4g/L ^{c)}	1,2g/L ^{d)}
MgCl ₂	1g/L			
Ampicillin	0,1mg/mL			
Kanamycin	0,1mg/mL			
Carbonatpuffer	50mM (pH 8,0)			
Gesamtvolumen:	20mL			

Zwecks iterativer Optimierung wurden die prozesstechnischen Parameter ATP-Konzentration (Feed), Coenzym B12-Konzentration (Feed), Glycerolkonzentration (Batch) sowie initiale Enzymmenge/Units (Batch) variiert. Experimentelle Variationen sind in den oben dargestellten Tabellen durch ^{a) b) c) d)} und ^{e)} gekennzeichnet. Auch hier wurden Zellaufschluss, Mikrofiltration des Zellysats, sowie der Ansatz aller Lösungen in einer sauerstofffreien Anaerobenbank mit vollständig entgastem Carbonatpuffer vollzogen. Der Reaktionsansatz der Batchlösung wurde innerhalb der Anaerobenbank mittels einer Spritze in eine vollständig mit Wasserstoff gefüllte und mittels Gummiseptum geschlossene Anaerobenflasche (V=1L) gegeben. Die Reaktivierungslösung wurde ebenfalls innerhalb der Anaerobenbank in eine 20mL Spritze gefüllt und über einen Gummischlauch (l = 10cm, d = 2,5mm) und eine Kanüle mit der Anaerobenflasche verbunden. Dieses geschlossene System konnte nun außerhalb der Anaerobenbank ohne Gefahr von Sauerstoffeintritt verwendet werden. Wie zuvor bereits im Rahmen der Biobrick 1-Versuchsdurchführung geschildert, wurde der Reaktionsansatz in einem temperierbaren Schüttler (T=37°C) inkubiert. Die Rotationsgeschwindigkeit der Anaerobenflasche im Schüttler wurde mit 220rpm relativ hoch eingestellt, um Stofftransportlimitationen zu verringern und somit einen zügigen Gaseintrag des Wasserstoffs in die Reaktionslösung zu gewährleisten. Der Schüttler befand sich während des Versuchs in einem Kühlraum (T=4°C). Außerhalb des Schüttlers wurde die Reaktivierungslösung (Feed) in der 20mL Spritze bei 4°C gelagert, welche durch die Spritzenpumpe kontinuierlich zu dem Reaktionsansatz in der Anaerobenflasche gegeben wurde. Proben wurden wieder mittels Kanüle und Spritze durch das Gummiseptum der Anaerobenflasche genommen. Zwecks Inaktivierung der Enzyme wurden diese für 10min bei 90°C denaturiert und anschließend bei 4°C gelagert. Glycerol- und 1,3PDO-Konzentrationen wurden mittels HPLC determiniert. Auch die OD wurde in regelmäßigen Abständen bei 600nm bestimmt, um eine Kontamination des Reaktionsansatzes auszuschließen. Der Versuchsaufbau ist in der folgenden **Abbildung 22** skizziert:

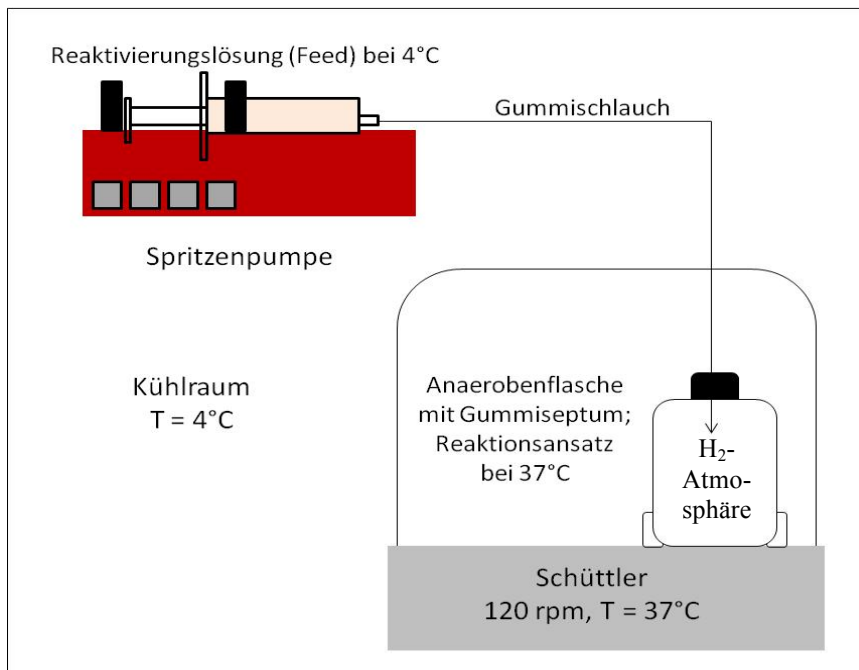


Abbildung 22: Experimenteller Aufbau des Fed-Batch-Ansatzes zur Realisierung des Gesamtprozesses mit den Enzymen GDHt, PDORI und H₂ase I. Während die Feed-Lösung bei 4°C gelagert wird, findet die Reaktion im Schüttler bei 37°C statt. Feed und Batch bilden ein geschlossenes System, der Kopfraum des Batch-Ansatzes war mit sauerstofffreiem Wasserstoffgas bei leichtem Überdruck gefüllt.

Ein leichter Überdruck des Wasserstoffgases in der Flasche während des gesamten Versuchs machte selbst einen minimalen Sauerstoffeintrag in das System entgegen des Druckgefälles unmöglich. Das Vorliegen des Überdruckes wurde mit jeder manuellen Probenahme insofern aufs Neue bestätigt, da sich der Spritzenzylinder der angesetzten Spritze mit Kanüle nach dem Durchstechen des Gummiseptums von selber ausfuhr.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Kapitel 4 werden die experimentellen Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Dabei werden zunächst die Ergebnisse der Produktion aller Mikroorganismen mit den jeweils darin enthaltenen Enzymen beschrieben. Aufbauend darauf umfasst das Kapitel die Ergebnisse der Entwicklung der synthetischen Produktionsverfahren.

4.1 Produktion und Aufreinigung des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym

4.1.1 Ergebnisse der Konstruktion des Expressionssystems

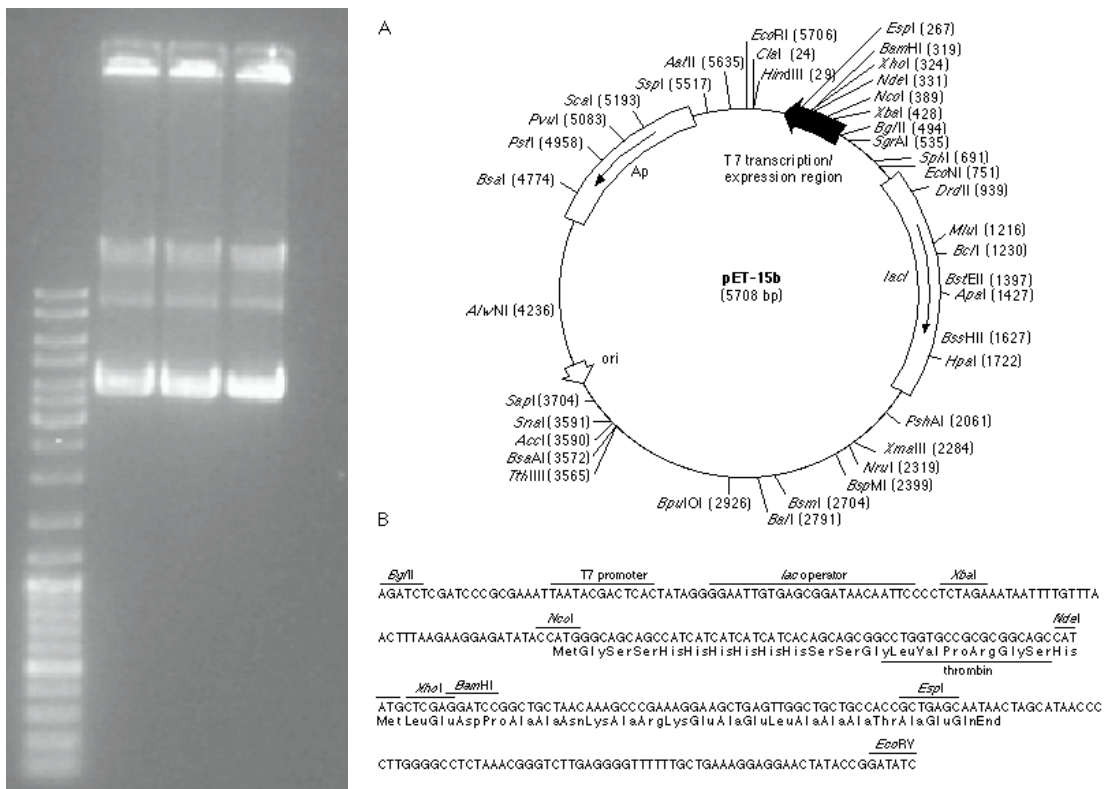


Abbildung 23: Links: 1%iges Agarosegel mit isolierten pET15b-Expressionsektoren. Sie treten in den drei üblichen Konformationen (linear, zirkulär und supercoiled) auf. Rechts: Oben (A) eine Karte des pET15b-Vektors, unten (B) die Multiple-Cloning-Site (MCS) mit den zur Zielgeninsertion verwendeten Restriktionsschnittstellen XhoI/BamHI (dritte Zeile) und dem dadurch N-Terminal gelegenen 6x-His-Tag (zweite Zeile). Quelle: Novagen.

Die **Abbildung 23** zeigt links die erfolgreiche Isolierung des „leeren“ pET15b Vektors in seinen drei Formen (zirkulär, linear und superhelikal), welcher aus *E. coli* DH5 α erfolgreich isoliert wurde. Rechts im Bild (A) ist der Vektor und dessen MCS (B) mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen dargestellt. Der Expressionsplasmid pET15b wurde für diese Arbeit gewählt, da er dem Zielgen ein N-Terminales His-Tag anfügt und seinem Wirt eine Ampicillinresistenz verleiht.

Abbildung 24 zeigt die erfolgreiche Amplifikation des Zielgens YqhD und die erfolgreiche Linearisierung des Vektors durch Restriktion und Dephosphorylierung. Beide DNA-Fragmente sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Rechts neben dem Marker sind der linearisierte Vektor und ganz rechts das Amplifikat aufgetragen.

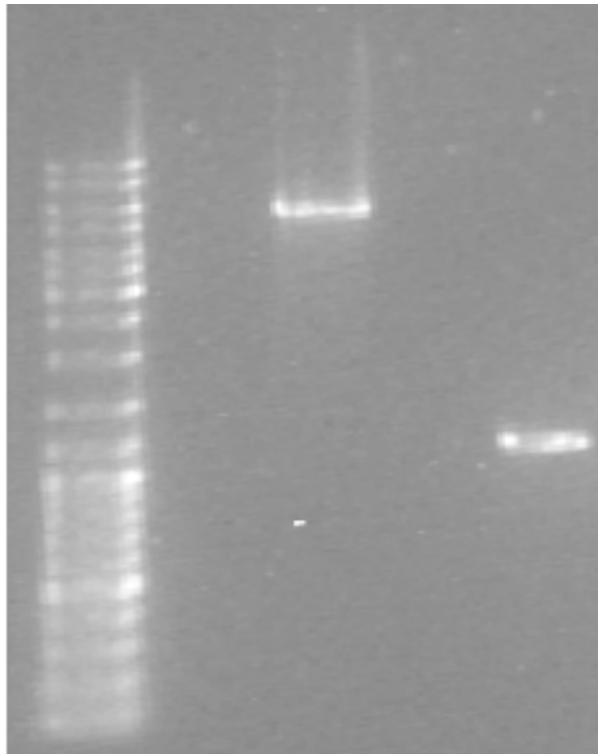


Abbildung 24: 1%iges Agarosegel mit links Marker, mittig dem linearisierten und dephosphorylierten pET15b-Vektor (5700bp) und rechts dem PCR-Produkt (1200bp). Beide DNA-Fragmente sind bereits mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und für die Ligation vorbereitet. Aufgrund der Dephosphorylierung des Vektors kann sich dieser nicht rezirkulieren und erscheint somit nur als einzelne Bande (lineare Konformation) ohne die Banden der zirkulären und superhelikalen Konformation.

In **Abbildung 25** sind auf einem 1%igem Agarosegel der Ligationsansatz ohne Pfu-Ligase und mit Pfu-Ligase dargestellt.

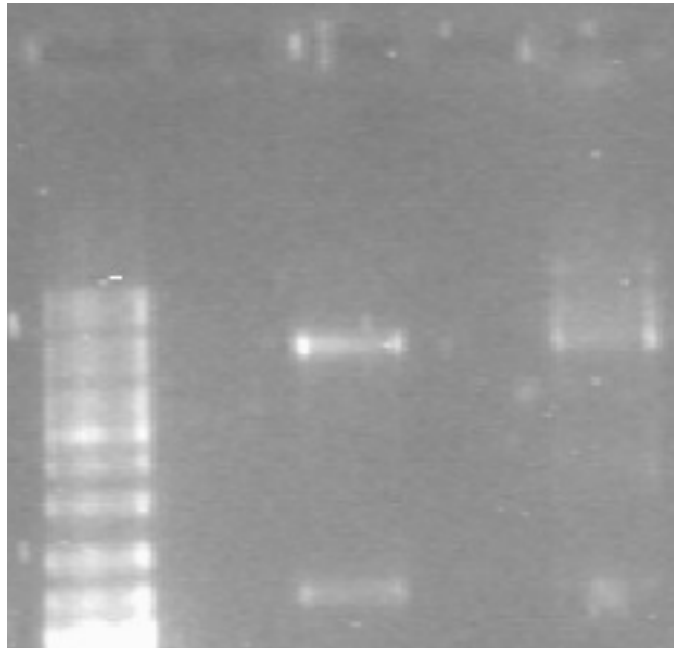


Abbildung 25: 1%iges Agarosegel mit links Marker, mittig einem Kontrollansatz mit einem vorbereiteten DNA-Fragment (Vektor und PCR-Produkt) ohne Zugabe von Ligase und rechts dem Ligationsansatz (DNA-Fragmente unter Einwirkung von Ligase). Rechts erkennbar sind die drei Konformationen (linear, zirkulär, superhelikal) des ligierten Plasmids, welche bei dem Kontrollansatz fehlen.

Rechts neben dem Marker ist der Reaktionsansatz ohne Ligase zu sehen, wobei die obere Bande den immer noch linearen Vektor repräsentiert, während die untere Bande das nicht eingebaute PCR-Produkt darstellt. Ganz rechts außen weist der Ligationsansatz auf Höhe des PCR-Amplifikats eine viel schwächere Bandenausprägung auf, was für die Ligation und der daraus folgenden Abnahme der Amplifikatkonzentration spricht. Das Ligationsprodukt findet sich in sehr geringer Konzentration oberhalb der Plasmidbande als zirkulärer Plasmid, in seinen drei Formen wieder (linear, zirkulär, superhelikal). Somit wurde die Konstruktion des Expressionsvektors erfolgreich abgeschlossen.

Die folgende **Abbildung 26** stellt die Ergebnisse der Transformation und Reisolierung aus den rekombinanten Klonen dar. In der linken Bildhälfte aufgetragen zwischen zwei Markern finden sich Transformanten von *E. coli* BL21 (expression-host) von denen zwei von vier den erfolgreich ligierten Vektor (Zielgen *YqhD* + Vektor pET15b)

aufwiesen (gerahmt). In der rechten Bildhälfte aufgetragen sind die Transformanten *E. coli* DH5 α (cloning-host), von denen vier Klone den Vektor nebst inseriertem Zielgen aufwiesen.

Die rekombinanten Expressionssysteme für die Produktion eines His-Tag tragenden Propandioloxydoreduktase-Isoenzym waren somit erfolgreich konstruiert.

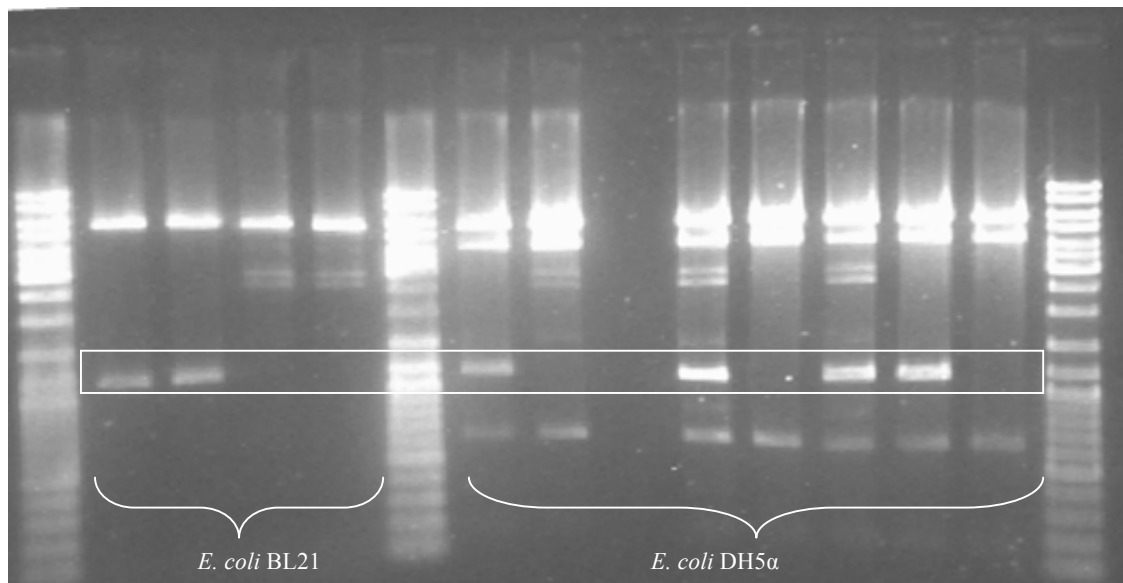


Abbildung 26: 1%iges Agarosegel mit pET15b-Vektoren, welche nach erfolgreicher Transformation in *E. coli* BL21 bzw. *E. coli* DH5 α isoliert wurden. Da das Ausstreichen der transformierten Kultur auf antibiotikahaltigem Selektivmedium das Wachstum von zwei verschiedenen Transformanten zulässt (Klone mit pET15b-Vektoren ohne Insertion und Klone mit pET15b-Vektoren mit Insertion), enthalten nur einige der Transformanten den gewünschten Vektor (gerahmt).

4.1.2 Expressionsergebnis

Die **Abbildung 27** zeigt die Proteinfraktionen einer induzierten und einer zur Kontrolle durchgeführten nicht-induzierten Kultivierung. Deutlich hebt sich die PDORI-Bande der induzierten *E. coli* BL21 – Zellen bei 40kDa von allen anderen Banden hervor. PDORI wurde somit erfolgreich expremiert.

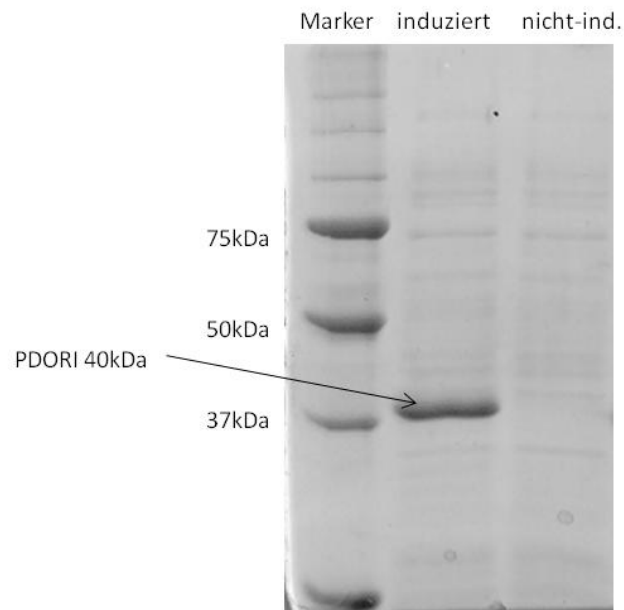


Abbildung 27: 12%ige SDS-Page mit links Marker, mittig dem zellfreien Proteinextrakt des IPTG-induzierten PDORI-Produzenten (*E. coli* BL21) und rechts einem Kontrollansatz des PDORI-Produzenten ohne IPTG-Induktion. Deutlich hebt sich die Bande bei 40kDa des PDORI (mittig) hervor.

4.1.3 Analytische Enzymaufreinigung

Mittels einer kleinen affinitätschromatographischen Säule (Nickel-NTA-Spin Column, Fa. Qiagen) wurde in diesem Versuch die His-Tag-Funktionalität des rekombinanten Enzyms verifiziert. **Abbildung 28** stellt rechts neben dem Marker die gesamte Proteinfraktion nach Zellaufschluss dar, mit der ausgeprägten PDORI-Bande bei 40kDa nebst diversen anderen Proteinbanden verschiedenster molekularer Massen. Rechts daneben ist der Durchlauf (Flow Through) des Aufreinigungsschritts zu sehen, in welchem die Konzentration der PDORI bereits signifikant gesunken ist, die Konzentration der anderen Proteine dagegen unverändert bleibt. Reste an durchgelaufener PDORI resultieren aus der geringen Ladekapazität der Nickel-NTA-Säule. Rechts außen ist die aufgereinigte, eluierte Fraktion (verglichen mit den anderen beiden Fraktionen in doppelter Konzentration) zu sehen. Es wurde hiermit gezeigt, dass die Aufreinigung der PDORI mittels His-Tag Nickel-NTA-Chromatographie gelingt.

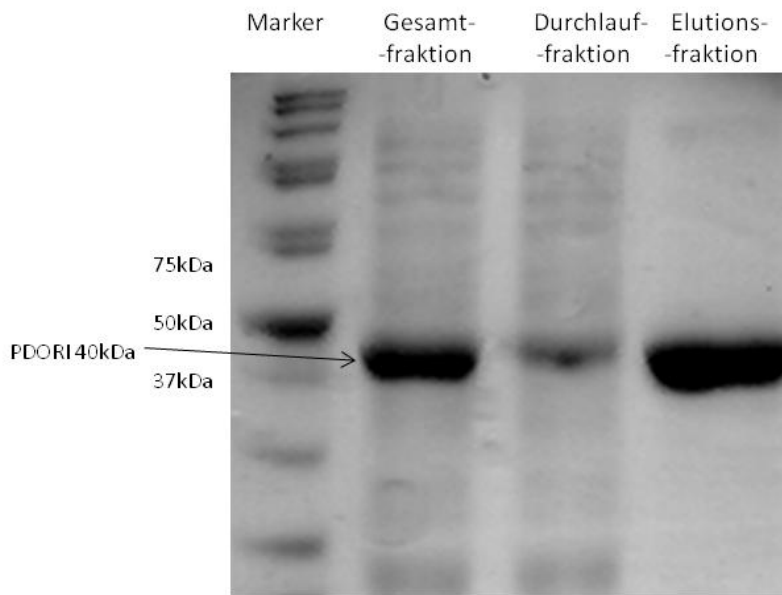


Abbildung 28: 12%ige SDS-Page mit links Marker, rechts daneben die gesamte Proteinfraktion des zellfreien Extrakts, rechts daneben der Durchfluss (zellfreier Extrakt mit weitgehend entferntem PDORI) und ganz rechts die Elutionsfraktion (reines PDORI).

4.1.4 Zellaufschluss *E. coli*

Um ein optimales Verfahren für den Zellaufschluss von *E. coli* durchführen zu können, wurde die freigesetzte Proteinmenge über der Ultraschallzyklenzahl ermittelt. Dabei betrug jeder Ultraschallzyklus 30s Beschallung gefolgt von 2min beschallungsfreier Kühlung. **Tabelle 13** zeigt die Proteinfreisetzung für *E. coli*.

Tabelle 13: Freigesetzte Proteinkonzentration pro Ultraschallzyklus (Mittelwert von Triplikaten).

Zyklus:	1	2	3	4	5	6
Protein [mg/mL]	0,39	0,76	1,1	1,05	1,2	1,2

Es zeigt sich, dass *E. coli*-Biomasse bereits nach drei Zyklen nahezu vollständig aufgeschlossen vorliegt. Weitere Zyklen erhöhen die Proteinkonzentration nur gering. Nach drei Zyklen wurde eine volumetrische Aktivität von 2,52U/mL ermittelt, was einer spezifischen Aktivität von 2,29U/mg Protein im zellfreien Extrakt entspricht. Vorbereitend für die folgende präparative Aufreinigung wurden für den Aufschluss von *E. coli* stets drei Zyklen verwendet.

4.1.5 Präparative Enzymaufreinigung (FPLC), Fällung und Umpufferung

Die folgende **Abbildung 29** stellt das Ergebnis einer Enzymaufreinigung mittels Affinitätschromatographie und FPLC dar. Es ist eine ca. 4 stündige Aufreinigungsprozedur dargestellt, wobei die Extinktion (Absorbtion Units, AU) bei 256nm über der Zeit in Minuten dargestellt ist. Zu erkennen ist zunächst ein Basisliniendrift, der sich nach ca. 20min ebnet. Während dieser Zeit wurde das Ethanol, in welchem das Säulenmaterial bei Nicht-Betrieb gelagert wurde, durch den Equilibrierungspuffer aus der Säule verdrängt. Nach Erreichung der horizontalen Basislinie und Beladung der Säule mit zellfreiem Enzymextrakt, ist ein Anstieg der Basislinie zu verzeichnen, welcher sich in einen Peak mit einer Retentionszeit von 40min Länge erstreckt. Hierbei werden jene Proteinfraktionen detektiert, die nicht in der Säule adhären, sondern direkt ausgetragen werden.

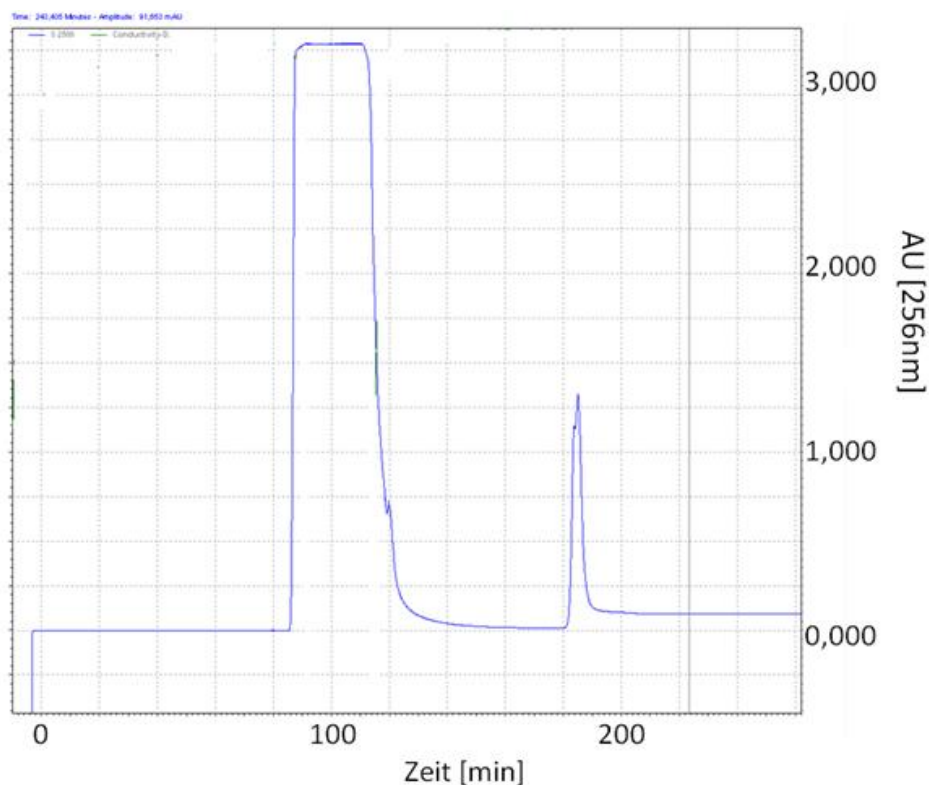


Abbildung 29: Durchlauf- und Elutions-Peaks der präparativen Enzymaufreinigung des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym (His-Tag) mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie.

Nach erneuter Erreichung der Basislinie durch Zugabe des Waschpuffers ist nach Einleitung des Elutionspuffers ein Elutionspeak mit einer Retentionszeit von ca. 10min zu erkennen, bei welchem es sich um das Histidin-getagte Propandioloxydoreduktase-Isoenzym handelte. Klar erkennbar in dieser Abbildung ist die relative Schärfe des Peaks (Verhältnis Höhe zu Breite). Durch das eingesetzte Verfahren gelingt es binnen einer kurzen Zeitspanne das gesamte gebundene Proteinmaterial in einem geringen Volumen, also hoch konzentriert, zu eluieren. Das Eluat mit einem Volumen von 10mL enthielt eine Proteinkonzentration von ca. 5mg/mL. **Abbildung 30** stellt auszugsweise verschiedene Fraktionen des Aufreinigungsprozesses dar.

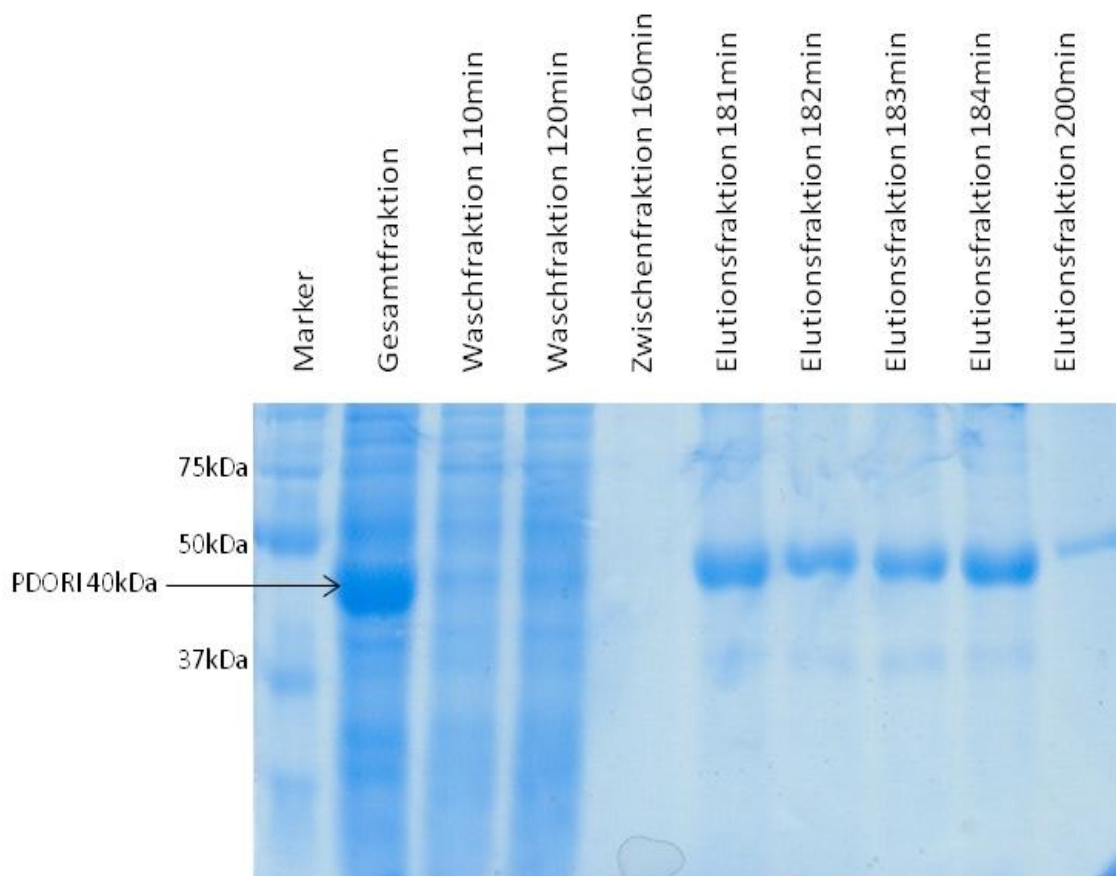


Abbildung 30: Verschiedene Fraktionen des FPLC-Aufreinigungsprozesses.

Ganz links ist der Proteingrößenmarker aufgetragen, rechts daneben die Gesamtfraction mit dem klar erkennbar überexprimierten Protein Propandioloxydoreduktase-Isoenzym. Die dritte und vierte Auftragung von links stellen zwei Fraktionen aus dem ersten Peak (Durchlaufpeak) dar, welche das überexprimierte Enzym nicht mehr enthalten, da es an die Ni-NTA-Säule gebunden wurde, wie in der Abbildung klar erkennbar. Es folgt eine

Auftragung der Fraktion nach Erreichen der Basislinie, in welcher sich keine Proteine mehr befinden, da sie zu diesem Zeitpunkt als ungebundene Fraktion die Säule verlassen haben, oder gebunden am Säulenmaterial fixiert sind. Die Auftragungen sechs bis neun stellen die aufgereinigten Fraktionen dar. Die Banden des Zielproteins bei ca. 40kDa sind klar zu erkennen. Ganz rechts aufgetragen ist die Fraktion nach Erreichung der Basislinie bei Elutionsende, in welcher sich lediglich geringe Mengen an Zielprotein befinden.

Bei Fällung des Eluats mit Ammoniumsulfat ließ sich nach ca. 30min ein weißer Niederschlag beobachten, welcher das Zielprotein ausmachte und sich bei Zentrifugation als Pellet absetzte. Nach Verwerfung des Überstands ließ sich das Pellet in beliebigem Puffer lösen. Eine finale Konzentration von 10mg/mL zur Lagerung bei -20°C wies nach 24h praktisch keine Aktivitätsverluste auf.

4.2 Aktivitätsbestimmung des aufgereinigten Propandioloxido-reduktase-Isoenzym

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym unter verschiedenen Aspekten und Variationen diverser Parameter dargestellt. Alle Experimente sind auf die Applikation des Enzyms zwecks optimaler Integration in den mehrstufigen enzymatischen Produktionsprozess ausgelegt. Es werden neben spezifischer Aktivität der Hin- und Rückreaktion Aktivitätsänderungen unter Puffer-, pH-Wert- und Temperaturvariation betrachtet. Ferner wird die Langzeitstabilität des Enzyms nach Lagerung analysiert. Die Analyse endet mit Messungen der Aktivität nach mehrstündiger Inkubation des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen, um den Aktivitätsverlust nach mehrstündiger Prozessintegration zu untersuchen.

4.2.1 Spezifische Aktivität von Hin- und Rückreaktion

Sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion des aufgereinigten PDORI wurden bei 37°C mittels beschriebenen Enzymaktivitätsassays analysiert. In den folgenden Abbildungen sind die spektrometrischen Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 340nm

dargestellt, die Aufschluss über die NADPH-Entwicklung, bzw. dessen Verbrauch geben.

Abbildung 31 zeigt die Aktivitätsmessung des PDORI bezüglich seiner Rückreaktion.

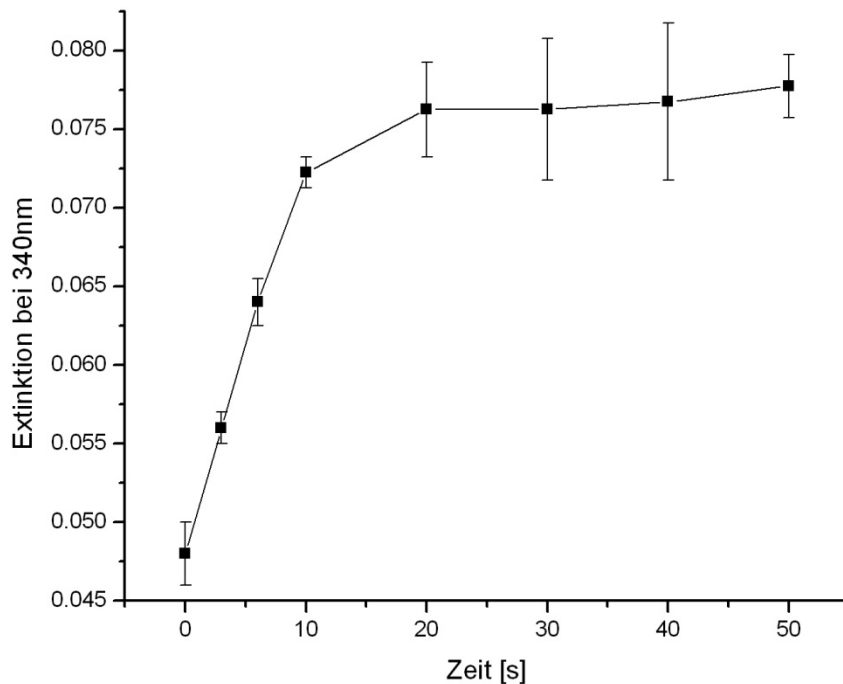


Abbildung 31: Verlauf der NADPH-Entwicklung bei der Aktivitätsmessung des PDORI bezüglich der Rückreaktion, bei welcher NADP und 1,3PDO zu NADPH und 3HPA transformiert werden. Klar erkennbar ist der anfänglich lineare Bereich der Steigung mit geringer Standardabweichung, welcher nach verhältnismäßig kurzer Zeit bereits unter hoher Standardabweichung abflacht. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde sich ausschließlich auf den linearen Bereich bezogen.

Hierbei wird 1,3-PDO mit NADP zu NADPH und 3-HPA umgesetzt, eine Reaktion, wie sie in natürlichen Zellen in umgekehrter Reihenfolge auftritt, und daher hier als Rückreaktion bezeichnet wird. Die Extinktion der NADPH-Entwicklung wurde spektrophotometrisch erfasst und ist in **Abbildung 31** dargestellt. Dabei verläuft die NADPH-Entwicklung innerhalb der ersten Sekunden linear, weshalb hier von einem ausreichenden Substratüberschuss ausgegangen werden kann und die spezifische Aktivität über diesen Bereich zu ermitteln ist. Auffällig ist hierbei des Weiteren die geringe Standardabweichung der einzelnen Messungen zueinander, welche nach Abflachen des Graphs deutlich zunimmt. Daher wurden nur die ersten Sekunden der

Messung zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität verwendet. Bei einem Reaktionsvolumen von 250 μ L und einem Enzymsuspensionsvolumen von 4 μ L mit einer Konzentration von 1mg/mL, ergibt sich eine spezifische Enzymaktivität von 1,46U/mg für die Rückreaktion des PDORI.

Im Gegensatz zur Rückreaktion ist die Hinreaktion in der Literatur, abgesehen von wenigen Untersuchungen, praktisch nicht beschrieben. **Abbildung 32** zeigt die Aktivitätsmessung des PDORI bezüglich dessen Hinreaktion.

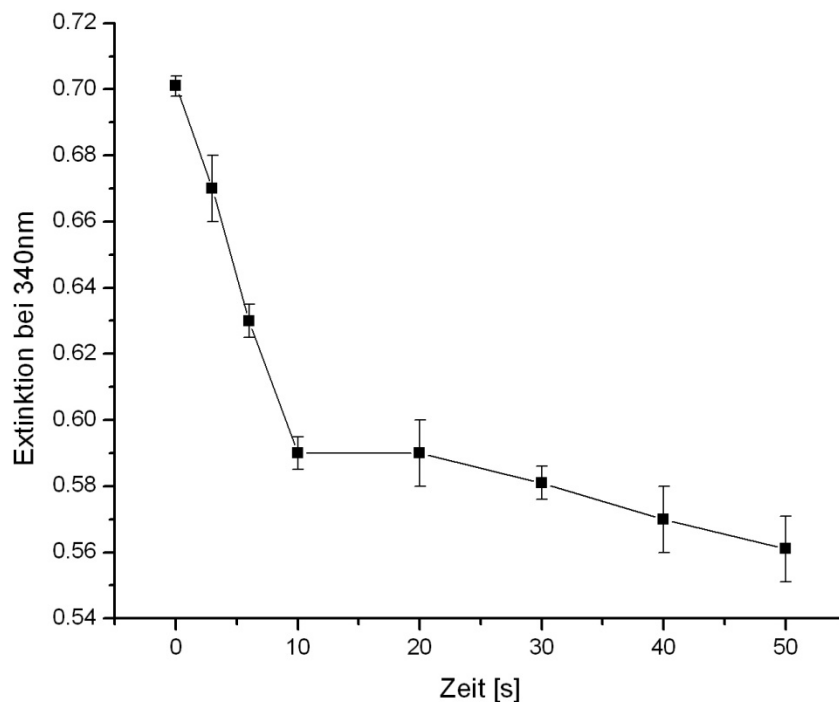


Abbildung 32: Verlauf des NADPH-Verbrauchs bei der Aktivitätsmessung des PDORI bezüglich der Hinreaktion, bei welcher NADPH und 3-HPA zu NADP und 1,3-PDO transformiert werden. Klar erkennbar ist der anfänglich lineare Bereich der Steigung mit geringer Standardabweichung, welcher nach verhältnismäßig kurzer Zeit bereits unter hoher Standardabweichung abflacht. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde sich ausschließlich auf den linearen Bereich bezogen.

Hierbei wird 3-HPA mit NADPH zu NADP und 1,3-PDO umgesetzt, eine Reaktion also in jener Richtung, wie sie in natürlichen Zellen auftritt, und daher hier als Hinreaktion bezeichnet wird. Die Extinktion des NADPH-Verbrauchs wurde spektrophotometrisch erfasst und ist in **Abbildung 32** dargestellt. Die NADPH-Konzentration wurde hierfür im Experiment auf 0,1mM eingestellt, sodass sich eine Basisextinktion von 0,7 AU bei 340nm ergibt. Auch in diesem Fall verläuft der

NADPH-Konsum innerhalb der ersten Sekunden linear, weshalb hier von einem ausreichenden Substratüberschuss ausgegangen und die spezifische Aktivität über diesen Bereich ermittelt werden kann. Auffällig ist auch hier die geringe Standardabweichung der einzelnen Messungen zueinander, welche nach Abflachen des Graphs deutlich zunimmt. Bei einem Reaktionsvolumen von 250 μ L und einem Enzymsuspensionsvolumen von 4 μ L mit einer Konzentration von 1mg/mL, ergibt sich eine spezifische Enzymaktivität von 5,22U/mg für die Hinreaktion des PDORI.

Die Aktivität der Rück- und Hinreaktionen ergeben relativ zueinander ein Verhältnis von 1:3,6. Somit ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die Hinreaktion 3,6mal schneller als die Rückreaktion, wodurch kinetisch die Bildung von 1,3PDO verglichen mit der Bildung von 3-HPA bevorzugt wird. Über die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts zwischen 1,3-PDO und 3-HPA kann diese kinetische Betrachtungsweise keinen Aufschluss geben.

Auf ganz ähnliche Ergebnisse kommen Ahrens et al. (2000) und Daniel et al. (1995), welche ein reaktionskinetisches Verhältnis für die Propandioloxidoreduktase (PDOR) von *Klebsiella pneumonia* von 3,95 ermittelten. Dabei setzten Daniel et al. (1995) Propionaldehyd als Substrat für die PDOR ein. Es wurde in jenen Experimenten gezeigt, dass die PDOR mit Propionaldehyd 21% der Aktivität wie mit 3-HPA aufweist. Desweiteren wurde das Verhältnis der Reduktionsgeschwindigkeit von Propionaldehyd zu der Dehydratationsgeschwindigkeit von 1,3-PDO als 0,83 ermittelt. Durch die mathematische Kombination dieser Ergebnisse wurde ein Korrekturfaktor von $0,83/0,21 = 3,95$ errechnet, um die Reaktionsgeschwindigkeiten von Hin- und Rückreaktion vergleichen zu können (Daniel et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde somit die Größenordnung des Korrekturfaktors (3,6...3,95) für das zur Propandioloxidoreduktase (PDOR) strukturell und physiologisch stark kongruente Enzym Propandioloxidoreduktase-Isoenzym (PDORI) bestätigt.

4.2.2 Pufferbezogene Aktivität

Um negative Effekte des Puffers auf die Aktivität abzuwägen, wurden neben dem in Literatur verwendeten Carbonatpuffer auch andere Puffer wie Hepes oder TrisHCl getestet. Die folgende **Abbildung 33** stellt die Testergebnisse dar:

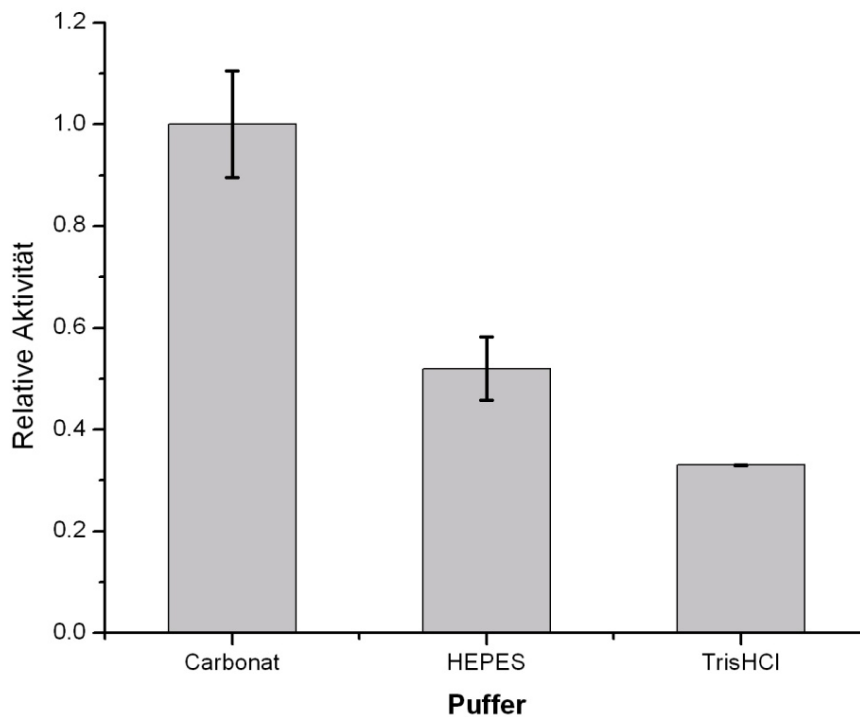


Abbildung 33: Relative Aktivität des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym bei pH8 in verschiedenen Puffern, bezogen auf die Aktivität im Carbonatpuffer.

Deutlich erkennbar sind die negativen Einflüsse des HEPES- und Trispuffers. Während der HEPESpuffer die in Carbonat gemessene Aktivität um 48% auf 52% absenkt, wird die katalytische Aktivität des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym im Trispuffer sogar um 67% auf 33% herabgesetzt. Grund dafür ist v. a. die Blockierung des aktiven Zentrums des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym (Schomburg et al. 2012). Offenbar können bestimmte Puffermoleküle, je nach Konformation und Konfiguration mit der katalytisch aktiven Region interagieren und dadurch die Aktivität des Enzym herabsetzen. Carbonatpuffer dagegen enthalten lediglich kleine Ionen wie HCO_3^- und H^+ bzw. H_3O^+ , sodass eine Besetzung bzw. Blockierung des aktiven Zentrums ausgeschlossen werden kann.

In **Abbildung 34** sind die beiden Puffermoleküle dargestellt. Für die Prozessrealisierung wurde im Folgenden auf Carbonatpuffer zurückgegriffen, um die größtmögliche Aktivität des Propandioloxidoreduktase-Isoenzym zu gewährleisten.

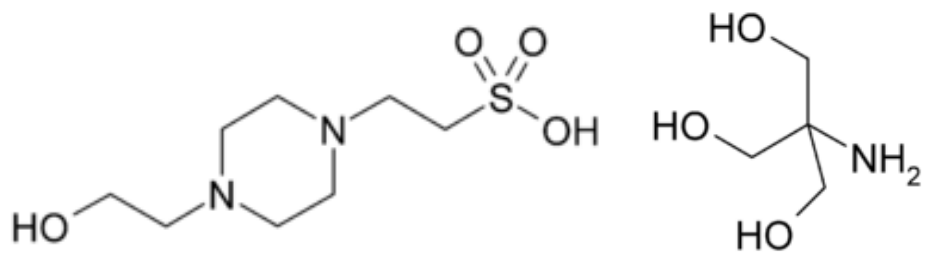


Abbildung 34: HEPES-Molekül (links) und TRIS-Molekül (rechts).

4.2.3 pH-wertabhängige Aktivität

Die folgende **Abbildung 35** illustriert die relative Aktivität des Propandioloxidoreduktase-Isoenzyms in Abhängigkeit vom pH-Wert.

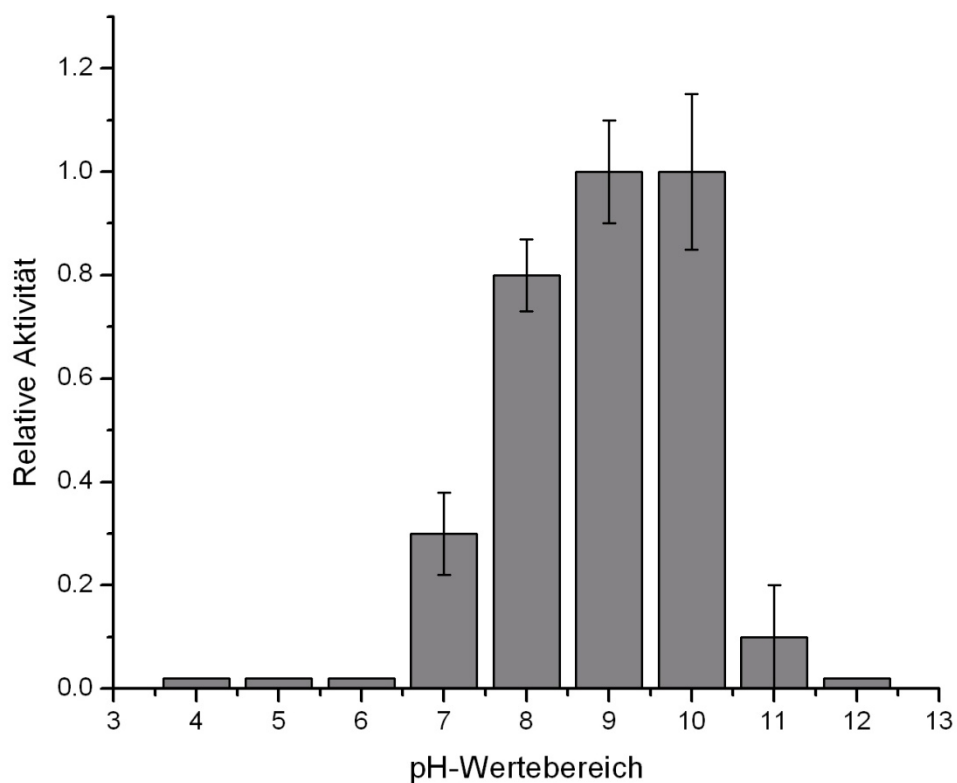


Abbildung 35: Relative Aktivität des Propandioloxidoreduktase-Isoenzyms bei verschiedenen pH-Werten.

Vermessen wurde die Rückreaktion von 1,3-PDO und NADP zu 3-HPA und NADPH in Reaktionsansätzen mit pH-Werten zwischen 3 und 13. Die entsprechende Hinreaktion (3-HPA und NADPH zu 1,3-PDO und NADP) konnte nicht durchgeführt werden, da 3-HPA nur bei pH-Werten zwischen 6 und 8 stabil vorliegt (Vollenweider 2003). Die **Abbildung 35** zeigt eine maximale Aktivität im leicht basischen Bereich bei pH9-10. Bei pH-Werten oberhalb von pH10 sinkt die Aktivität dagegen drastisch ab auf ca. 10% der Maximalaktivität. In neutralem Milieu weist das Enzym jedoch eine, wenn auch leicht verringerte Aktivität auf. So liegt diese bei pH8 bei ca. 80%, bei pH7 immerhin noch bei 30%. In sauren Medien konnte dagegen praktisch keine Aktivität detektiert werden. Die Ergebnisse lassen zunächst auf eine optimale Prozessintegration des Propandioloxydoreduktase-Isoenzym bei pH9-10 schließen. Allerdings muss dabei die Instabilität von 3-HPA bei basischen pH-Werten berücksichtigt werden.

Abbildung 36 stellt die verschiedenen Formen von 3-HPA und dessen Derivate in saurem, neutralem und basischem Milieu dar, ohne dabei auf pH-Werte einzugehen, da das dynamische Gleichgewicht ebenfalls von Temperatur und Stoffmengenkonzentration abhängig ist.

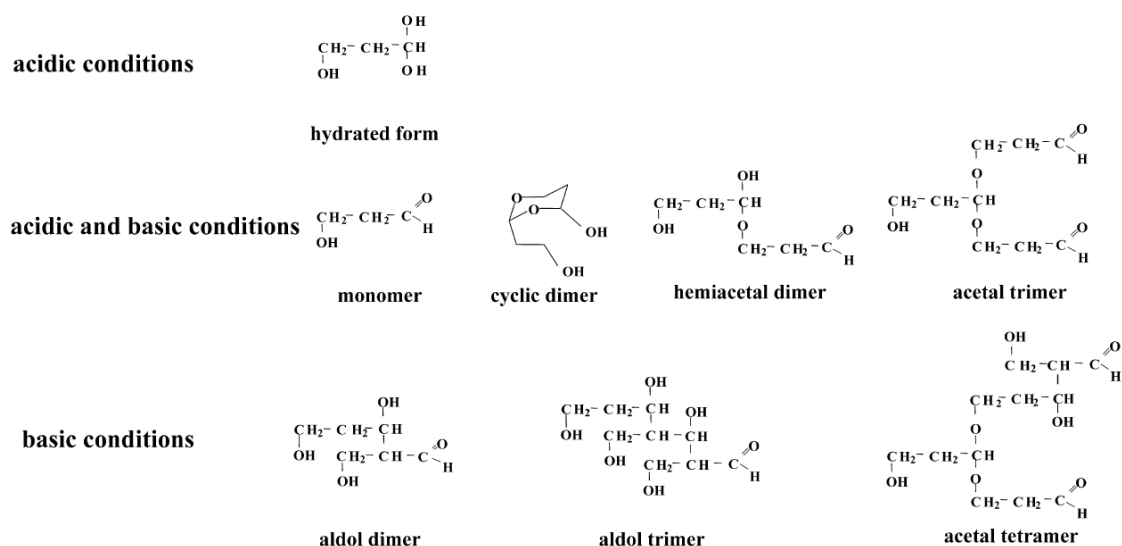


Abbildung 36: Verschiedene Formen von 3-HPA unter sauren, neutralen und basischen Bedingungen; Abbildung aus Vollenweider (2003).

Für die optimale Prozessrealisierung der enzymatischen Transformation von 3-HPA zu 1,3-PDO mit Hilfe des im basischen Milieu aktiven Propandioloxydoreduktase-Isoenzym musste somit ein Kompromiss mit einem im neutralen Milieu stabilen

Substrat gefunden werden. Für die Prozessrealisierung wurde ein pH-Wert von acht gewählt, da hier die Aktivität des Propandioloxidoreduktase-Isoenzyms immerhin noch bei ca. 80% der Maximalaktivität liegt und gleichzeitig nur leicht basische und somit substratfreundliche Bedingungen herrschen.

4.2.4 Aktivitätsverlust nach Lagerung

Nach der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie und anschließender Fällung/Umpufferung mittels $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ folgte zum einen die Lagerung des Enzyms in Carbonatpuffer, bzw. die Gefriertrocknung und anschließende Lagerung in kristalliner Form. Die Lagerung erfolgte in beiden Fällen bei 4°C, -20°C sowie -80°C. Die folgenden Abbildungen (**Abbildung 37** und **Abbildung 38**) zeigen den Aktivitätsverlust des mehrtägig gelagerten Propandioloxidoreduktase-Isoenzyms. Wie aus **Abbildung 37** und **Abbildung 38** ersichtlich, ist unabhängig von der Lagerungsmethode und Lagerungstemperatur grundsätzlich nach einem Tag ein allgemeiner Aktivitätsverlust von ca. 10% zu verzeichnen.

Für gefriergetrocknete Enzyme folgt nach spätestens vier Tagen ein völliger Verlust der Aktivität, während für in Puffer gelöste Enzyme die Aktivität nach vier Tagen noch 70-80% beträgt. Ganz offensichtlich scheint das in Puffer gelöste Enzym durch diesen stabilisiert zu werden, unabhängig davon, ob dieser Puffer flüssig (bei 4°C) oder fest (-20/-80°C) vorliegt. Zu beachten ist hierbei, dass offensichtlich nicht der Gefriertrocknungsvorgang selber das Enzym schädigt, da die Aktivität nach 24 Stunden, wie bereits erwähnt, noch relativ hoch ist. Vielmehr führt möglicherweise das Fehlen der Hydrathülle der Enzyme bei Lagerung in kristalliner Form zu unerwünschten Reaktionen von Aminogruppen der Enzyme untereinander, was die Aktivität negativ beeinflusst. Auch könnte diese Schädigung schlicht durch mechanische Krafteinwirkungen der nicht-gepufferten Kristalle untereinander auftreten. Als die geeignete Lagerungsmöglichkeit erwies sich somit die Lagerung in 50mM Carbonatpuffer, wobei die Temperatur erstaunlicherweise relativ wenig Einfluss auf die Aktivität nach 12 Tagen hat (65% für -20°C, 60% für -80°C, 55% für 4°C). Erst nach 14 Tagen tritt der Unterschied deutlicher hervor, wobei für die gefrorene Form die Aktivitäten noch mindestens 60% betragen, während die suspendierte Form auf ca. 40% absank.

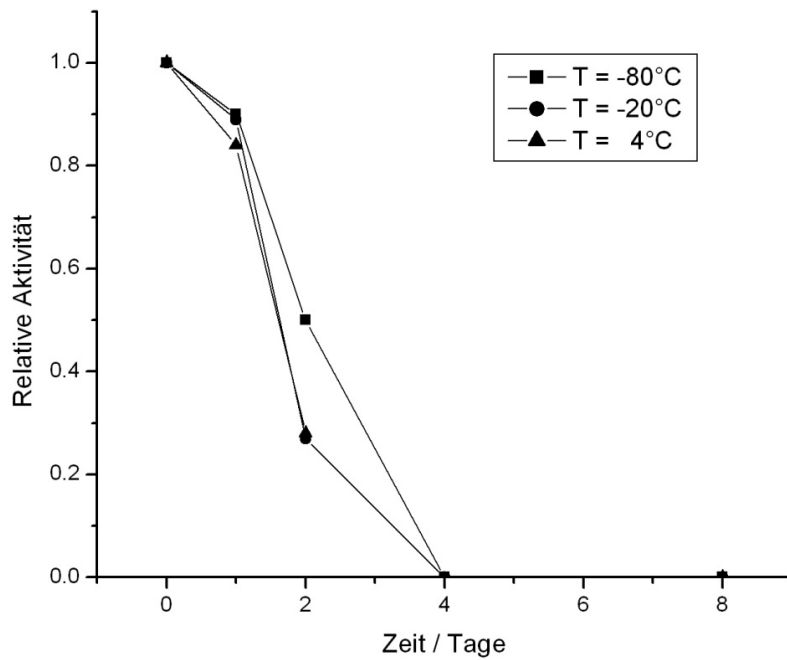


Abbildung 37: Aktivitätsverlust nach Lagerung des aufgereinigten Enzyms bei verschiedenen Temperaturen nach erfolgter Gefriertrocknung.

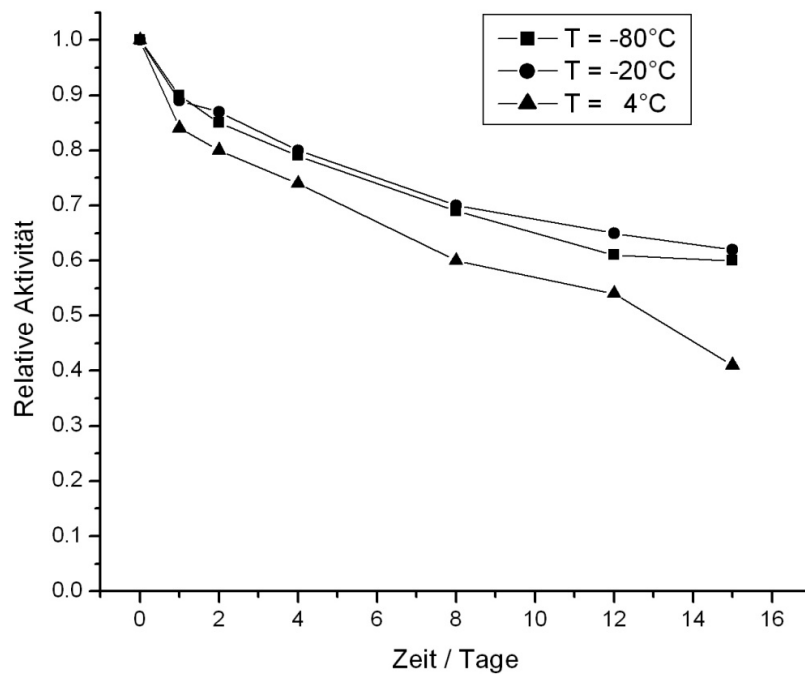


Abbildung 38: Aktivitätsverlust nach Lagerung des aufgereinigten Enzyms in 50mM Carbonatpuffer (pH 8) bei verschiedenen Temperaturen.

4.2.5 Aktivitätsverlust nach Anwendung

Um die Stabilität des Propandioloxydoreduktase-Isoenzyms nach mehrstündigem Einfluss verschiedener Temperaturen zu analysieren, wurde das Enzym den Temperaturen 37°C, 45°C und 50°C ausgesetzt und anschließend die Aktivität jede Stunde einheitlich bei 37°C bestimmt. **Abbildung 50** verdeutlicht den Aktivitätsverlust des Enzyms über der Zeit nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen.

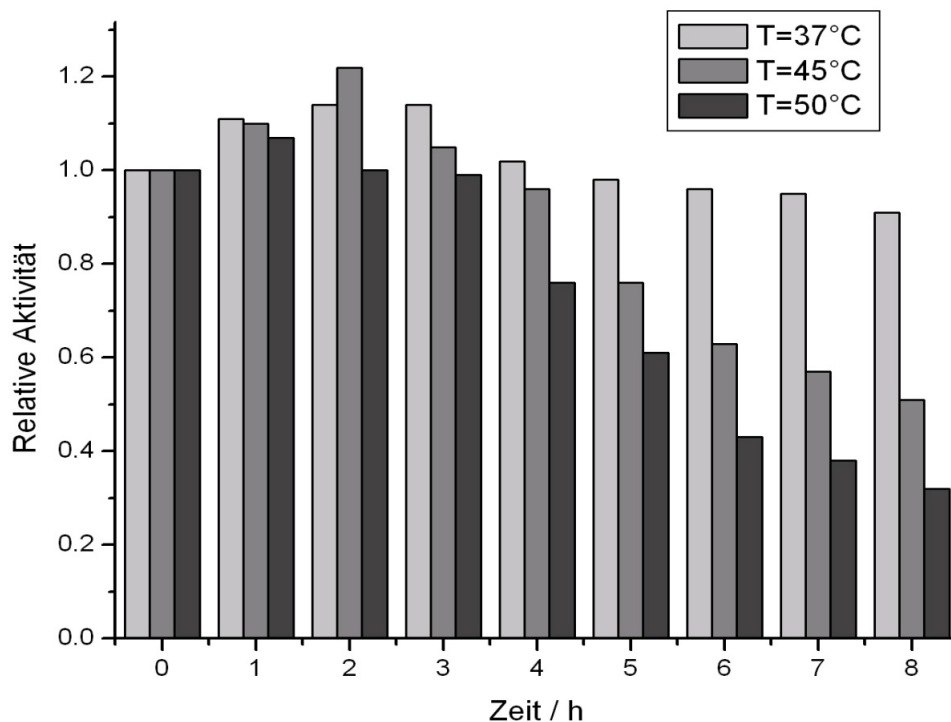


Abbildung 39: Relative Aktivität des Propandioloxydoreduktase-Isoenzyms nach null- bis achtstündiger Inkubation bei 37°C, 45°C und 50°C. Die Aktivität wurde anschließend einheitlich bei 37°C gemessen.

Dabei wird die anfängliche Aktivität nach null Stunden Inkubation bei den entsprechenden Temperaturen als Referenzaktivität angenommen, sodass sich für alle drei Testsysteme eine relative Aktivität von 1,0 ergibt.

Nach einer Stunde der Temperatureinflüsse von 37°C, 45°C und 50°C auf das Enzym erwies sich die Aktivität des Enzyms als gesteigert gegenüber dem Referenzsystem ohne vorige Inkubation. Anscheinend wird das Enzym nach kurzzeitiger Inkubation nahe der natürlichen Reaktionstemperatur in eine aktivere Form versetzt. Nach einer

Stunde verzeichnet die Aktivität des Enzyms für 37°C-Lagerung 110%, während sich für 45°C 108% und für 50°C 105% ergeben.

Interessanterweise setzt sich dieser Effekt für die Aufbewahrung bis Stunde zwei bei 37°C und 45°C sogar noch fort. Während die relative Aktivität nach Lagerung bei 37°C für zwei Stunden auf 114% steigt, erreicht die relative Aktivität des Enzyms für Inkubation bei 45°C sogar einen maximalen Wert von 122%. Die Aktivität des Enzyms, welches für zwei Stunden 50°C ausgesetzt war, sank dagegen zurück auf 100%.

Ab der dritten Stunde der Inkubation erweist sich allerdings deutlich die Verwendung der niedrigeren Temperatur als vorteilhaft. Dieser Trend setzt sich schließlich bis hin zu Stunde acht fort, bei welcher die Aktivität des Enzyms nach Verwendung bei 37°C noch ca. 90% aufweist, während die Aktivitäten des höheren Temperaturen ausgesetzten Enzyms auf 50% bzw. 30% sinken.

Das Experiment gibt wichtige Aufschlüsse zur Realisierung des mehrstufigen Produktionsprozesses in Kombination mit der thermophilen Wasserstoffhydrogenase I aus *P. furiosus*, deren temperaturabhängiges Aktivitätsoptimum bei 90°C liegt und mit abnehmender Temperatur stetig sinkt. Es zeigt sich, dass grundsätzlich eine Reaktionstemperatur von 50°C für das Propandioloxidoreduktase-Isoenzym möglich ist, wobei die Aktivität in den ersten drei Stunden bei ca. 100% verbleibt, bis Stunde acht jedoch auf 30% sinkt. Bei einer Reaktionstemperatur von 45°C kann sogar für die ersten vier Stunden von einer Aktivität von 100% ausgegangen werden (vgl. **Abbildung 39**), welche bis Stunde acht auf 50% sinkt. Für 37°C kann die Aktivität sogar für den gesamten betrachteten Zeitraum als ca. 100% betrachtet werden.

Es zeigt sich also, dass ein Transformationsschritt, welcher lediglich für drei Stunden andauert, durchaus bei 45°C vollzogen werden sollte, während eine Transformation für acht Stunden oder mehr bei 37°C ausgeführt werden sollte. Diese Ergebnisse wurden im Folgenden für die Realisierung der Transformation mit integrierter Kofaktorregeneration berücksichtigt.

4.3 Produktion von *P. furiosus*-Biomasse und H₂ase

Um ausreichende Mengen an H₂ase I aus *P. furiosus* isolieren zu können, wurde ein großtechnisches Fermentationsverfahren im 300L-Maßstab entwickelt. Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Fermentationsprozessentwicklung zusammengefasst.

4.3.1 Upstream Processing und Vorkultur

Das Upstream Processing wurde für die *P. furiosus*-Fermentation in der vorliegenden Arbeit gegenüber etablierter Verfahren (Biller 2002) erheblich vereinfacht. In mehreren Vergleichsfermentationen konnte gezeigt werden, dass eine Mediensterilisation, sowie die Sterilisation von Reaktor und Equipment keinen Einfluss auf die Qualität des Fermentationsergebnisses hatte. Unabhängig davon, ob Reaktor und Medium sterilisiert wurden oder nicht, wurden die gleichen *P. furiosus*-Biomasse-mengen ohne Kontaminationserscheinungen erzeugt. Diese Experimente haben die extrem niedrige Wahrscheinlichkeit einer Kontamination der *P. furiosus*-Fermentation belegt, welche bei hochselektiven Bedingungen wie 90°C abläuft. Diese Erkenntnisse, die im 1,5L-Reaktor gewonnen wurden, vereinfachten in der Folge das Scale-up und die großtechnische Produktion von *P. furiosus*-Biomasse erheblich.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Varianten der Vorkulturvorbereitung untersucht und verglichen. Die konventionelle Methode, welche in Literatur und Praxis weit verbreitet ist (Biller 2002, Krahe 1998, Kube 2007), sah das Ansetzen einer 100mL Kultur in einer Anaerobenflasche vor. Diese wurde über Nacht bei 90°C und pH6,5 bei leichtem Schütteln inkubiert und nach 24h in einen 1,5L-Reaktor übertragen. Ein alternatives, in der vorliegenden Arbeit entwickeltes Vorkulturmanagement sah die Übertragung eines einzelnen Cryo-Beads (Roti®-Store) direkt in den 1,5L-Reaktor vor. Sowohl in Literatur als auch in der vorliegenden Arbeit experimentell bestätigt, resultiert das erste, konventionelle Verfahren in einer langen Lag-Phase im 1,5L-Reaktor von 8h und mehr. Es folgt die exponentielle Phase von weiteren 8h im 1,5L-Reaktor bis zur Erreichung der maximalen Zelldichte.

Im Gegensatz dazu resultierte die direkte Inokulation des 1,5L-Reaktors durch das Cryo-Bead in einer extrem kurzen Lag-Phase von lediglich 2 bis maximal 3 Stunden im 1,5L-Reaktor. Das heißt, durch das Überspringen der 100mL-Vorkultur ließ sich ein schnellerer und kostensparender Fermentationsprozess im 1,5L-Reaktor erzielen. Auch die Reproduzierbarkeit der durchgeführten Fermentationen ausgehend von der Cryo-Bead-Inokulation war deutlich höher, als nach Inokulation durch eine 100mL-Vorkultur.

Die Gründe für diese durchaus überraschenden Ergebnisse sind vor allem in der mangelhaften Prozesssteuerbarkeit einer 100mL-Kultur zu finden. Weder kann in einer

Anaerobenflasche der pH-Wert exakt bei 6,5 konstant gehalten werden, noch kann das wachstumsbegleitend entstehende Wasserstoffgas, welches die Vitalität des Organismus stark inhibiert, aus der Anaerobenflasche entfernt werden. Obwohl der 1,5L-Reaktor mit einem quantitativen Überschuss an Zellmasse aus der 100mL-Vorkultur inokuliert wurde, ist die Qualität des Inokulums in diesem Fall relativ niedrig, sodass es zu einer achtstündigen Lag-Phase im Reaktor kommt. Stattdessen bringt die Inokulation durch ein einzelnes Cryo-Bead (Roti®-Store) zwar eine sehr geringe Zellmasse mit sich, welche jedoch qualitativ vollständig vital vorliegt.

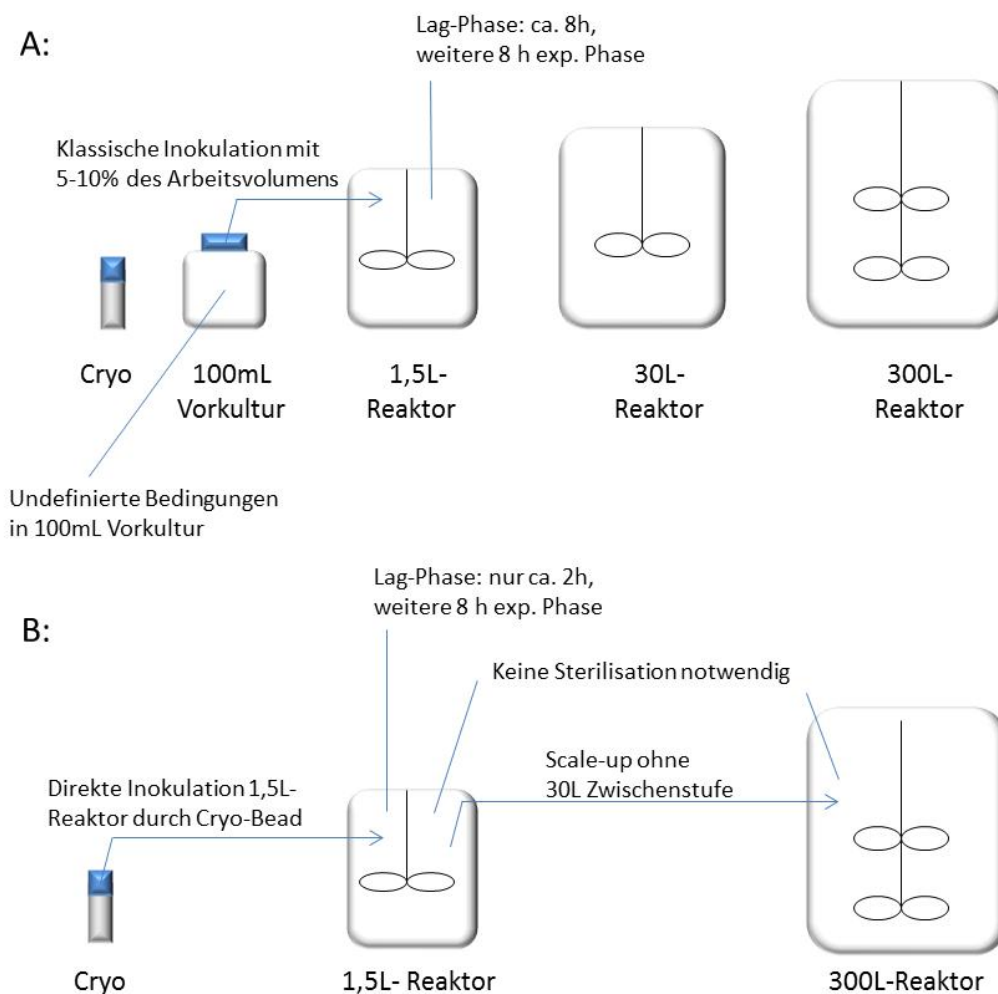


Abbildung 40: Vergleich klassischer (A) und in vorliegender Arbeit angewandter (B) Inokulations- und Scale-up-Strategie.

Diese in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Befunde sind durchaus konträr zum gängigen Vorkulturmanagement zu verstehen, welches von einer Inokulation eines Reaktors mit ca. 5-10% des Reaktorvolumens durch Reinkultur ausgeht (Chieml 2011, Zlokarnik 2005, Storhas 1994). Einen der Gründe für die Inokulation mit 5-10% des Reaktorvolumens wird in der dadurch zusätzlich erzeugten Prävention von Kontamination gesehen (Antranikian 2006). Der quantitative Überschuss der Zielkultur verdrängt hier potentielle Kontaminatoren aus dem entsprechenden Habitat. Da für eine *P. furiosus*-Fermentation, wie zuvor gezeigt, praktisch keine Kontaminationsgefahr besteht, hat die Qualität des Inokulums einen wichtigeren Einfluss auf den Fermentationsverlauf, als die Quantität des Inokulums. Diese Erkenntnis sollte sich im Vorlauf der vorliegenden Fermentationsprozessentwicklung vor allem im Scale-up erneut bestätigen. In **Abbildung 40** werden die Ergebnisse zusammengefasst dargestellt.

4.3.2 Batchfermentation und Scale-up

Ein Scale-up vom 1,5L- über 30L- bis zum 300L-Maßstab wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich durchgeführt. Eine Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0.32 \text{ h}^{-1}$ und eine maximale Zelldichte von $3.2 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$ für Maltose als Substrat und $1 \cdot 10^{10} \text{ mL}^{-1}$ für Stärke als Substrat wurde für alle Scale-up-Stufen nachgewiesen. Für die Kultivierung mit Maltose wurde eine stationäre Phase von ca. fünf Stunden beobachtet, während die Kultivierung mit Stärke im Anschluss an die exponentielle Phase direkt in einer Sterbephase resultierte.

Im Folgenden wurde die Abhängigkeit der Wachstumsentwicklung im 30L-Reaktor vom Übertragungszeitpunkt der 1,5L-Reaktorkultur bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden **Abbildung 41** zusammengefasst.

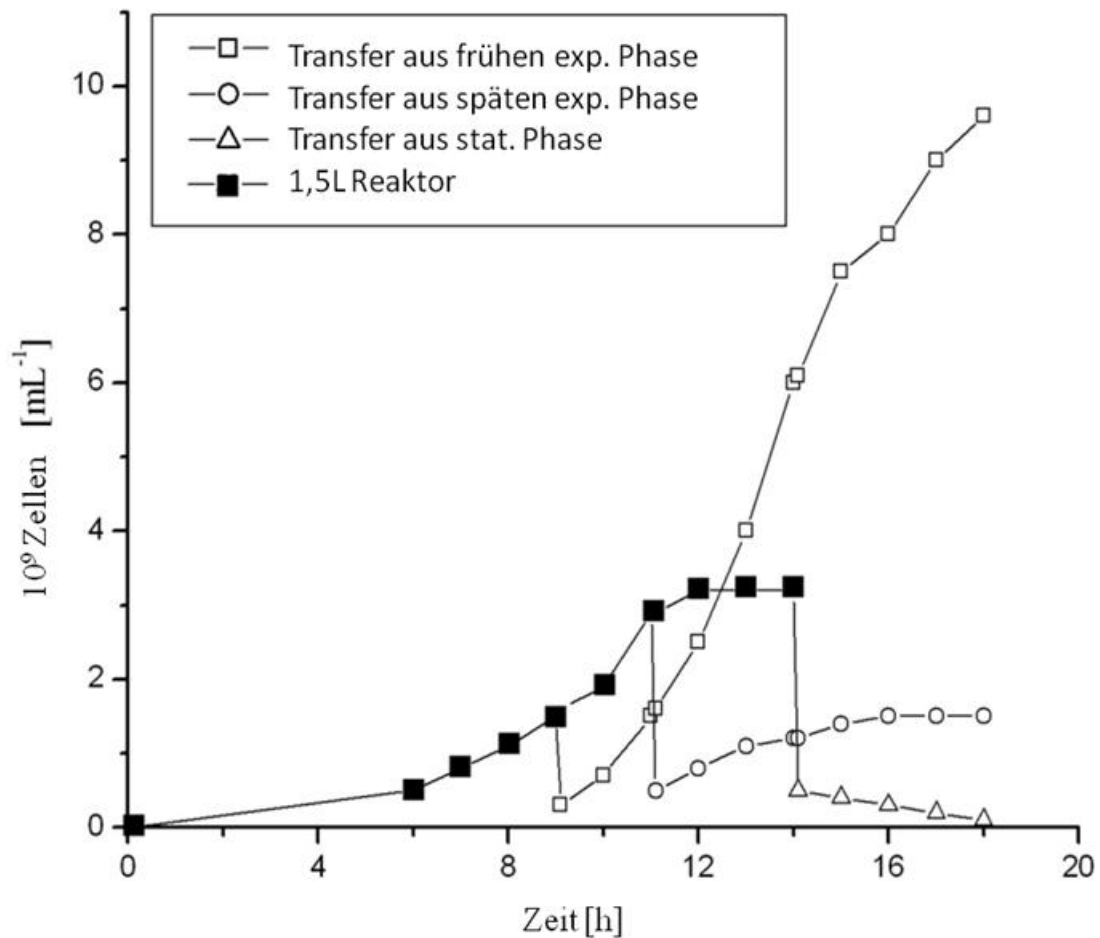


Abbildung 41: Ergebnisse von zeitpunktabhängigen Überimpfungsexperimenten einer 1,5L-Kultur in einen 30L Reaktor. Die starke Abhängigkeit des Fermentationsverlaufs im 30L-Reaktor vom korrekt gewählten Zeitpunkt der Übertragung der 1,5L-Kultur wird hier demonstriert.

Wie in der oben dargestellten **Abbildung 41** demonstriert wird, liegt eine starke Abhängigkeit der 1,5L-Kulturübertragung von der eigenen Wachstumsphase für den Erfolg der Folgefermentation vor. Ein Überimpfen aus der späten exponentiellen Phase, sowie aus der stationären Phase, führt zu einem verminderten bis gar keinem Wachstum im nächst größeren Reaktor. Der Kulturübertrag aus der frühen exponentiellen Phase führt im nächst größeren Reaktor zu einem hervorragenden Fermentationsergebnis. Ohne eine erneute Lag-Phase aufzuweisen, setzt sich die exponentielle Phase im 30L-Reaktor nach Kulturübertragung direkt fort. Die Experimente stellen ein weiteres Mal die enorme Wichtigkeit der Qualität (Vitalität der Zellen) gegenüber der Quantität des Inokulums der Vorkultur heraus. Obwohl aus der frühen exponentiellen Phase heraus lediglich halb so viele Zellen ($1.5 \cdot 10^9$ Zellen mL^{-1}) wie aus der späten exponentiellen

Phase ($\sim 3 \cdot 10^9$ Zellen mL^{-1}) übertragen wurden, erfolgt nur hier ein erfolgreicher Fermentationsverlauf.

Ferner wird in der oben dargestellten Abbildung die unterschiedliche Auswirkung der C-Quelle im Medium verdeutlicht. Während im 1,5L-Reaktor ein maltosehaltiges Medium verwendet wurde und eine maximale Zellzahl von $3 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$ erreicht wurde, wird mit dem stärkehaltigen Medium im 30L-Reaktor eine Zellzahl von 10^{10} mL^{-1} erreicht.

Für die Realisierung des Scale-ups wurde der volumetrische Leistungseintrag (P/V) als konstant zu haltendes Kriterium gewählt. Da der generierte Wasserstoff im Medium als die Hauptlimitationsquelle für das Wachstum von *P. furiosus* gilt (Krahe 1998), wurde das Strippen des Wasserstoffs durch konstant gehaltenen volumetrischen Leistungseintrag (P/V) in Kombination mit konstant gehaltener volumetrischer Begasungsrate (vvm) angestrebt. In der folgenden **Tabelle 14** sind die sich daraus ergebenden Rührerdrehzahlen für den 1,5L-Reaktor, den 30L-Reaktor und den 300L-Reaktor dargestellt. Die Begasungsrate von 0,4vvm ((70% N_2 /30% CO_2)) wurde stets konstant gehalten.

Tabelle 14: Scale-up und konstanter Leistungseintrag (P/V).

Reaktorvolumen [L]	vol. Energieeintrag [kW/m ³]	Rührerdurchmesser [cm]	Rührerumdrehungen [rpm]
1.5L	9,12	4	1800
30L	9,02	10	900
300L	8,99	25	430

Wie zuvor bereits geschildert, ließen mehrere Faktoren darauf schließen, dass die Qualität des Inokulums wesentlich entscheidender für die erfolgreiche Fermentation im nächstgrößeren Reaktor war, als die Quantität des Inokulums. Aus diesem Grund stellte sich während des Scale-ups die Frage, ob an dem klassischen Scale-up-Schema 1,5L→30L→300L festgehalten werden musste, oder ob ein stark vereinfachtes Scale-up-Verfahren von 1,5L→300L ebenfalls ausreichend wäre. In mehreren Vergleichsexperimenten wurde diese Frage eingehend untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 42** festgehalten.

In **Abbildung 42** ist der geringe Einfluss der Einbeziehung bzw. Auslassung der 30L-Zwischenstufe für den gesamten Scale-up-Prozess zu erkennen. Nach acht Stunden Kultivierung im 1,5L-Reaktor wird die Kultur zum einen in einen 30L-Reaktor

übertragen (eckige Markierungen), zum anderen direkt in einen 300L-Reaktor übertragen (runde Markierungen). Die 30L-Kultur, die nach weiteren vier Stunden die Mitte der exponentiellen Phase erreicht, wird anschließend ebenfalls in einen 300L-Reaktor übertragen. Es zeigt sich, dass die beiden 300L-Fermentationen nahezu gleichzeitig ihren Höhepunkt mit der maximalen Zelldichte von 10^{10} mL^{-1} erreichen.

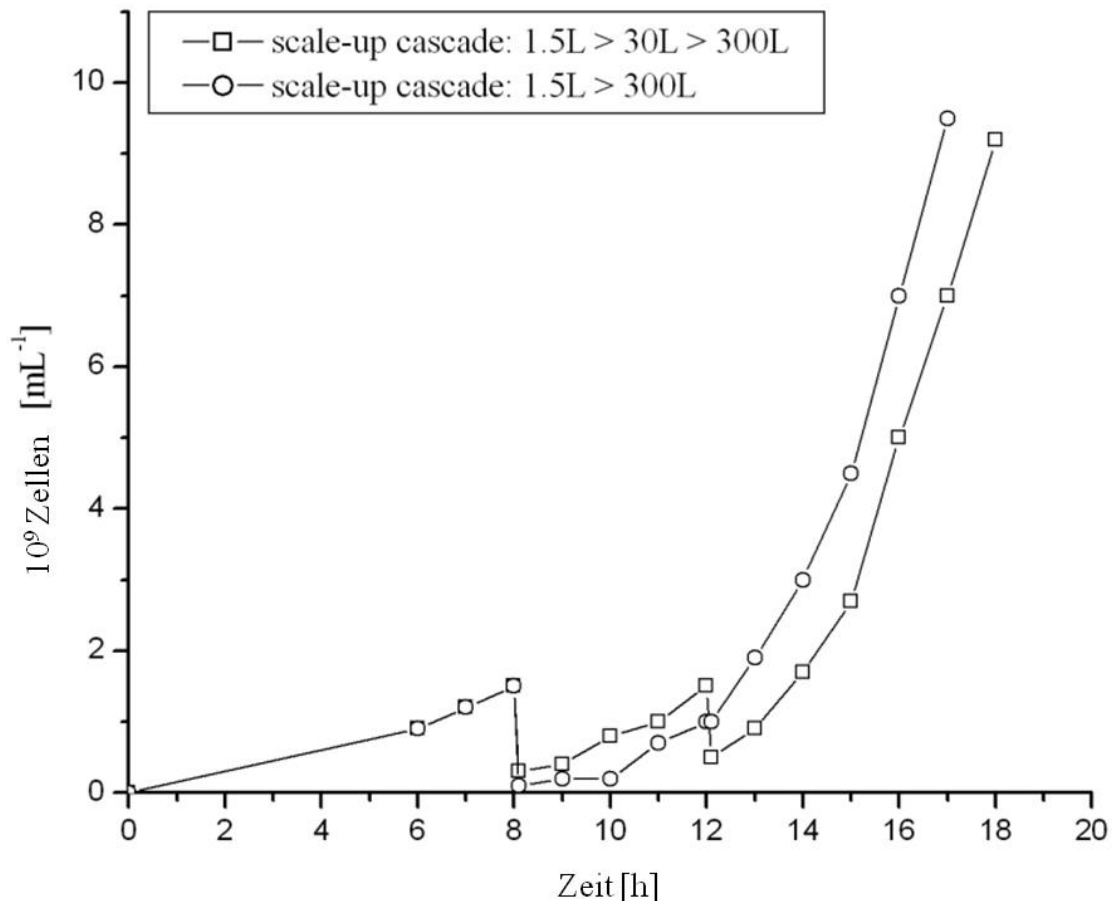


Abbildung 42: Vergleichsexperimente zweier Scale-up-Kaskaden: 1,5L → 30L → 300L vs. 1,5L → 300L. Es zeigt sich, dass die Auslassung der intermediären Stufe 30L sogar leicht bessere Ergebnisse erzielt, als die Einbeziehung der Zwischenstufe von 30L.

Es scheint fast irrelevant für den Fermentationsprozess im 300L-Reaktor, ob das Inokulum in Form von 1,5L-Kultur etwas früher, oder in Form von 30L etwas später zur Verfügung steht. Entscheidend für beide Prozesse ist wieder der Phasenzeitpunkt der Vorkultur für eine erfolgreiche Fermentation im 300L-Reaktor.

Nach den beiden oben dargestellten alternativen Verfahren erreicht das einfachere von beiden (1,5L → 300L) das Ende der exponentiellen Wachstumsphase sogar noch eine Stunde zügiger, als das komplexere und vermeidlich konventionellere Verfahren (1,5L

→ 30L → 300L). Es zeigt sich somit, dass die generellen Regeln, wie z. B. dass das Inokulum 5-10% des Fermentationsvolumens betragen sollte, nicht immer ihren optimalen Zweck erfüllen. Die Animpfung von weniger als 1% führt hier zu einem mindestens genauso guten wenn nicht besseren Ergebnis. Dies vereinfachte die folgende großtechnische Produktion von *P. furiosus*-Biomasse wesentlich, da auf das Betreiben eines zusätzlichen 30L-Reaktors verzichtet werden konnte.

4.3.3 Ernte der Biomasse und Aufreinigung der H₂ase I

Die *P. furiosus*-Biomasse konnte mittels des Separators aus dem 300L-Reaktor innerhalb einer Stunde geerntet werden. Während der Ernte wurde die Zellzahl im Ein- und Auslass des Separators bestimmt. Die Zellzahlrelation zwischen Aus- und Einlass betrug hierbei 3%. Die Biofeuchtmassenausbeute betrug nach abgeschlossenem Erntevorgang 4,1g/L. Bei einem Arbeitsvolumen von 200L betrug die Biomasseproduktion somit 820g pro Batchansatz.

Um ein optimales Verfahren für den Zellaufschluss von *P. furiosus* durchführen zu können, wurde die freigesetzte Proteinmenge über der Ultraschallzyklenzahl ermittelt. Dabei betrug jeder Ultraschallzyklus 30s Beschallung, gefolgt von 2min beschallungsfreier Kühlung. Die folgende **Tabelle 15** zeigt die Proteinfreisetzung für *P. furiosus*.

Tabelle 15: Freigesetzte Proteinkonzentration pro Ultraschallzyklus (Mittelwert von Triplikaten).

Zyklus:	1	2	3	4	5	6
Protein [mg/mL]	1,10	2,98	3,70	5,39	5,35	5,32

Es zeigt sich, dass *P. furiosus*-Biomasse im Gegensatz zu *E. coli*-Biomasse erst nach vier Zyklen nahezu vollständig aufgeschlossen vorliegt. Weitere Zyklen erhöhen die Proteinkonzentration nur gering. Nach vier Zyklen wurde eine volumetrische Aktivität von 3,30U/mL ermittelt, was einer spezifischen Aktivität von 0,61U/mg Protein im zellfreien Extrakt entspricht. Vorbereitend für die folgende präparative Aufreinigung wurden für den Aufschluss *P. furiosus* stets vier Zyklen verwendet. Die höhere Zyklenzahl für *P. furiosus*-Biomasse gegenüber des Biomasseaufschlusses von *E. coli* kann vor allem durch die stark erhöhte Biomassekonzentration in der für den Aufschluss verwendeten Probe erklärt werden. Um eine ähnliche volumetrische

Aktivität für *P. furiosus* nach Zellaufschluss zu erhalten, wurde die Zelldichte im Falkon während des Aufschlusses etwas erhöht. Die Ultraschallintensität wurde dadurch massenspezifisch verringert.

Es folgte die anschließende Aufreinigung der H₂ase I durch einen Projektpartner. Die Daten der Aufreinigungsergebnisse sind in der folgenden **Tabelle 16** zusammengefasst. Es wird an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass diese Daten innerhalb des Projekts „Fundamentals for synthetic biological systems“ in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner (Katharina Götz, unveröffentlichte Daten, Arbeitsgruppe Professor A. Liese, Institut für Technische Biokatalyse, Technische Universität Hamburg-Harburg) erhoben und anschließend gemeinsam genutzt wurden.

Tabelle 16: Ergebnisse der H₂ase I-Aufreinigung aus 9g *P. furiosus*-Biomasse

	spez. Akt. [U/mg]	totale Akt. [U]	Ausbeute [%]	Aufreinigungsfaktor [%]
Zellfreier Extrakt	0.5	86	100	1
Isolierte Fraktion	3.1	82	84	6.2

Mittels der einstufigen Ionenaustauschchromatographie wurde ein ähnlich reines Enzymisolat erreicht, wie durch Adams et al. gezeigt wurde (Adams et al. 1988, Adams et al. 2001). Die enzymatische Aktivität wurde durch die Methylviologen-Methode bestimmt (Mertens et al. 2003).

4.3.4 Allgemeine Diskussion des Produktionsverfahrens

Die Kultivierung des hyperthermophilen Archaeons zwecks Biomassegewinnung birgt diverse Schwierigkeiten in diversen Kategorien, die bei Kultivierung bakterieller Mikroorganismen weniger stark auftreten. So ist der Organismus relativ empfindlich gegenüber Sauerstoff, was sich mikroskopisch in Lyseerscheinungen äußert. Bei nicht ausreichender Begasung oder zu geringer Durchmischung wird der produzierte Wasserstoff nicht ausgestrippt, was sich ebenfalls empfindlich auf die Zelldichte des Wachstums auswirkt. Limitiert wird die ohnehin geringe maximale Zelldichte ($3,5 \cdot 10^9$ Zellen/mL für Maltosemedium und 10^{10} Zellen/mL für Stärkemedium) v. a. durch Produkthemmung und nicht durch Substratlimitierung, wodurch Fed-Batch-Verfahren zur Erreichung höherer Zelldichten kategorisch ausgeschlossen werden können. Das Hauptproblem stellt während des Scale-ups das Nicht-Vorhandensein einer stationären

Phase des Organismus dar, was sich darin äußert, dass direkt nach Beendigung der exponentiellen Phase die Absterbephase eingeleitet wird. Dies stellt den Fermentationsingenieur vor die Herausforderung, zu entscheiden, wann die Übertragung einer Reaktorkultivierung in die nächste Scale-up-Stufe erfolgen soll. Wird mit der Überimpfung zu lange gezögert, stirbt der Organismus trotz optimaler Bedingungen im nächsten Reaktor ab, sofern die Sterbephase bereits eingeleitet wurde.

Als außerordentlich vorteilhaft erweist sich allerdings die geringe Kontaminationsgefahr der Kulturen. Da v. a. die Temperatur von 90°C ein klares Ausschlusskriterium für die meisten in Frage kommenden Kontaminatoren darstellt, konnten die Fermentationen ohne vorherige Reaktorsterilisation gestartet werden. Dies stellt v. a. während des Scale-ups einen großen Vorteil gegenüber Bakterien- oder Zellkulturen dar: Während letztere Stück für Stück in größere Fermentationsvolumina übertragen werden müssen, um die Kontaminationsgefahr zu minimieren und Kontaminationen durch Selektionsdruck der dominierenden Reinkultur entgegen zu wirken, kann der hyperthermophile Organismus *P. furiosus* ohne weiteres von einem 1,5L-Reaktor in einen 300L-Reaktormaßstab übertragen werden, solange die Wachstumsbedingungen ideal vorliegen.

Aus einer einzigen 300L-Fermentation konnten somit 800-1000g Biofeuchtmasse gewonnen und 7500 Units H₂ase I produziert werden. Durch Lagerung der Biomasse bei -80°C konnten keine nennenswerten Aktivitätsverluste festgestellt werden.

4.4 Produktion von Glyceroldehydratase-Systemen

4.4.1 Produktion und Ernte von *L. reuteri* und GDHt-Aktivität

Abbildung 43 zeigt den Fermentationsverlauf zur Biomasseproduktion von *L. reuteri*. Bei Erreichung einer OD von 3,5 wurde der Fermentationsvorgang beendet und die Ernte mittels kontinuierlicher Zentrifugation durchgeführt. Die Gewinnung von 4,02g Biofeuchtmasse pro Liter Fermentationsvolumen ergab nach Ernte der 22L Arbeitsvolumen eine Gesamtausbeute von 88,4g Biofeuchtmasse.

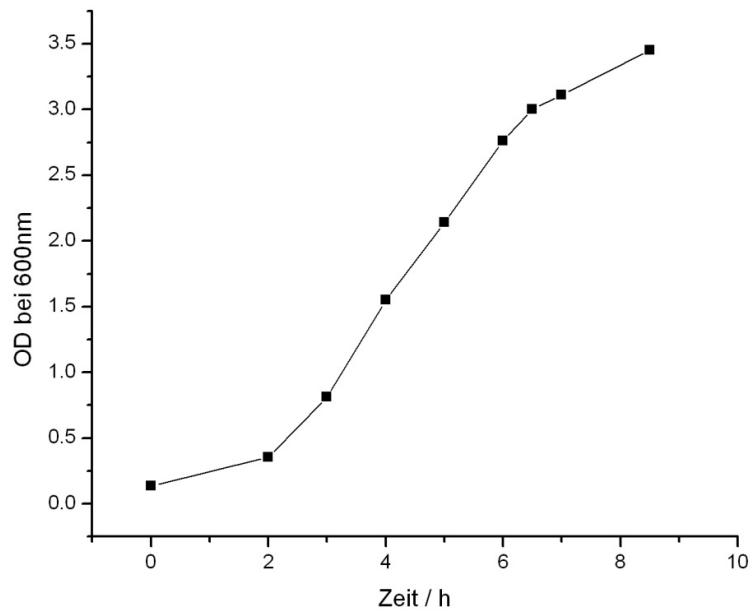


Abbildung 43: Fermentationsverlauf von *L. reuteri* im 30L-Reaktor zwecks GDHt-aktiver Biomassegewinnung.

Zur Durchführung eines optimalen Verfahrens für den Zellaufschluss von *L. reuteri*, wurde die freigesetzte Proteinmenge über der Ultraschallzyklenzahl ermittelt. Dabei betrug jeder Ultraschallzyklus 30s Beschallung gefolgt von 2min beschallungsfreie Kühlung. Die folgende **Tabelle 17** zeigt die Proteinfreisetzung für *L. reuteri*.

Tabelle 17: Freigesetzte Proteinkonzentration pro Ultraschallzyklus, *L. reuteri* (Mittelwert von Triplikaten).

Zyklus:	1	2	3	4	5	6
Protein [mg/mL]	0,27	0,55	0,90	0,89	0,92	0,91

Bereits nach drei Zyklen konnte die *L. reuteri*-Biomasse als nahezu vollständig aufgeschlossen betrachtet werden. Weitere Zyklen erhöhen die Proteinkonzentration nur gering. Nach drei Zyklen wurde eine maximale volumetrische Aktivität von 3,47U/mL ermittelt, was einer spezifischen Aktivität von 3,85U/mg im zellfreien Extrakt entspricht. Mit weiterer Beschallung in Zyklus 4-6 sank die spezifische Aktivität wieder ab. Vorbereitend für den folgenden Einsatz im synthetischen Produktionsverfahren wurden für den Aufschluss von *L. reuteri* stets drei Zyklen verwendet.

4.4.2 Produktion und Ernte von *K. pneumonia* und GDHt-Aktivität

Nach der Kultivierung in Anaerobenflaschen (100mL) bei 37°C und pH7,0 für 24h wurde diese bei einer optischen Dichte von 4,2 (600nm) beendet und die Biomasse von *K. pneumonia* in der Anaerobenbank geerntet. Nach Zentrifugation ergab sich eine Biomasseausbeute von 5,6g Biofeuchtmasse pro Liter.

Während mittels Zellaufschluss durch Ultraschall innerhalb der Anaerobenbank GDHt-Aktivität nachgewiesen wurde, konnte nach Zellaufschluss mittels FastPrep keine entsprechende Aktivität verzeichnet werden. Gründe für das Ausbleiben der Aktivität nach FastPrep-Behandlung könnten vor allem die starken mechanischen Scherungen des Enzyms durch die Matrix darstellen. Ferner könnte lokale Überhitzung innerhalb des entsprechenden Eppendorfgefäßes negative Auswirkungen auf die GDHt-Aktivität mit sich bringen. Ein Sauerstoffeintrag in das Eppendorfgefäß kann aufgrund der technisch korrekten Versuchsdurchführung ausgeschlossen werden.

Die Beschallung mit Ultraschall führte zu der gewünschten Freisetzung an Protein zusammen mit entsprechender Aktivität (vgl. **Tabelle 18**).

Tabelle 18: Freigesetzte Proteinkonzentration pro Ultraschallzyklus, *K. pneumonia*. (Mittelwert von Triplikaten)

Zyklus:	1	2	3	4	5
Protein [mg/mL]	0,13	0,28	0,66	0,67	0,71

Nach drei Zyklen konnte die Proteinmenge als nahezu vollständig freigesetzt betrachtet werden. Auch die spezifische Aktivität wies nach drei Zyklen mit 4,62U/mg ihr Maximum auf.

4.5 Realisierung synthetischer Stoffwechselwege

4.5.1 Biobrick 1: GDHt

Ziel des Teilprojekts „Biobrick 1“ ist die Demonstration der Schwierigkeiten, Möglichkeiten und Grenzen der Aktivitätsaufrechterhaltung einer prozessintegrierten GDHt *in vitro*. Dazu werden im Folgenden die Ergebnisse zweier durchgeführter Ansätze beschrieben:

1. *in vitro* Glycerolkonversion nach Nemeth et al. (2008).
2. Fed-Batch-Ansatz zur GDHt-Regeneration.

Für die gesamte Entwicklung des ersten Prozessschrittes wurde auf verschiedene GDHt-Systeme in Form von zellfreiem Extrakt, anstatt auf aufgereinigtes Enzym zurückgegriffen. Die Gründe hierfür sind die Vermeidung hoher Aktivitätsverluste während der Aufreinigung (Schneider et al. 1970), ein wesentlich einfacherer Reaktivierungsprozess (Tobimatsu et al., 1999) und schließlich die Einsparung der Aufreinigungskosten aus hinsichtlich ökonomischer Gesichtspunkte (Nemeth et al. 2008).

4.5.2 Untersuchungen zum Ansatz nach Nemeth et al. (2008):

In wenigen Minuten andauernden Aktivitätstests kann die Aktivität der GDHt für kurze Zeit beobachtet werden, bevor die Auswirkungen des mechanismusbasierten Suizideffekts die GDHt inaktivieren (Toraya et al. 1977b). Ferner ist es möglich, die Aktivität innerhalb eines Aktivitätstests nach erfolgter Inaktivierung zu regenerieren (Xu et al. 2009). Eine Aufrechterhaltung der GDHt-Aktivität im Rahmen eines mehrstündigen Prozesses ist bis heute nur einmal beschrieben worden (Nemeth et al. 2008). Hier wurde Zellrohextrakt von *K. pneumonia* in einem Membranreaktor einer Glycerolkonzentration von 4g/L ausgesetzt und die entsprechende 1,3-PDO-Bildung dokumentiert. Die Ergebnisse dieses *in vitro* Prozesses von Nemeth et al. (2008) sind in der folgenden **Abbildung 44** dargestellt.

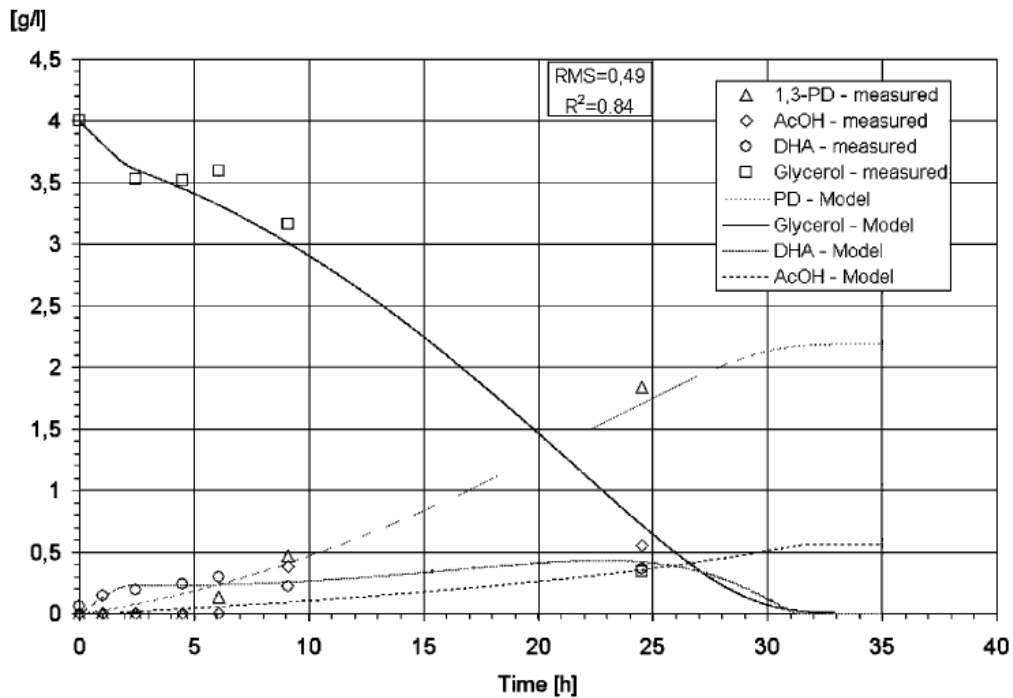


Abbildung 44: Ergebnisse von Nemeth et al. (2008). Durch einen vermeintlichen *in vitro* Prozess (GDHt, GDH, PDOR) wird Glycerol zu 1,3-PDO umgesetzt.

Wie aus vorangestellter **Abbildung 44** ersichtlich, wird das Glycerol (Kästen □) einer anfänglichen Konzentration von 4g/L kontinuierlich konsumiert und 1,3-PDO (Dreiecke Δ) generiert. Die gemessenen Konzentrationen werden mittels Ausgleichkurven gemittelt dargestellt. Die glycerolbezogene 1,3-PDO-Ausbeute beträgt ca. 50% (g/g). Dieses Verhältnis entspricht dem in folgender **Abbildung 45** dargestellten enzymatischen Reaktionsschema:

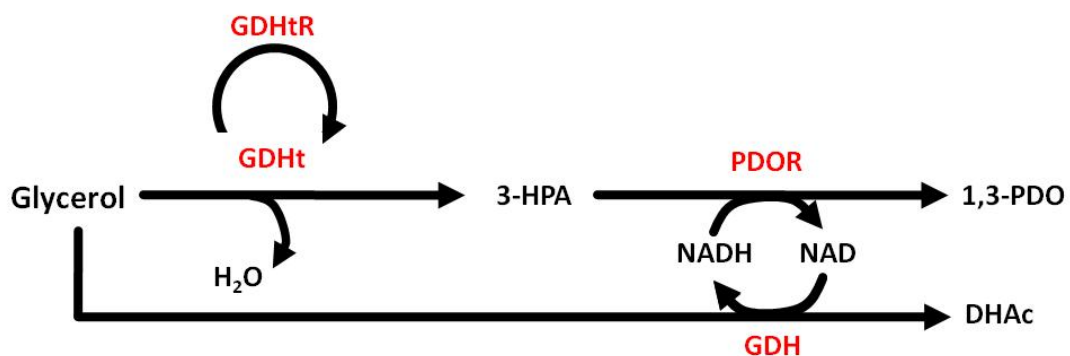


Abbildung 45: Durch Nemeth et al. (2008) angestrebtes Reaktionsschema im Zellrohextrakt (*in vitro*). Glycerol wird zum einen zu 1,3-PDO reduziert, zum anderen zu Dihydroxyaceton oxidiert.

Die im Zellrohextrakt von *K. pneumonia* enthaltenen Enzyme GDHt, PDOR und GDH wandeln Glycerol zum einen über den reduktiven Pfad zu 1,3-PDO um, zum anderen über den oxidativen Pfad zu Dihydroxyaceton. Die Ausbeute dieses Systems beträgt, ähnlich wie ein Fermentationsprozess (*in vivo* Prozess), ca. 50% (g/g).

Die oben demonstrierten Ergebnisse von Nemeth et al. (2008) lassen jedoch einige Kritikpunkte offen:

Erstens wird nicht geklärt, wie die ATP- und Coenzym B12-abhängige Kofaktorregeneration realisiert wird. Zweitens ist die Verwendung von Zellrohextrakt für einen Prozess, welcher ca. 30 Stunden aufrechterhalten wird, aus Sicht der Kontamination durch arteigenes Zellmaterial höchst fragwürdig, schließlich soll ein *in vitro* und kein *in vivo* Prozess ablaufen. Zellrohextrakt enthält im Gegensatz zu zellfreiem Extrakt einen gewissen, wenn auch geringen Anteil an ganzen, vitalen Zellen. Die aufgeschlossenen Zellen werden zur Herstellung von Zellrohextrakt weder zentrifugiert noch steril gefiltert. Die damit einhergehende Kontaminationsgefahr wirkt sich im Rahmen kurzweiliger Enzymaktivitätstests nicht aus, da hier die Aktivität der freigesetzten Enzyme gegenüber dem geringen Anteil an verbleibenden Zellen überwiegt. Für langfristige Experimente, wie sie durch Nemeth et al. (2008) durchgeführt wurden, ist Zellrohextrakt jedoch ungeeignet, da langfristig durch Proliferation die Stoffwechselaktivität der wenigen vitalen Zellen die gemessenen Aktivitätsergebnisse der freigesetzten Enzyme überlagern.

Wie in Abschnitt Material und Methoden beschrieben, wurde eine exakte Rekapitulation des Experiments von Nemeth et al. (2008) durchgeführt. Die Ergebnisse von Nemeth et al. konnten hier vollständig reproduziert werden und sind in **Abbildung 46** dargestellt.

Ferner wurde die optische Dichte (OD_{600}) des Reaktionsansatzes untersucht (vgl. **Abbildung 46**). Diese nimmt nach einer mehrstündigen Lag-Phase exponentiell zu, und endet schließlich in einer Gesamtzellkonzentration von $OD_{600} \sim 0,4$. Auch die Ausplattierung des Zellrohextrakts auf agarosehaltige LB-Mediumplatten (50 μ L pro Platte) verifiziert den hohen Anteil an noch vitalen Zellen im verwendeten Extrakt in Form von Koloniebildung nach 18 Stunden (13 Kolonien pro cm^2).

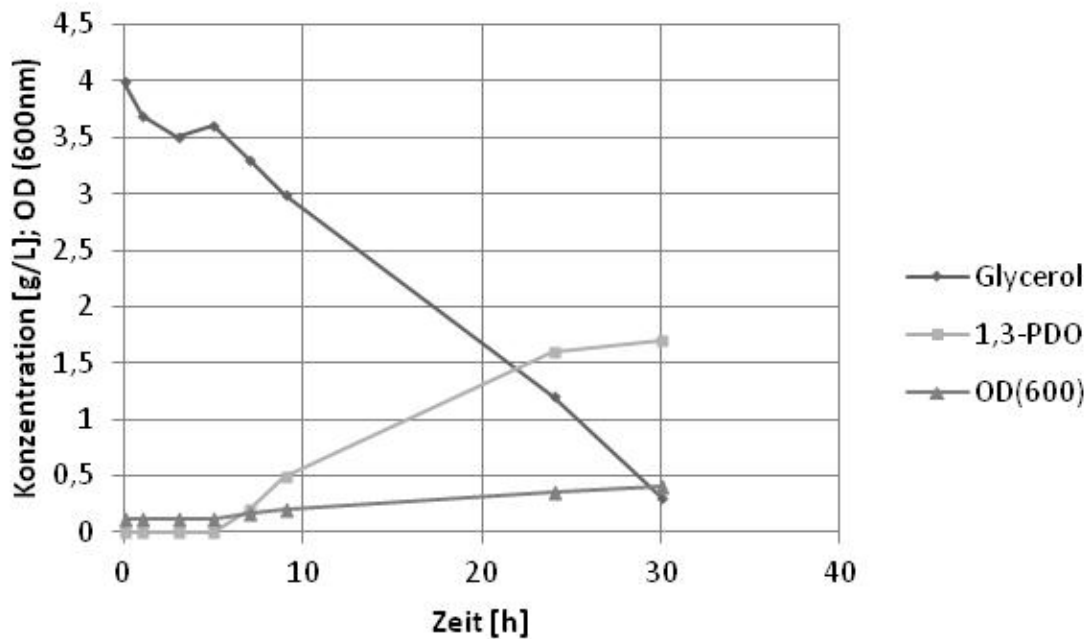


Abbildung 46: Wiederholung des Versuchs von Nemeth et al. (2008).

Ergebnisse konnten nahezu exakt reproduziert werden, allerdings indiziert der zusätzlich gemessene Anstieg der optischen Dichte unerwünschte Proliferation vitaler Zellen im Zellrohextrakt.

Aufgrund der Zweifel an dem Vorhandensein von *in vitro* Aktivität im Ansatz von Nemeth et al. (2008) wurde der Versuch mit modifiziertem Aufbau wiederholt. Hierbei wurden dem ansonsten exakt gleich durchgeführten experimentellen Ansatz eine Antibiotikakonzentration von Ampicillin (0,1mg/mL) und Kanamycin (0,1mg/mL) beigefügt. Diese Antibiotikazugabe sollte keinen Einfluss auf jegliche *in vitro* Reaktionen aufweisen, die *in vivo* Reaktionen der verwendeten Bakterien jedoch unterbinden. Die Ergebnisse dieses modifizierten Ansatzes sind in der **Abbildung 47** dargestellt:

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse muss die *in vitro* Aktivität des Ansatzes von Nemeth et al. (2008) stark angezweifelt werden.

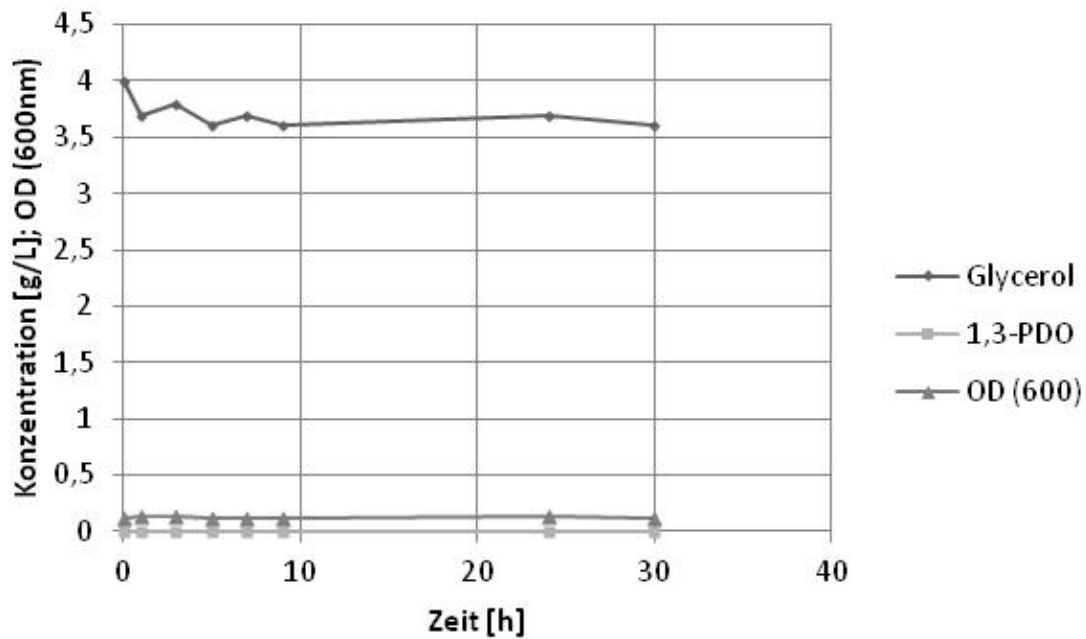


Abbildung 47: Modifizierte Wiederholung des Versuchs von Nemeth et al. (2008) unter Zugabe von geringer Antibiotikakonzentration Ampicillin (0,1mg/mL) und Kanamycin (0,1mg/mL). Durch die Unterbindung der Proliferation (OD bleibt konstant) von vitalen Zellen des Zellrohextrakts wird die Umsetzung von Glycerol zu 1,3-PDO unterbunden.

Die genannten Kritikpunkte seien in der folgenden **Abbildung 48** noch einmal zusammengefasst. Es handelt sich hierbei um die modifizierte Graphik von Nemeth et al. (2008), in welcher die tatsächlich gemessenen Stoffkonzentrationen unverändert abgebildet sind und die von Nemeth et al. (2008) eingefügten „Ausgleichsgeraden“ (vgl. **Abbildung 44**) durch direkte Verbindungslinien ersetzt wurden (vgl. **Abbildung 48**). Anhand dieser Graphik lässt sich eine korrekte Reinterpretation der Daten von Nemeth et al. (2008) herbeiführen:

Die zunächst beobachtbare Verminderung der Glycerolkonzentration innerhalb der ersten Stunde kann tatsächlich auf eine kurzfristige *in vitro* Enzymaktivität vor allem durch die GDH zurückgeführt werden. So wird innerhalb der ersten Stunde (genauere Aussagen aufgrund von großer Messintervalle durch Nemeth et al. (2008) nicht möglich) die Glycerolaustragskonzentration von 4g/L um knapp 0,5g/L verringert (vgl. **Abbildung 44** bzw. **Abbildung 48**). Da es zeitgleich zu keiner 1,3-PDO-Bildung kommt, muss die GDHt-Aktivität als nichtvorhanden betrachtet werden. Die nächsten drei Messpunkte zwischen Stunde 3 und 6 weisen keinen weiteren Glycerolkonsum auf, was auf die Inaktivierung der GDH durch den Verbrauch entsprechender

Redoxäquivalente in Form von NAD hindeutet. Es findet also spätestens ab Stunde 2 keine weitere enzymatische Reaktion mehr statt (vgl. **Abbildung 48**).

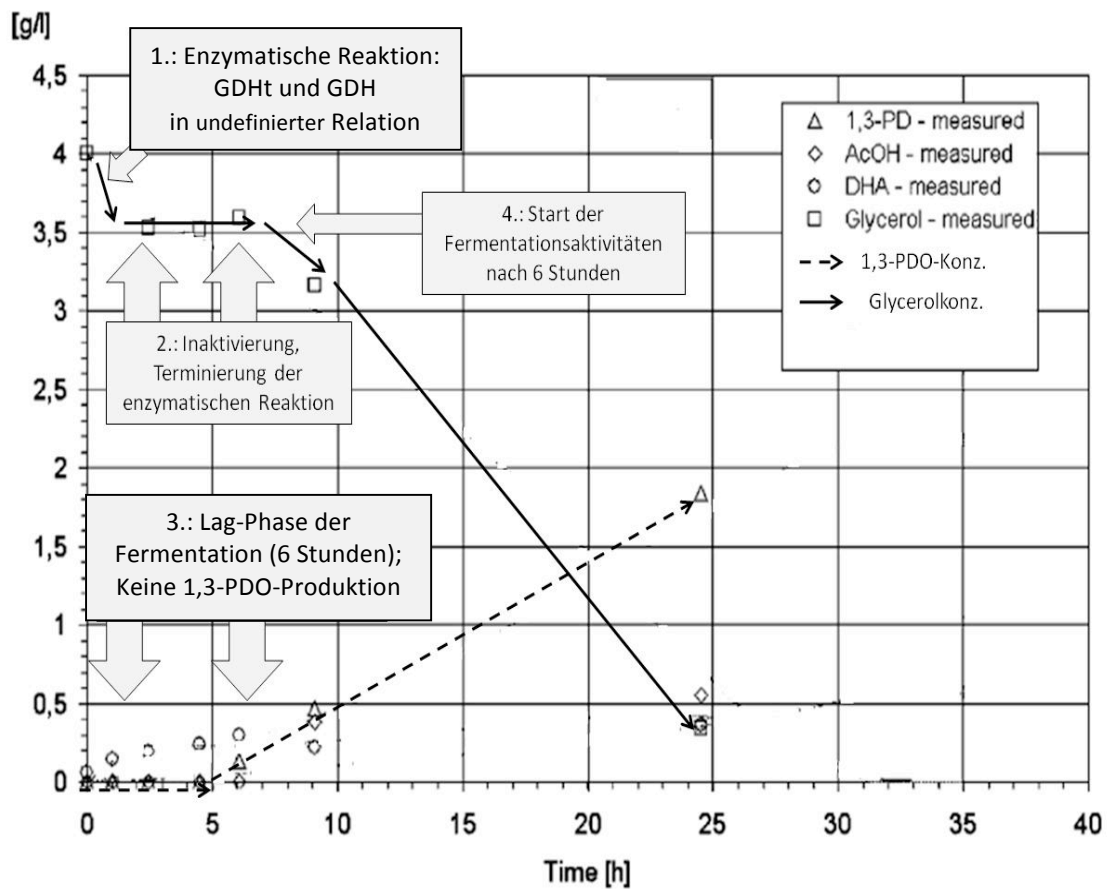


Abbildung 48: Reinterpretation der korrekt gemessenen Daten durch Nemeth et al. (2008).

Erst ab Stunde 6 ist die erste Detektion von 1,3-PDO ($\sim 0,2\text{g/L}$) überhaupt möglich (vgl. **Abbildung 48**). Diese steigt anschließend linear an, bis sie in Stunde 24 eine Endkonzentration von $\sim 2\text{g/L}$ erreicht. Im selben Zeitrahmen, d. h. zwischen Stunde 6 und 24 verringert sich auch die Glycerolkonzentration entsprechend.

Die zweifelsfrei korrekt gemessenen Daten von Nemeth et al. (2008) müssen also insofern einer neuen Interpretation unterzogen werden, dass sämtliche Reaktionen auf einen unerwünschten Fermentationsprozess durch vitale Zellen zurückzuführen sind. Eine langfristige *in vitro* Aktivität der GDHt muss im Ansatz von Nemeth et al. (2008) ausgeschlossen werden. Somit ist der Ansatz von Nemeth et al. (2008) für eine Erreichung der Ziele von Biobrick 1 ungeeignet, sodass, wie im Folgenden dargestellt, ein neuer Ansatz entwickelt werden musste.

4.5.3 Fed-Batch-Ansatz zur GDHt-Regeneration (Biobrick 1)

Die im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Ergebnisse erforderten die Entwicklung eines neuen Ansatzes für eine prozessintegrierte, längerfristig aktive GDHt. Xu et al. (2009) gelang die *in vitro* Reaktivierung einer durch den mechanismusbasierten Suizideffekt inaktivierten GDHt aus *K. pneumonia* durch Zugabe definierter ATP-, Magnesium- und Coenzym B12-Mengen. Dabei wurde zunächst die *in vitro* Aktivität bezüglich des Substrats Glycerol einige Minuten gemessen und die spezifische Aktivität bestimmt. Es folgte nach weiterer Zugabe von Glycerol die substratinduzierte Inaktivierung des Enzyms. Nach Zugabe von unterschiedlichen Mengen an ATP, Magnesium und Coenzym B12 konnte die *in vitro* Aktivität des Enzyms wiedererlangt werden. Für ein Einsatzfaktorverhältnis von 50 mmol L⁻¹ ATP, 10 mmol L⁻¹ Mg²⁺ und 3 μmol L⁻¹ Coenzym B12 wurde sowohl die höchste spezifische Aktivität von 0,294 U mg⁻¹, als auch der höchste Reaktivierungsgrad von bis zu 98,9% der ursprünglich bestimmten spezifischen Aktivität gemessen (Xu et al. 2009). Diese Ergebnisse sind in der folgenden **Tabelle 19** von Xu et al. (2009) zusammengefasst.

Tabelle 19: Ergebnisse von Xu et al. (2009) bezüglich der *in vitro* Reaktivierung der GDHt unter Verwendung der Kofaktoren ATP, Mg²⁺, GDHt-RF und Coenzym B12.
Erläuterung der Faktoren: A = ATP, B = Mg²⁺, C = GDHt-RF, D = Coenzym B12.

Run	Factors				Results	
	A	B	C	D	Special activity (U mg ⁻¹)	Reactive degree (%)
1	1	1	1	1	0.1913	63.8
2	1	2	2	2	0.2015	67.2
3	1	3	3	3	0.2072	69.1
4	2	1	2	3	0.2033	67.8
5	2	2	3	1	0.2938	98.9
6	2	3	1	2	0.2211	73.8
7	3	1	3	2	0.2341	78.1
8	3	2	1	3	0.2048	68.3
9	3	3	2	1	0.2183	72.8

Levels	Factors			
	A (mmol L ⁻¹)	B (mmol L ⁻¹)	C	D (μmol L ⁻¹)
1	30	5	8	3
2	50	10	6	7.5
3	80	20	4	12

Um eine stetige Reaktivierung der GDHt innerhalb eines laufenden *in vitro* Prozesses zu gewährleisten, wurde der im vorangegangenen **Abschnitt 4.5.2** geschilderte Ansatz von Nemeth et al. (2008) um eine kontinuierliche Zufuhr einer Reaktivierungslösung bestehend aus ATP, Magnesium und Coenzym B12 erweitert. Die dabei verwendeten Konzentrationen der genannten Komponenten ergaben sich aus den GDHt-Reaktivierungsergebnissen von Xu et al. (2009) und sind im Abschnitt Material und Methoden ausführlich geschildert. Das angestrebte Reaktionsschema ist in der **Abbildung 49** dargestellt.

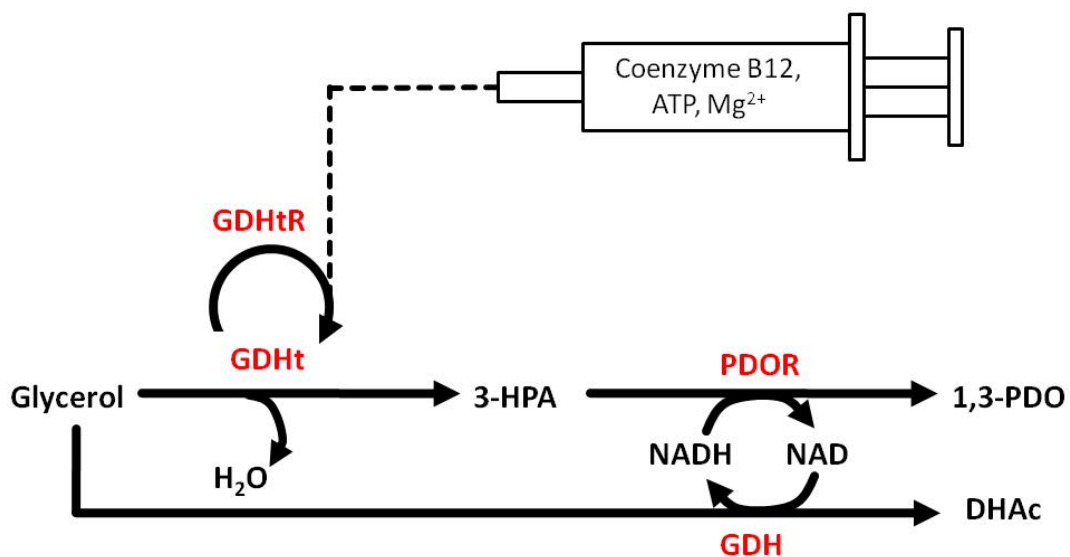


Abbildung 49: Konzept eines in zellfreiem Extrakt (*K. pneumonia*) ablaufenden *in vitro* Prozess mit kontinuierlicher Zugabe einer Reaktivierungslösung bestehend aus Coenzym B12, ATP und Magnesiumionen zur stetigen Reaktivierung der GDHt.

Die Ergebnisse des experimentellen Ansatzes sind in **Abbildung 50** zusammengefasst. Dabei werden die tatsächlich gemessenen Konzentrationen dargestellt, ohne den Verdünnungseffekt der Reaktivierungslösung zu berücksichtigen. Darüber hinaus sind die molaren Massen des produzierten 1,3-PDO sowie des umgesetzten Glycerols dargestellt, um einen quantitativen Vergleich trotz Verdünnungseffekt zu ermöglichen. Die anfängliche Glycerolkonzentration von 2g/L wird durch die Enzyme GDHt und GDH von *K. pneumonia* innerhalb der ersten sechs Stunden kontinuierlich verringert. Erst im Bereich zwischen Stunde sechs und zehn erfolgt eine Verringerung der Glycerolkonsumrate. Im gleichen zeitlichen Rahmen erfolgt die PDO-Generierung, deren Produktionsratenverringern ebenfalls erst ab Stunde sechs zu verzeichnen ist.

Die substratbezogene Produktausbeute $Y_{P/S}$ liegt für den betrachteten Zeitraum zwischen 0,42 - 0,49 g/g, sodass von einer gleichmäßigen Aufteilung des Glycerolkonsums durch die GDHt und GDH ausgegangen werden kann, wie in vorangegangener Abbildung (s.o.) dargestellt. Das Experiment zeigt, dass der mechanismusbasierte Suizideffekt der GDHt durch kontinuierliche Zugabe der Reaktivierungsfaktoren ATP, Coenzym B12 und Mg^{2+} zumindest zeitweilig umgangen werden kann (Proof of Concept Biobrick 1). Eine Kontamination der enzymatischen Reaktionen durch vitale Zellen wurde im gesamten Zeitraum durch die Zugabe von Antibiotika unterbunden und konnte ferner durch mikroskopische Untersuchungen ausgeschlossen werden.

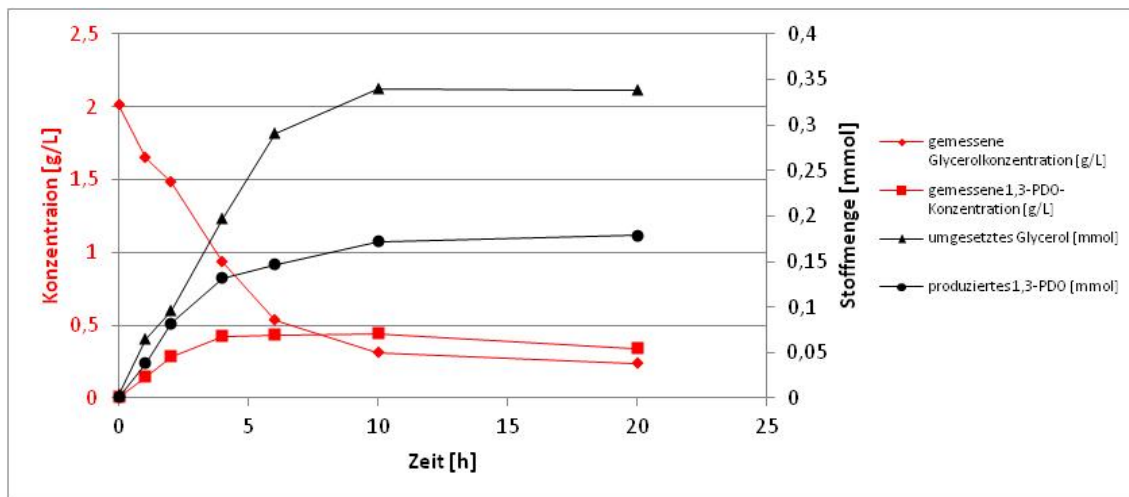


Abbildung 50: Experimentelle Ergebnisse des Proof of Concept für Biobrick 1. Durch kontinuierliche Zugabe der Reaktivierungslösung kann die GDHt über einen Zeitraum von mehreren Stunden aktiv gehalten werden.

In einem Verifizierungsexperiment bezüglich der grundsätzlich aufgezeigten Möglichkeit zur *in vitro* Reaktivierung der GDHt sollte der enorme Abhängigkeitseffekt von der Reaktivierungslösung demonstriert werden. Dazu wurde die Zufuhr der Reaktivierungslösung nach Stunde vier gestoppt, die Konzentrationsanalyse jedoch für weitere 16 Stunden fortgesetzt. Die Ergebnisse des Experiments sind in **Abbildung 51** zusammengefasst. Auch hier sind die tatsächlich gemessenen Konzentrationen an, ohne den Verdünnungseffekt der Reaktivierungslösung zu berücksichtigen, dargestellt, während die molaren Massen der Substrate und Produkte den quantitativen Vergleich ermöglichen.

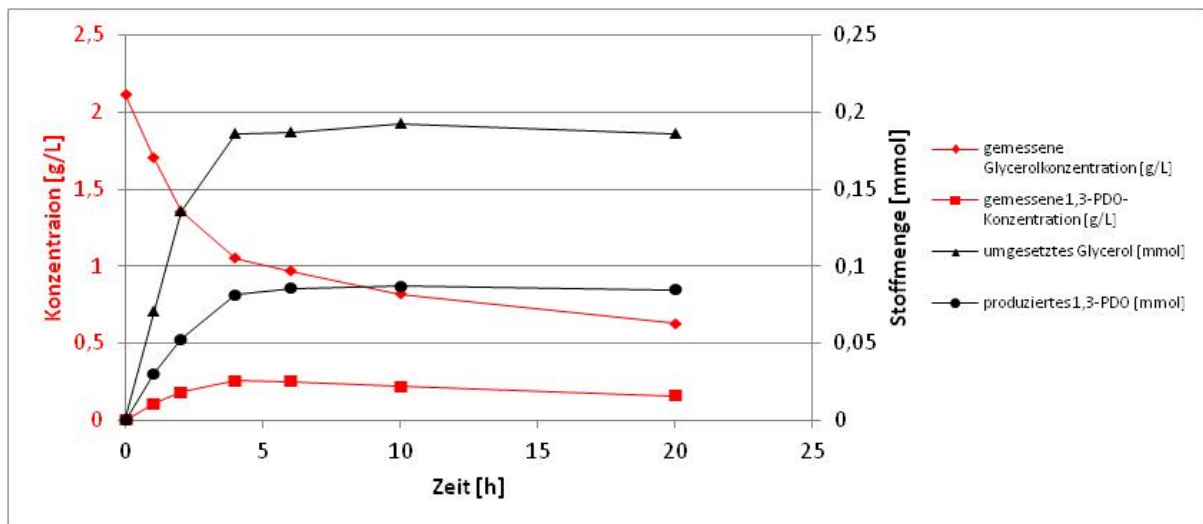


Abbildung 51: Verifizierungsexperiment des Proof of Concept für Biobrick 1. Durch die Beendigung der Reaktivierungslösungszufuhr wird der Glycerinkonsum, sowie die PDO-Generierung terminiert (Stunde 4). Ohne eine kontinuierliche Reaktivierung wird die GDHt durch den mechanismusbasierten Suizideffekt sofort inhibiert.

Wie im vorangegangenen Experiment nimmt die Glycerolkonzentration auch hier innerhalb der ersten vier Stunden stetig ab, während es zeitgleich zu einer entsprechenden PDO-Generierung kommt. Auch hier liegt die substratbezogene Produktausbeute $Y_{P/S}$ im Bereich von 0,45 - 0,48 g/g. Mit Beendigung der Reaktivierungslösungszugabe ab Stunde vier kommt es sofort zu einer erheblichen Reduktion der Reaktionsrate. Weitere minimale Konzentrationsänderungen sind auf eine praktisch vernachlässigbar geringe Restaktivität der GDHt zurückzuführen, welche nur ca. 1% der Anfangsaktivität ausmacht. Eine Kontamination der enzymatischen Reaktionen durch vitale Zellen wurde im gesamten Zeitraum durch die Zugabe von Antibiotika unterbunden und konnte ferner durch mikroskopische Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Dieses Experiment verdeutlicht somit die enorme Abhängigkeit der GDHt von der entsprechenden Reaktivierungslösung und verifiziert somit die Notwendigkeit der kontinuierlichen Reaktivierung der GDHt für weiterführende Experimente. Die demonstrierte starke Abhängigkeit der GDHt von der Reaktivierung unterstreicht ein weiteres Mal die bereits beschriebene Zweifelhaftigkeit (s.o.) der experimentellen Ergebnisse von Nemeth et al. (2008), welche einen *in vitro* Prozess ohne externe Reaktivierung der GDHt vorschlagen.

4.5.4 Biobrick 2a: PDORI und G6P-DH

Die zu entwickelnde Zieleigenschaft der zweiten Prozessstufe (Biobrick 2) ist die vollständige Transformation von 3-HPA zu 1,3-PDO mit einer Zielausbeute von nahezu 1 mol/mol. Während im Zielsystem die Kofaktorregeneration über eine Wasserstoffhydrogenase (H_2ase) gelingt, wird dies im Modellsystem durch die kommerziell erhältliche und somit wesentlich leichter zugängliche Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G6P-DH) realisiert.

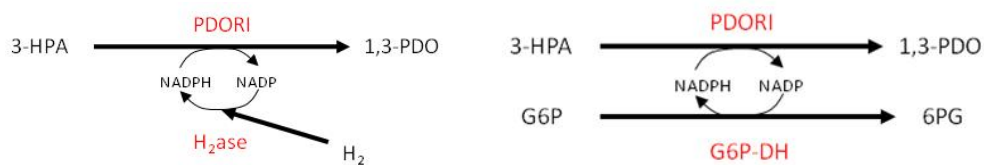


Abbildung 52: Zielsystemvariante (links) und Modellsystemvariante (rechts) der zweiten Prozessstufe des enzymatischen Produktionsprozesses. Während im Zielsystem die Kofaktorregeneration über eine Wasserstoffhydrogenase (H_2ase) gelingt, wird selbiges im Modellsystem durch die kommerzielle Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G6P-DH) realisiert.

Im vorliegenden **Abschnitt 4.5.4** wird die Entwicklung der Modellvariante beschrieben, deren spezielle Herausforderung in der prozesstechnischen Integration des PDORI liegt. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wird im darauf folgenden Abschnitt die Entwicklung der Zielsystemvariante beschrieben.

Die verwendeten Konzentrationen von 3-HPA beliefen sich auf wenige Millimol, da 3-HPA zum einen hoch toxisch ist und bei erhöhten Konzentrationen die beteiligten Enzyme irreversibel schädigen und inaktivieren könnte. Zum anderen ist im Gesamtprozess nahezu keine Akkumulation von erhöhten 3-HPA-Konzentrationen zu erwarten, da 3-HPA ein Zwischenprodukt im Prozess darstellt, dessen Engpass (Bottleneck) die 3-HPA-Produktion durch die GDHt darstellt und nicht der 3-HPA-Konsum durch das PDORI (vgl. **Abschnitt 2.1.4** Folgereaktionen, sowie **Abbildung 3**, Fall 3). Aus diesem Grund konnten die Intermediatkonzentrationen im Gesamtprozess als sehr gering angenommen und somit die Entwicklung der zweiten Prozessstufe (Biobrick 2) für Konzentrationen im Millimolbereich ausgelegt wurde.

Die Ergebnisse des in **Abschnitt 3.13.3** ausführlich beschriebenen Experiments sind in der folgenden **Abbildung 53** zusammengefasst:

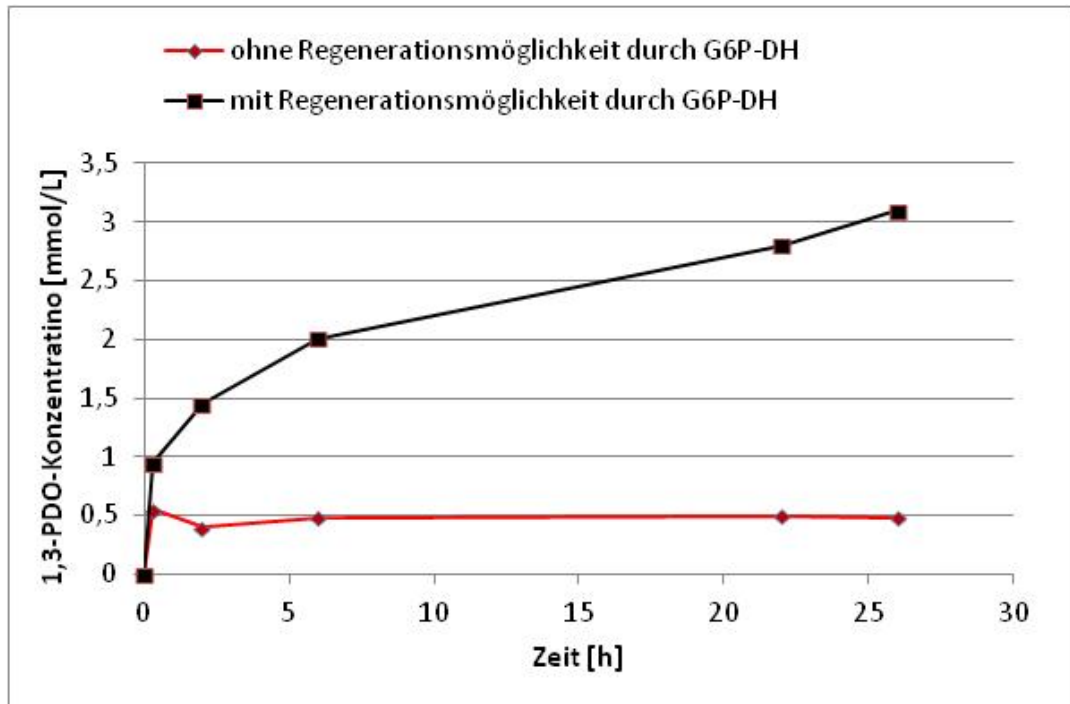


Abbildung 53: Ergebnisse des experimentellen Ansatzes der Modellvariante der zweiten Prozessstufe. G6P-DH und PDORI transformieren G6P und 3-HPA zu 6PG und 1,3-PDO unter kontinuierlicher NADP(H)-Regeneration. In einem Negativkontrollansatz, in welchem bei sonst gleichen Bedingungen die G6P-DH fehlt, findet keine Kofaktorregeneration statt. In diesem Fall entspricht die Transformationsmenge von 3-HPA zu 1,3-PDO lediglich der zugegebenen Menge an NADPH (0,5mmol/L).

Grundsätzlich ist ein klassischer, für enzymatische Reaktionen charakteristischer, sigmoidaler Reaktionsverlauf zu erkennen (vgl. **Abbildung 53**). Die G6P-DH, sowie die PDORI wandeln G6P einer anfänglichen Konzentration von 12 mmol/L (Überschusskomponente) und 3-HPA einer anfänglichen Konzentration von 3 mmol/L (limitierende Komponente) in 6PG und 1,3-PDO um. (Zur Orientierung: 1g/L 1,3-PDO entspricht einer Konzentration von ca. 13 mmol/L). Das dabei verwendete NADPH einer anfänglichen Konzentration von 0,5 mmol/L musste somit mehrmals (durchschnittlich mindestens sechs Mal) regeneriert werden, wodurch die grundsätzliche Machbarkeit der integrierten Kofaktorregeneration im Zusammenhang mit der Prozessstufe 2 demonstriert wurde. Im Testansatz wurde unter den gewählten Bedingungen die gesamte 3-HPA-Menge in 1,3-PDO transformiert. Dieser Sachverhalt ist zum einen durch die starke Dominanz des Reaktionsgleichgewichts des PDORI in physiologischer Richtung (3-HPA → 1,3-PDO) gegenüber seiner eigenen Rückreaktion

zu erklären, zum anderen durch den zugegebenen vierfachen Überschuss an G6P, welches das chemische Gleichgewicht der gekoppelten Reaktionen vollständig auf die Seite des 1,3-PDO verschiebt.

In einem Negativkontrollansatz, in welchem unter sonst gleichen Bedingungen das Regenerationsenzym G6P-DH nicht beigefügt wurde, konnte es wie erwartet zu keiner integrierten Regeneration des NADP(H) innerhalb der gekoppelten Reaktionen kommen. In diesem Fall wurde lediglich das anfänglich zugegebene NADPH (0,5mmol/L) zusammen mit 3-HPA durch das PDORI zu maximal 0,5 mmol/L 1,3-PDO transformiert. Durch das Fehlen der G6P-DH konnte das somit entstandene NADP mittels G6P nicht zu NADPH regeneriert werden (vgl. **Abbildung 53**).

Ferner wiesen die beiden Reaktionsansätze am Ende der Reaktionszeit von 26 Stunden einen deutlichen optischen Unterschied auf: Während der positive Reaktionsansatz nach 26 Stunden farblich unverändert (farblos und transparent) erschien, wies der Negativkontrollansatz eine leichte Gelbfärbung auf. Diese Gelbfärbung ist auf das im Negativansatz verbleibende, nicht-reagierte 3-HPA zurückzuführen, was bei gewählter Temperatur nach ca. 10 bis 12 Stunden sichtbare Polymerisationserscheinungen aufweist. Da im positiven Experiment das 3-HPA zügig zu 1,3-PDO transformiert wurde, traten hier jene Polymerisation und einhergehende Gelbfärbung nicht auf. Eine eventuelle Farbgebung durch Kontamination der enzymatischen Reaktionen durch vitale Zellen wurde im gesamten Zeitraum durch die Präsenz von Antibiotika unterbunden und konnte ferner durch mikroskopische Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Das vorliegende Experiment demonstriert die grundsätzliche Möglichkeit der integrierten Kofaktorregeneration und kontinuierlichen 1,3-PDO-Produktion aus geringen 3-HPA-Mengen bezüglich des Enzymsystems G6P-DH/PDORI. Eine grundsätzliche Anwendung dieser Modellvariante als Teil des Gesamtprozesses wäre somit denkbar.

4.5.5 Biobrick 2b: PDORI und H₂ase

Im vorliegenden **Abschnitt 4.5.5** werden die Ergebnisse der Weiterentwicklung der Modellvariante (G6P-DH/PDORI-System: Biobrick 2a) zur Zielvariante (H₂ase/PDORI-System: Biobrick 2b) der Prozessstufe 2 zusammengefasst. Auch hier wurden

die verwendeten 3-HPA-Konzentrationen aufgrund der im vorangegangenen Abschnitt erläuterten Gründe gering gehalten. Die wesentlichen Änderungen gegenüber der im vorigen Abschnitt beschriebenen Modellvariante bestehen im Austausch der G6P-DH durch zellfreien Extrakt von *P. furiosus* mit definierter H₂ase-Aktivität, sowie in der Verwendung von gelöstem Wasserstoffgas als Kosubstrat. Die Verwendung eines H₂ase-Systems in Form von zellfreiem Extrakt anstatt in Form von aufgereinigten Enzymen war in diesem Zusammenhang unbedenklich, da *P. furiosus* neben der H₂ase I keine weiteren Enzyme enthält, die die entsprechenden Chemikalien als Substrate verwenden könnten. Die Ergebnisse des in **Abschnitt 3.13.4** ausführlich beschriebenen Experiments sind in der **Abbildung 54** zusammengefasst:

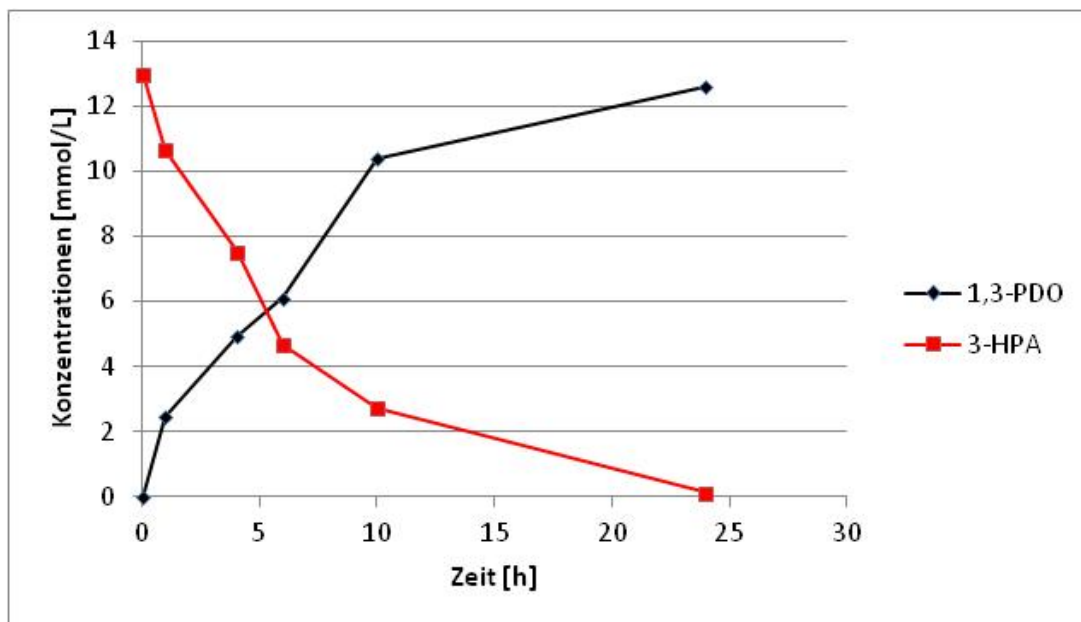


Abbildung 54: Ergebnisse des experimentellen Ansatzes der Zielvariante der zweiten Prozessstufe. H₂ase und PDORI transformieren gelösten Wasserstoff und 3-HPA zu 1,3-PDO unter kontinuierlicher NADP(H)-Regeneration.

Auch hier ist ein klassischer, für enzymatische Reaktionen charakteristischer, sigmoidaler Reaktionsverlauf zu erkennen. Die H₂ase und die PDORI wandeln den kontinuierlich in das System eingetragenen Wasserstoff (Überschusskomponente) und 3-HPA einer anfänglichen Konzentration von 13 mmol/L (limitierende Komponente) in 1,3-PDO um (Reaktion pseudo-erster Ordnung, vgl. **Abschnitt 2.1.3**). Das dabei verwendete NADP einer anfänglichen Konzentration von 2 mmol/L musste somit, wie auch im vorangegangenen Experiment, mehrmals (durchschnittlich mindestens 6-7 mal)

regeneriert werden, wodurch die Realisierbarkeit der integrierten Kofaktorregeneration in Prozessstufe 2 gezeigt wurde (1g/L 1,3-PDO entspricht einer Konzentration von ca. 13 mmol/L).

Die gesamte 3-HPA-Menge in 1,3-PDO wurde im Reaktionsansatz unter den gewählten Bedingungen transformiert. Auch hier ist diese Beobachtung wie im vorangegangenen Experiment durch die starke Dominanz des Reaktionsgleichgewichts des PDORI in physiologischer Richtung (3-HPA \rightarrow 1,3-PDO) zu erklären, aber auch durch den zugegebenen Überschuss an kontinuierlich eingetragenen Wasserstoff, was das chemische Gleichgewicht der gekoppelten Reaktionen vollständig auf die Seite des 1,3-PDO verschiebt.

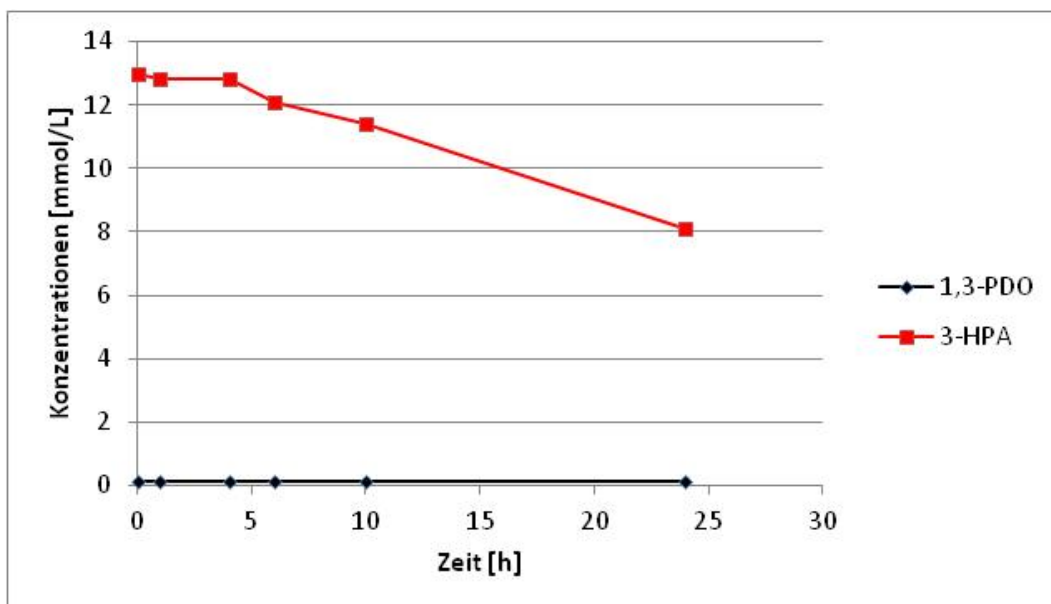


Abbildung 55: Ergebnisse des Negativkontrollansatzes der Zielvariante der zweiten Prozessstufe mit Stickstoffgaseintrag anstelle von Wasserstoffbegasung. Durch die dadurch nicht vorhandene NADP(H)-Regenerationsmöglichkeit kann 3-HPA nicht zu 1,3-PDO umgesetzt werden. Die Abnahme der 3-HPA-Konzentration ist auf Polymerisationsreaktionen des hochreaktiven Intermediats zurückzuführen.

In einem Negativkontrollansatz, in welchem statt Wasserstoffgas gasförmiger Stickstoff in das System eingetragen wurde, konnte es wie erwartet zu keiner integrierten Regeneration des NADP(H) innerhalb der gekoppelten Reaktionen kommen, sodass kein 1,3-PDO produziert werden konnte. Dieses Ergebnis ist in **Abbildung 55** dargestellt.

Positiv- und Negativansatz wiesen nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden einen deutlichen farblichen Unterschied auf: Während der positive Reaktionsansatz nach 24 Stunden farblich unverändert (farblos und transparent) erschien, war die typische Gelbfärbung des Negativkontrollansatzes durch nichtreagiertes, polymerisiertes 3-HPA zu erkennen. Da im positiven Experiment das 3-HPA zügig zu 1,3-PDO transformiert wurde, traten hier jene Polymerisation und einhergehende Gelbfärbung nicht auf. Kontaminationen der *in vitro* Reaktionen durch vitale Zellen wurden auch hier durch die Präsenz von Antibiotika unterbunden und konnten ferner durch mikroskopische Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Das vorliegende Experiment demonstriert die grundsätzliche Möglichkeit der integrierten Kofaktorregeneration und kontinuierlichen 1,3-PDO-Produktion aus geringen 3-HPA-Mengen bezüglich des Enzymsystems H₂ase/PDORI. Die Realisierbarkeit der Zielvariante des Prozessschrittes 2 mit maximal möglicher Produktausbeute (1mol/mol) wurde somit demonstriert. Diese Zielvariante wurde im weiteren Verlauf als Grundlage für den Gesamtprozess verwendet.

4.5.6 Konzeption und Realisierung des Gesamtprozesses mit GDHt, PDORI und H₂ase

Der Gesamtprozess wurde zunächst in Form eines Proof of Concept-Experiments durchgeführt. Anschließend wurden folgende technische Parameter variiert, um Produktionsgeschwindigkeit, Produktausbeute und maximale Produktionsmenge iterativ zu erhöhen:

- Variation der Feed-Lösungszusammensetzung (ATP, Coenzym B12)
- Variation der Substratkonzentration (Glycerol)
- Variation der eingesetzten Enzymmenge (Units)

Proof of Concept:

Die Ergebnisse des Proof of Concept-Experiments für den Gesamtprozess sind in der folgenden Abbildung dokumentiert. Erkennbar ist hier die stetige Zunahme der gemessenen 1,3-PDO-Konzentration über der Zeit bei gleichzeitiger Glycerolkonzentrationsabnahme. Während die 1,3-PDO-Konzentration von anfänglich

0g/L auf 0,44g/L nach 20 Stunden steigt, sinkt die Glycerolkonzentration von anfänglichen 3g/L nach 20 Stunden um 2,05g/L auf 0,95g/L. Dabei ist allerdings zu beachten, dass es sich hier um die direkt gemessenen Glycerol- und 1,3PDO-Konzentrationen handelt. Um sich ein vergleichbareres Bild von der Produktivität des Systems machen zu können, muss hier der Verdünnungseffekt durch den Feed mit einer Flussrate von 1mL/h berücksichtigt werden. Durch den kontinuierlichen Eintrag von Reaktivierungslösung und die damit einhergehende Verdünnung des Batch-Ansatzes lässt sowohl die Glycerol- als auch 1,3PDO-Konzentrationen geringer erscheinen. Insgesamt wurden innerhalb der 20 Stunden 0,24mmol Glycerol zu 0,232mmol 1,3PDO umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 0,97mol/mol, welche somit nahe dem theoretischen Maximum von 1mol/mol liegt. Eine Akkumulation von 3-HPA konnte während des gesamten Prozesses nicht festgestellt werden. Der Grund hierfür liegt in der beabsichtigten Hervorrufung des Quasistationaritätsprinzips für 3-HPA als Intermediat innerhalb zweier Folgereaktionen. Da $k_2 \gg k_1$ ist, wird die Aufkonzentrierung dieses toxischen Zwischenproduktes verhindert (Vergleich **Abschnitt 2.1.4. Folgereaktionen/ Quasistationaritätsprinzip**).

In **Abbildung 56** sind sowohl die gemessenen Konzentrationen, als auch die umgesetzte und verbrauchten Stoffmengen dargestellt.

Die optische Dichte, welche photometrisch vor und nach dem Experiment bei 600nm analysiert wurde, wies keine Änderungen auf. Eine Kontamination konnte somit durch Mikrofiltration und zugegebene Antibiotika (vgl. Abschnitt Material und Methoden) vollständig verhindert werden.

Während der gesamten Reaktionsdauer von 20 Stunden weisen sowohl die Substratverbrauchskurve, als auch die Produktgenerationskurve ein typisches sigmoidalkinetisches Konzentrationsprofil erster Ordnung auf, woraufhin auf rein enzymatische Katalysereaktionen geschlossen und eine Stofftransformation durch lebende Zellen (Kontamination) ausgeschlossen werden kann. Ferner zeigt das sigmoidalkinetische Konzentrationsprofil erster Ordnung, dass die Reaktionskinetiken der PDORI und der H₂ase gegenüber der GDHt dauerhaft wesentlich höher liegen, sodass die GDHt als reaktionsgeschwindigkeitsbestimmender Schritt ausgeschlossen bzw. vernachlässigt werden kann. Der reaktionskinetische Engpass des gesamten Systems stellt hier aus dem Konzentrationsprofil erkennbar die GDHt dar, woraus sich

schließlich eine Reaktion erster Ordnung ergibt (Vergleich **Abschnitt 2.1.4.** Folgereaktionen/ Quasistationaritätsprinzip).

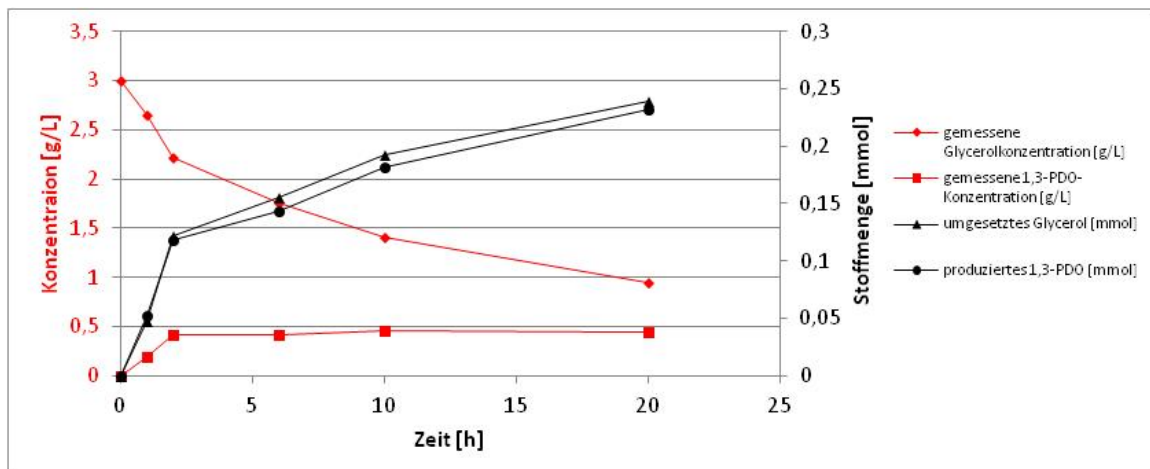


Abbildung 56: Proof of Concept-Experiment für den Gesamtprozess mit den Enzymen GDHt, PDORI und H2ase unter Wasserstoffatmosphäre. Als Ausgangskonzentration wurde ein zunächst geringer Wert von 3g/L Glycerol gewählt.

Das Proof of Concept Experiment kann insofern als erfolgreich betrachtet werden, da eine extrem hohe Ausbeute von 0,97mol/mol erreicht werden konnte. Andererseits liegt die Gesamtproduktion an 1,3-PDO mit ca. 1g/L weit unter derer von entsprechenden Fermentationsprozessen (Zeng et al. 1997).

4.5.7 Variation der Feed-Lösungszusammensetzung

Wie Xu et al. (2009) eindeutig demonstriert haben, ist die Reaktivierung der GDHt stark von der entsprechenden Konzentration der Reaktivierungsfaktoren ATP und Coenzym B12 abhängig. Sowohl ein Mangel, als auch ein Überschuss, also jegliche Abweichung von der optimalen Konzentration, führt zu einer Verminderung der GDHt-Reaktivierungsrate (Xu et al. 2009). Um die Kofaktorversorgung über den Feed möglichst nahe am Optimum zu halten, wurde die Kofaktorkonzentration im Feed variiert. In der folgenden **Tabelle 20** sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt.

Tabelle 20: Ergebnisse der ATP- und Coenzym B12-Konzentrationsvariation im Feed. Erkennbar ist das Optimum der Konzentrationsvariationen bei einer Austauschrate von zwei Stunden mit einer ATP-Konzentration von 253g/L und einer Coenzym B12-Konzentration von 4,7g/L.

ATP	507g/L ^{a)}	253g/L ^{b)}	126g/L ^{c)}	63g/L ^{d)}
Coenzym B12	9,4mg/L ^{a)}	4,7g/L ^{b)}	2,4g/L ^{c)}	1,2g/L ^{d)}
Kofaktoraustauschrate ¹	jede Stunde	alle zwei Stunden	alle drei Stunden	alle vier Stunden
Erreichte PDO konz. [g/L]	0,44	0,46	0,37	0,30

a) b) c) d) **Experimentelle Variationen der ATP- und Coenzym B12-Konzentrationen.**

¹ **Die Kofaktoraustauschrate beschreibt jenen Zeitraum der bei entsprechender Feed-Konzentration benötigt wird, um bei einer Flussrate von 1mL/h die initiale ATP- und Coenzym B12-Konzentrationen vollständig zu ersetzen.**

Die Kofaktoraustauschrate stellt jenen Zeitraum dar, welcher benötigt wird, um die anfängliche ATP- und Coenzym B12-Konzentrationen im Batch (50mmol ATP, 3 μ mol Coenzym B12) vollständig zu ersetzen. Je höher die Stoffkonzentration im Feed, desto kürzer die entsprechende Austauschrate (vgl. **Tabelle 20**). Die Ergebnisse zeigen ein Produktionsmaximum an 1,3-PDO bei einer Austauschrate von allen zwei Stunden. Abweichend von diesem Maximum in Richtung höherer und niedrigerer Stoffkonzentrationen im Feed erreichen die 1,3-PDO-Produktivitäten nur ca. 80% des Maximums und weniger. Für alle weiteren Experimente wurden somit die entsprechenden Stoffmengenkonzentrationen von 253g/L ATP und 4,7g/L Coenzym B12 im Feed verwendet.

Auch mit der Variation der Feedlösungszusammensetzung und der damit einhergehenden Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit von k_1 (GDHt) konnte keine Akkumulation von 3-HPA während des gesamten Prozesses festgestellt werden. Die beabsichtigte Hervorrufung des Quasistationaritätsprinzips für 3-HPA als Intermediat innerhalb dieser Folgereaktionen bleibt auch hier stabil. Da trotz potentieller Erhöhung von k_1 immer noch gilt $k_2 \gg k_1$, wird die Aufkonzentrierung dieses toxischen Zwischenproduktes verhindert (Vergleich **Abschnitt 2.1.4. Folgereaktionen/ Quasistationaritätsprinzip**).

4.5.8 Variation der Substratkonzentration

Sowohl das Proof-of-Concept-Experiment, als auch die Variation der Feed-Lösungszusammensetzung, führten zu hervorragenden Ausbeuteergebnissen (s.o.). Um nun die Produktkonzentration an 1,3-PDO und somit die volumetrische Produktivität des Gesamtprozesses zu steigern, wurden Substratkonzentrationen von 3g/L, 10g/L sowie 20g/L Glycerol verwendet. Die Ergebnisse dieser Parallelexperimente sind in **Abbildung 57** dargestellt.

Für eine Substratausgangskonzentration von 3g/L Glycerol wird eine gemessene 1,3-PDO-Konzentration von 0,46g/L erreicht, was unter Berücksichtigung des Verdünnungseffekts einer 1,3-PDO-Produktion von 0,24mmol entspricht. Mit einem Glycerolumsatz von 0,25mmol entspricht dies einer Ausbeute von ca. 0,96 mol/mol und liegt damit im Bereich der zuvor ermittelten Produktivität und Ausbeute. Für eine Substratausgangskonzentration von 10g/L Glycerol wurde eine gemessene 1,3-PDO-Konzentration von 0,44g/L erreicht, was unter Berücksichtigung des Verdünnungseffekts einer 1,3-PDO-Produktion von insgesamt 0,232mmol entspricht. Mit einem Glycerolumsatz von 0,24mmol entspricht dies ebenfalls einer Ausbeute von ca. 0,96mol/mol. Für eine Substratausgangskonzentration von 20g/L Glycerol wurde eine gemessene 1,3-PDO-Konzentration von 0,23g/L erreicht, was unter einer 1,3-PDO-Produktion von 0,12mmol entspricht. Mit einem Glycerolumsatz von 0,13mmol entspricht dies einer Ausbeute von ca. 0,95mol/mol (vgl. **Tabelle 21**).

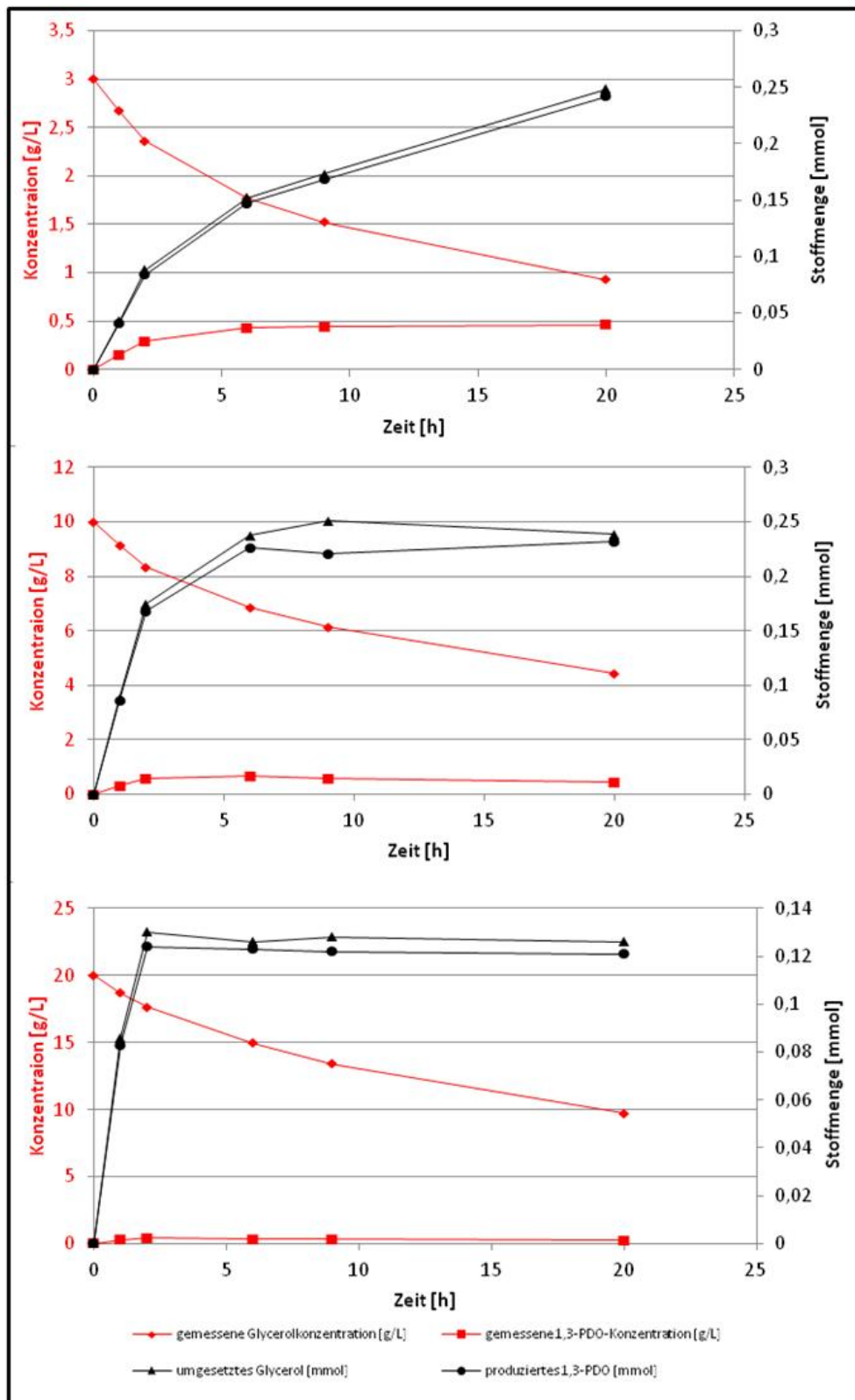


Abbildung 57: Glycerol- und 1,3-PDO-Konzentrationsverlauf des Gesamtprozesses ausgehend von einer niedrigen Substratkonzentration von 3g/L Glycerol (oben), 10g/L Glycerol (Mitte) sowie 20g/L Glycerol (unten).

In der folgenden **Tabelle 21** sind die gemessenen Konzentrationen sowie die umgesetzten bzw. produzierten Molmassen der Komponenten festgehalten:

Tabelle 21: Gemessene Glycerol- und 1,3-PDO-Konzentrationen unter Variation der Substratausgangskonzentration. Unter Berücksichtigung des Verdünnungseffekts kann nur die errechnete Molmassenbilanz, nicht die gemessenen Konzentrationen für quantitative Vergleiche verwendet werden.

Substrat- ausgangs- konzentration	Zeit [h]	Glycerol gemessen [g/L]	1,3-PDO gemessen [g/L]	Umgesetztes Glycerol [mmol]	Produziertes 1,3-PDO [mmol]
3g/L	0	3,00	0,00	0,00	0,00
	1	2,67	0,15	0,043	0,041
	2	2,36	0,29	0,088	0,084
	6	1,77	0,43	0,152	0,147
	9	1,52	0,44	0,173	0,168
	20	0,93	0,46	0,248	0,242
10g/L	0	10,00	0,00	0,00	0,00
	1	9,14	0,31	0,088	0,086
	2	8,36	0,58	0,175	0,168
	6	6,85	0,66	0,238	0,226
	9	6,14	0,58	0,252	0,221
	20	4,45	0,44	0,239	0,232
20g/L	0	20,00	0,00	0,00	0,00
	1	18,67	0,30	0,086	0,083
	2	17,64	0,43	0,130	0,124
	6	14,94	0,36	0,126	0,123
	9	13,40	0,32	0,128	0,122
	20	9,71	0,23	0,126	0,121

Während die Produktausbeuten für alle Substratkonzentrationen konstant sehr hoch bleiben, (0,96 mol/mol; 0,96 mol/mol; 0,95 mol/mol) verringert sich die Produktivität mit steigender Substratkonzentration zunehmend. Während für eine Substratkonzentration von 3g/L noch eine 1,3-PDO-Produktion von 0,24mmol erreicht wird, beträgt die entsprechende 1,3-PDO-Produktion für eine Substratkonzentration von 20g/L nur noch 0,12mmol. Die Produktivität des Systems hat sich somit halbiert. Die Zunahme der Glycerolkonzentration im Medium verstärkt anscheinend den

mechanismusbasierten Suizideffekt der GDHt, was in einer verringerten Systemleistung resultiert.

Eine weitere Auffälligkeit der Messungen lässt sich anhand der Kurvenprofile der Glycerol- und 1,3-PDO-Konzentrationen feststellen (vgl. **Abbildung 57**). Für eine Substratausgangskonzentration von 3g/L verringerte sich die Glycerolkonzentration kontinuierlich über den gesamten Zeitraum des Experiments von 20 Stunden. Gleichmaßen steigt die 1,3-PDO-Konzentration ebenfalls über den gesamten Zeitraum kontinuierlich an. Es wird also im gesamten Zeitraum des Experiments Glycerol in 1,3-PDO transformiert, was bedeutet, dass die gesamte Enzymkaskade auch nach 20 Stunden Reaktion immer noch aktiv ist. Eine Reaktivierung der GDHt ist also bei geringen Substratkonzentrationen von 3g/L und weniger auch nach 20 Stunden möglich. Für die Substratausgangskonzentration von 10 und 20g/L ist ein anderes Phänomen zu beobachten. Zwar ist die Reaktionsgeschwindigkeit für gesteigerte Substratkonzentrationen anfänglich höher, allerdings ist für beide Glycerol- und 1,3-PDO-Konzentrationensverläufe nach einigen Stunden ein Abflachen erkennbar (vgl. **Abbildung 57**). So ist für die Substratausgangskonzentration von 10g/L nach ca. 6 Stunden sowohl keine weitere 1,3-PDO-Produktion mehr erkennbar, als auch eine weitere Abnahme der Glycerolkonzentration. Für die Substratausgangskonzentration von 20g/L ist bereits nach ca. 2 Stunden weder 1,3-PDO-Produktion noch eine weitere Abnahme der Glycerolkonzentration identifizierbar (vgl. **Tabelle 21**), obwohl auch hier die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit höher liegt, als für eine Substratausgangskonzentration von 3g/L.

Da die anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeiten also mit steigender Substratausgangskonzentration steigen; die langfristige Aktivität des Systems jedoch mit steigender Substratausgangskonzentration eher zum Erliegen kommt, muss auf eine Verminderung der GDHt-Reaktivierungsgeschwindigkeit mit erhöhter Glycerolkonzentration geschlossen werden. Offensichtlich wird die GDHt nicht direkt durch die erhöhte Glycerolkonzentration schneller inaktiviert, sondern die Reaktivierung vollzieht sich langsamer mit erhöhter Substratausgangskonzentration (vgl. **Abschnitt 2.2.1**, Substratüberschusshemmung).

Wie bereits zuvor identifiziert, bestätigt sich hier ein weiteres Mal die GDHt und deren Reaktivierung als Engpass des Gesamtsystems. Von einer erhöhten Substratkonzentration von mehr als 3g/L wurde somit unter Berücksichtigung dieser

Ergebnisse für Folgeexperimente abgesehen, um im System eine langfristige GDHt-Reaktivierung zu ermöglichen.

4.5.9 Variation der eingesetzten Enzymmenge

Um neben der hohen Ausbeute von über 95% nun auch gezielt die Gesamtproduktivität des Systems zu erhöhen, wurde die eingesetzte Enzymmenge bei sonst konstanten Parametern von 10 auf 20 Units gesteigert. Die Ergebnisse des Experiments sind in der folgenden **Abbildung 58** illustriert:

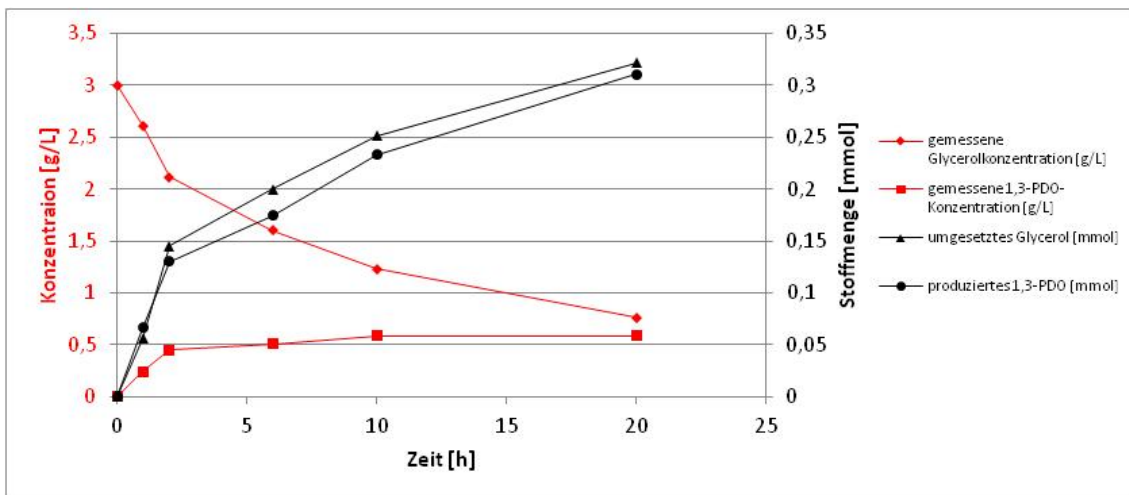


Abbildung 58: Gesamtproduktionsprozess unter Erhöhung der eingesetzten Enzymmenge von 10 auf 20 Units bei einer Substratausgangskonzentration von 3g/L Glycerol.

Mit einer Anfangsenzymaktivität von 20U/20mL wird nach 20h eine gemessene 1,3-PDO-Konzentration von 0,59g/L erreicht, was unter Berücksichtigung des Verdünnungseffekts einer tatsächlichen 1,3-PDO-Produktion von 0,311mmol entspricht. Mit einem Glycerolumsatz von 0,322mmol nach 20h entspricht dies einer Ausbeute von ca. 0,97mol/mol und liegt damit im Bereich der zuvor ermittelten Ausbeute. Auch durch die Erhöhung der Enzymmenge (Units) bleibt das Quasistationaritätsprinzip der Folgereaktionen mit $k_2 \gg k_1$ bestehen (Vergleiche **Abschnitt 2.1.4.** Folgereaktionen/ Quasistationaritätsprinzip). Die Gesamtproduktion konnte durch das vorliegende Experiment von 0,25mmol (s.o.) auf 0,322mmol, also um den Faktor 1,29 gesteigert werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Enzymmenge zu diesem Zweck um den Faktor 2 gesteigert worden ist. Eine

Verdoppelung der Units führt also nicht zu einer Verdoppelung der Produktmenge. Unter Berücksichtigung der Enzyme als Hauptkostenfaktor des Gesamtprozesses ist es somit wirtschaftlich betrachtet fraglich, die um den Faktor 1,29 gesteigerte 1,3-PDO-Menge mit einer Verdoppelung der eingesetzten Enzymmenge zu rechtfertigen.

4.6 Allgemeine Diskussion des synthetischen 1,3-PDO-Produktionsverfahrens

Den hervorragenden experimentellen Produktausbeuteergebnissen von ca. 95% des theoretisch möglichen Maximums steht die geringe Produktionsrate von anfänglichen $0,2\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ sowie die geringe Gesamtproduktion in Größenordnungen von $<1\text{ g/L}$ gegenüber. Derzeit etablierte Fermentationsverfahren, welche Glycerol zu 1,3-PDO transformieren, weisen Produktionsraten von ca. $2,5\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ (Metsoviti et al. 2012) sowie Produktendkonzentrationen von ca. 80 g/L (Chatzifragkou et al. 2011) auf. Verglichen mit diesen prozesstechnischen Parametern ist das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Verfahren kurzfristig nicht konkurrenzfähig. Die *in vivo* Reaktivierung der GDHt im Rahmen eines mikrobiellen Fermentationsprozesses erweist sich somit um ein Vielfaches effizienter, sodass ein weiteres Mal der mechanismusbasierte Suizideffekt der GDHt als effizienzbestimmender Schritt innerhalb dieser Prozesse gilt.

Ein in diesem Zusammenhang vielversprechender Ansatz für zukünftige Weiterentwicklungen des *in vitro* Produktionsprozesses stellt die Verwendung einer neudesignten GDHt dar, deren mechanismusbasierter Suizideffekt signifikant verringert wurde. Yamanishi et al. (2012) gelang es eine rekombinante GDHt von *K. pneumonia* durch Austausch der S α 301/Q α 336-Aminosäuren im aktiven Zentrum zu konstruieren, deren mechanismusbasierter Suizideffekt um den Faktor 2,5 verringert wurde. Während der Verbesserungsfaktor von 2,5 zunächst sehr gering erscheint, zeigen molekularbiologische Arbeiten der letzten Jahrzehnte Möglichkeiten auf, Enzyme bezüglich diverser Eigenschaften um Faktoren der Größenordnung 10^3 zu optimieren (Winslow et al. 1996, Zhang et al. 1997 etc.).

Weitere Effizienzsteigerungsmöglichkeiten offenbaren sich mittels des metabolic channeling (metabolische Kanalisierung) in Kombination mit Multienzymkomplexen. Darunter versteht man den Transfer eines intermediären Metaboliten von einem Enzym zu einem anderen Enzym oder zu einem anderen aktiven Zentrum desselben Enzyms,

wobei der Metabolit nicht ins Reaktionsmedium freigesetzt wird. Durch die räumliche Annäherung der entsprechenden Enzyme innerhalb einer Reaktionskaskade, werden Diffusionsbarrieren, -zeiten und -räume minimiert und die Gesamtreaktion beschleunigt. Auch Inhibitionen (Substrat-, Produkt-, Feedback- und Cross-over-Inhibierung) der beteiligten Enzyme durch die generierten Zwischenprodukte werden so vermindert. Zu diesem Zweck sind molekulare Strukturen wie Fusionsproteine und Protein-Scaffold als Enzymmodule einsetzbar. Auch die Kolokalisierung als besondere Form der Enzymimmobilisierung wäre als zielführende Methode denkbar. Im in der vorliegenden Arbeit relevanten Anwendungsbeispiel würde somit in einem Multienzymsystem (Fusion, Scaffold, Kolokalisierung) aus gekoppelter GDHt und PDORI die Verweilzeit des toxischen Intermediats 3-HPA minimiert werden und unverzüglich in das Endprodukt 1,3-PDO transformiert. Die technische Realisierbarkeit solcher Protein-Scaffolds wurden durch Keasling et al. (2009) sowie durch Zhang et al. (2011) demonstriert.

Die Ansätze von Yamanishi et al. (2012), sowie von Keasling et al. (2009) und Zhang et al. (2011) verdeutlichen das bestehende Optimierungspotential des in der vorliegenden Arbeit entwickelten *in vitro* Produktionsprozesses für 1,3-PDO aus Glycerol, um langfristig ein effizienteres Substitutionsverfahren bereitstellen zu können.

5 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein synthetischer, enzymatischer *in vitro* Produktionsprozess für 1,3-PDO aus Glycerol entwickelt werden. Sämtliche dazu erforderlichen Enzyme und Zellextraktssysteme wurden erfolgreich produziert, gegebenenfalls aufgereinigt und in das Produktionsverfahren integriert.

Für die Produktion des Propandioloxidoreduktase-Isoenzyms wurde ausgehend von entsprechender genomischer DNA zunächst ein Vektor, anschließend ein Expressionsstamm konstruiert. Aus kultivierter und geernteter Biomasse wurde das Propandioloxidoreduktase-Isoenzym mittels Affinitätschromatographie isoliert, charakterisiert und in den Prozess in aufgereinigter Form integriert.

Zur Produktion der Wasserstoffhydrogenase wurde für den natürlichen Organismus *P. furiosus* ein großtechnischer Fermentationsprozess im 300L-Maßstab nebst integriertem Downstream-Processing-Verfahren entwickelt. Aus einem 300L-Fermentationsansatz konnten so ca. 8000 Units der Wasserstoffhydrogenase I isoliert werden.

Um eine größtmögliche Aktivität der Glyceroldehydratase zu gewährleisten, wurde für diese Prozessstufe auf zellfreien Extrakt der entsprechenden Mikroorganismen zurückgegriffen. Je nachdem, ob neben der Glyceroldehydrataseaktivität auch eine Glyceroldehydrogenaseaktivität erforderlich war, wurde auf zellfreie Extrakte von *K. pneumonia* (+GDH) bzw. *L. reuteri* (-GDH) zurückgegriffen.

Das aus diesen Enzymen konstruierte System wurde sowohl in seinen Einzelstufen, als auch in seiner Gesamtheit getestet und die Funktionalität verifiziert. Die erste Teilstufe zur Verifizierung der Glyceroldehydrataseaktivität wurde mittels zellfreiem Extrakt von *K. pneumonia* realisiert. Dabei konnten Erkenntnisse über das Prinzip der Zufuhr von entsprechender Reaktivierungslösung erlangt werden. Auch demonstrierten die gewonnenen Erkenntnisse signifikante Zweifel bezüglich der Vorgehensweise früherer Arbeiten.

Unabhängig von Prozessstufe 1 konnte die zweite Prozessstufe, bestehend aus Propandioloxidoreduktase-Isoenzym und Wasserstoffhydrogenase, ausgehend von chemisch synthetisiertem 3-Hydroxypropionaldehyd realisiert werden. Hier zeigte sich mit der Ausbeute von 97% (0,97 mol/mol) das enorme Potential des synthetischen 1,3-Propandiolproduktionsprozesses. Es konnte somit eine unabhängige Entwicklung und Funktionsweise der Stufen gewährleistet werden, was die zukünftige Weiterentwicklung

des (Teil-)Prozesses durch Austausch einzelner Bausteine vereinfacht. Nach erfolgter Entwicklung der Teilstufen wurde anschließend der Gesamtprozess erfolgreich konstruiert. Bezüglich der eingangs formulierten Fragestellungen kann somit festgehalten werden, dass die grundsätzliche Machbarkeit eines *in vitro* Produktionsprozesses für 1,3-PDO aus Glycerol demonstriert werden konnte. Mit einer gesamtprozessbezogenen Produktausbeute von 0,95 mol/mol erweist sich dieser enzymatische Ansatz gegenüber entsprechenden Fermentations-prozessausbeuten von ca. 0,6 mol/mol als wesentlich effizienter. In einzelnen Prozessstufen konnten sogar Ausbeuten von 0,97 mol/mol erreicht werden, die somit nur um 3% vom theoretisch möglichen Ausbeutemaximum (1 mol/mol) abweichen.

Allerdings zeigt die vorliegende Arbeit auch die technischen und wissenschaftlichen Grenzen dieses enzymatischen Prozesses auf. So wurden in dieser grundsätzlichen Machbarkeitsstudie lediglich Produktkonzentrationen von <1g/L erreicht. Diese geringe volumetrische Produktivität lässt sich eindeutig auf die Glyceroldehydratase als systemischen Engpass zurückführen. Der hiermit zusammenhängende mechanismusbasierte Suizideffekt konnte durch die Entwicklung der prozessintegrierten Enzymreaktivierung umgangen werden, wodurch sich die Aktivitätsdauer des Enzyms von wenigen Minuten auf mehrere Stunden erweiterte. Der hohe Coenzym B12- und ATP-Verbrauch lässt diese Variante allerdings für Industrie und Technik kurz- und mittelfristig unwirtschaftlich erscheinen.

Aktuelle Bestrebungen verschiedener Forschergruppen, welche an den Inaktivierungseigenschaften der Glyceroldehydratase arbeiten, könnten die derzeitige Unwirtschaftlichkeit des hier entwickelten Verfahrens langfristig in ein Substitutionspotential verwandeln. Diverse molekularbiologische Ansätze zielen derzeit auf die Unterbindung jenes mechanismusbasierten Suizideffekts ab, welcher den Engpass im vorliegenden System darstellt. Gelingt es, mittel- oder langfristig, durch gerichtete Mutation eine Glyceroldehydratase zu entwickeln, die diesen mechanismusbasierten Suizideffekt nicht mehr aufweist, würden diverse hier identifizierte Schwierigkeiten simultan gelöst werden können: Zum einen würde eine stetige Reaktivierung der Glyceroldehydratase durch Coenzym B12 und ATP entfallen, was sowohl Prozessaufwand als auch Kosten enorm senken würde. Zum anderen würde sich durch die verhinderte Inaktivierung auch die volumetrische Produktivität des *in vitro* Prozesses bis auf Fermentationsniveau oder darüber hinaus steigern lassen. Ein in

diesem Fall zukünftig zu untersuchender Effekt ist eine mögliche *in vitro* Produktinhibierung der Enzyme durch hohe 1,3-PDO-Konzentrationen. Während durch Zellkompartimentierung *in vivo* eine Feed-Back-Inhibierung durch das Fermentationsprodukt 1,3-PDO nicht beobachtet werden kann, könnte diese bei *in vitro* Prozessen durchaus negative Auswirkungen hervorrufen.

Der in der vorliegenden Arbeit entwickelte Produktionsprozess stellt für sich genommen kein wirtschaftlich bedeutendes Substitutionsverfahren gegenüber etablierten Fermentationsprozessen dar. Allerdings wurden hier grundlegende Untersuchungen für zukünftige, hocheffiziente *in vitro* Produktionsprozesse geschaffen. Mit einer entsprechend modifizierten Glyceroldehydratase könnte eines Tages das Potential vorliegen, derzeitige Fermentationsprozesse, mit deren unerwünschten Nebeneffekten wie CO₂-Produktion und ineffiziente Rohstoffausnutzung, langfristig abzulösen.

6 Literaturverzeichnis

- Abeles**, R. H., Lee, H. A. (1961) An intramolecular oxidation-reduction requiring a cobalamide coenzyme. *J. Bio. Chem.* 236 (8): 2347-2350.
- Adams**, M. W. W., Ma, K. (2001) Hydrogenase I and II from *Pyrococcus furiosus*. *Methods in Enzymology*. 331:208-216.
- Adams**, M. W., Bryant, F. O. (1988) Characterization of Hydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.*, 264:5070-5079.
- Ahrens**, K., Menzel, K., Zeng, A.-P., Deckwer, W. (2000) Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumonia* in anaerobic continuous culture: III. Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 59:544-552.
- Anex**, R. P., Olgetree, A. L. (2006) Life-cycle assessment of energy-based impacts of a biobased process for producing 1,3-propanediol. *ACS Symposium Series*, 921: 222-238.
- Antranikian**, G. (2006) *Angewandte Mikrobiologie*, Springer Verlag.
- Ardao**, I., Zeng, A.-P. (2012). In silico evaluation of a complex multi-enzymatic system using one-pot and modular approaches: Application to the high-yield production of hydrogen from a synthetic metabolic pathway. *Chem Eng. Sci.* 87, 183-193.
- Atsumi**, S., Wu, T.Y., Eckl, E.M., Hawkins, S.D., Buelter, T., Liao, J.C. (2010) Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in *Escherichia coli* by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85(3):651-657.
- Bachovchin**, W. W., Eagar, R.G., and Richards, J.H. (1977) Mechanism of action of adenosylcobalamin: glycerol and other substrate analogues as substrates and inactivators for propanediol dehydratase - kinetics, stereospecificity, and mechanism. *Biochemistry* 16:1082-1092.
- Baerns**, M., Behr, A., Brehm, A., Gmehling, J. et al. (2007) *Technische Chemie*, Wiley-VCH, 6. Auflage, ISBN 3527310002.
- Bentley**, R. W., Mannan, S. A., Wheeler, S. J. (2007): Assessing the date of the global oil peak: The need to use 2P reserves. *Energy policy* 35: 6364-6382
- Biebl**, H., Menzel, K., Zeng, A.-P., Deckwer, W.-D. (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52,: 289-297.
- Biller**, K. F. (2002) *Fermentation hyperthermophiler Mikroorganismen am Beispiel von Pyrococcus furiosus*. Shaker Verlag.
- Bisswanger**, H. (2000) *Enzymkinetik – Theorie und Methoden*, Wiley-VCH-Verlag, 3. Auflage, ISBN 3527300961.
- Broderick**, G. A., Leon, N., Nakamura, Y. (2000) Potential of fermentation byproducts as nitrogen supplements for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 83: 2548-2556.
- Chatzifragfou**, A., Papanikolaou, S., Diezt, D., Doulgeraki, A. I., Nychas, G.-J. E., Zeng, A.-P. (2011) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91:101-112.

- Cheng**, K.-K., Liu, D.-H., Sun, Y., Liu, W.-B. (2004) 1,3-Propanediol production by *Klebsiella* under different aeration strategies. *Biotechnology Letters* 26: 911-915.
- Chmiel**, H (2011) *Bioprozesstechnik*, Spektrum-Verlag, ISBN 978-3-8274-2476-1.
- Circle**, S. J., Stone, L., Boruff, C. S. (1945) Acrolein determination by means of Tryptophane, *Ind. Eng. Chem. Anal.* 17:259-262
- Cowan**, A. C., Casanueva, A. (2007) Stability of ATP in antarctic mineral soils, *Polar Biology*, 30:1599-1603.
- Daniel**, R., Boenigk, R., Gottschalk, G. (1995) Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpression of the corresponding gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:2151–2156.
- Fiala**, G. and Stetter, K. O. (1986) *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Archives of Microbiology* 146, :56-61.
- Forage**, R. G., Foster, M. A. (1982) Glycerolfermentation in *Klebsiella Pneumoniae*: Functions of coenzyme B12- dependent glycerol und diol dehydratases, *J. Bacteriology* 149:413-419.
- Forsberg**, C. W. (1987) Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species, *Applied and environmental microbiology* 53:639-643.
- Hodgan**, C. E., Jewett, M. C. (2012): Cell-free synthetic biology: thinking outside the cell. *537 Metab Eng* 14:261–269
- Honda**, S., Toraya, T., and Fukui, S. (1980) In situ reactivation of glycerol-inactivated coenzyme B12-dependent enzymes, glycerol dehydratase and diol dehydratase. *J Bacteriol* 143:1458-1465.
- Illanes**, A (2008) *Enzyme Biocatalysis – Principles and Applications*, Springer-Verlag, ISBN 1402083602.
- Jarboe**, L. R. (2011) YqhD: a broad-substrate range aldehyde reductase with various applications in production of biorenewable fuels and chemicals. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:249–257.
- Kajiura**, H., Mori, K., Tobimatsu, T., and Toraya, T. (2001) Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol.Chem.* 276:36514-36519.
- Kaltofen**, R., Ziemann, J. et al. (1998) *Tabellenbuch Chemie*, Harri-Verlag, 13. Auflage, ISBN 10381711561X.
- Keasling**, J. D., Dueber, J. E., Wu, G. C. et al. (2009) Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux, *Nature Biotech.* 27:753-759.
- Krahe**, M. (1998), *Kultivierung von Mikroorganismen zu hohen Zelldichten*, Shaker Verlag.
- Kube**, J. (2007), *Verflüssigung von organischen Reststoffen durch Mikroorganismen bei extrem hohen Temperaturen unter anaeroben Bedingungen*, Books on Demand Verlag .
- Lee** C, Kim I, Lee J, Lee KL, Min B, Park C (2010) Transcriptional activation of the aldehyde reductase yqhD by YqhC and its implication in glyoxal metabolism of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 192 :4205–14.
- Li** HM, Chen J, Li YH (2008) Enhanced activity of YqhD oxidoreductase in synthesis of 1, 3-propanediol by error-prone PCR. *Prog Nat Sci* 18:1519–24.
- Menzel**, K. P., Zeng, A.-P., Deckwer, W.-D. (1997) Enzymatic evidence for an involvement of pyruvate dehydrogenase in the anaerobic glycerol metabolism of *K. pneumoniae*. *J. of Biotech.* 56:135-142.

- Menzel**, K. P. (1999) Analyse der Stoffflüsse und Metabolic Engineering der Glycerinvergärung zu 1,3-Propanediol durch *Klebsiella pneumoniae*, Dissertation. TU Braunschweig.
- Mertens** R., L. Greiner, E.C.D. van den Ban, H.B.C.M. Haaker, A. Liese (2003) Practical applications of hydrogenase I from *Pyrococcus furiosus* for NADPH generation and regeneration. *J. Molec. Catal. B: Enzymatic* 24-25, 39-52.
- Metsoviti**, M., Parakevaidi, K., Koutinas, A., Zeng, A.-P., Papanikolaou, S. (2012) Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media, *Process Biochemistry* 47:1872-1882.
- Miller** EN, Jarboe LR, Yomano LP, York SW, Shanmugam KT, Ingram LO (2009) Silencing of NADPH-dependent oxidoreductase genes (*yqhD* and *dkgA*) in furfural-resistant ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 75:4315-4323.
- Näther**, D. (2007) Untersuchung der Flagellen von *Pyrococcus furiosus*, Dissertation. Universität Regensburg.
- Nemeth**, A., Sevela, B. (2008) Development of a new bioprocess for production of 1,3-propanediol I.: Modeling of Glycerol Bioconversion to 1,3-propanediol with *Klebsiella pneumoniae* Enzymes. *Appl. Biochem. Biotech.* 144:47-58.
- Pandey**, A., Webb, C., Soccol, C. et al. (2005) *Enzyme Technology*, API, ISBN 8187680121.
- Pawelkiewicz**, J., Zagalak, B. (1965) Enzymatic conversion of glycerol into beta-hydroxy-propionaldehyde in a cell-free extract from *Aerobacter aerogenes*, *Acta Biochem. Polonica.* 12:207-218
- Peng**, Q. L., Schärer, S., Puhán, Z. (2002) Production and stability of 3-hydroxypropion-aldehyde in *Lactobacillus reuteri*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:73-80.
- Perez** J. M., Arenas F. A., Pradenas G. A., Sandoval J. M., Vasquez C.C. (2008) *Escherichia coli* YqhD exhibits aldehyde reductase activity and protects from the harmful effect of lipid peroxidation-derived aldehydes. *J Biol Chem* 283:7346-7353.
- Poznanskaya**, A. A. and Yakusheva, M. I. Y. V. A. (1979). Study on the mechanism of action of adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase from *Aerobacter aerogenes*: II. The inactivation kinetics of glycerol dehydratase complexes with adenosylcobalamin and its analogs. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 194:379-386.
- Poznanskaya** A.A., Yakusheva M.I., and Yakovlev V.A. (1977). Study of the mechanism of action of adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase from *Aerobacter aerogenes*. II. The inactivation of kinetics of glycerol dehydratase complexes with adenosylcobalamin and its analogs. *Biochim Biophys Acta* 484:236-243.
- Raynaud**, C., Sarçabal, P., Meynial-Salles, I., Croux, C., and Soucaille, P. (2003). Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5010-5015.
- Sarcabal**, P., Croux C., and Soucaille P. (2001). Method for preparing 1,3-propanediol by a recombinant microorganism in the absence of coenzyme B12 or one of its precursors. (W00104324).
- Schneider**, Z., Larsen, E. G., Jacobson, G., Johnson, B. C., and Pawelkiewicz, J. (1970). Purification and properties of glycerol dehydrase. *Journal of Biological Chemistry* 245:3388-3396.
- Schneider**, Z. and Pawelkiewicz. (1966). The properties of glycerol dehydratase isolated from *Aerobacter aerogenes*, and the properties of the apoenzyme subunits. *J. Acta Biochim. Polon.* 13:311-328.

- Schomburg**, K. T., Ardao, I., Götz, K., Rieckenberg, F., Liese, A., Zeng, A.-P., Rarey, M. (2012) Computational biotechnology: Prediction of competitive substrate inhibition of enzymes by buffer compounds with protein-ligand docking. *Journal of Biotech.* 161:391-401.
- Smiley**, K. L., Sobolov, M. (1962) A cobamide-requiring glycerol dehydrase from an acrolein-forming *Lactobacillus*, *Arch. Biochemistry and Biophysics* 97:538-543.
- Storhas**, W. (1994) *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen*, Vieweg-Lehrbuch Biotechnologie.
- Tobimatsu**, T., Kajiura, H., Yunoki, M., Azuma, M., and Toraya, T. (1999). Identification and expression of the genes encoding a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Bacteriol.* 181:4110-4113.
- Toraya**, T. (1994) Diol Dehydrase and Glycerol Dehydrase, Coenzyme B12-dependent Isoenzymes, *Metal Ions in Biological Systems* 30:217-254.
- Toraya**, T., Kuno, S., Fukui, S. (1980) Distribution of coenzyme B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of Enterobacteriaceae and Propionibacteriaceae, *Journal of Bacteriology* 141:1439-1442.
- Toraya**, T., Fukui S. (1977a) Immunological evidence for the difference between coenzyme B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. *Eur. J. Biochem.* 76:285-289.
- Toraya**, T., Ushio K., Fukui S., Hogenkamp H. (1977b) Studies on the mechanism of the adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction by the use of analogs of the coenzyme, *J. Bio. Chem.* 252:963-970.
- Toraya**, T., Shirakashi, T., Kosuga T., Fukui S. (1976) Substrate specificity of coenzyme B12-dependent diol dehydrase: Glycerol as both a good substrate and a inactivator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69:475-480.
- Tundo**, P., Anastas, P., Black, D. et al. (2000) Synthetic pathways and processes in green chemistry, *Pure applied chemistry* 72:1207-1228.
- Ulmer**, C. (2009) *Mikrobielle Produktion von 3-Hydroxypropionaldehyd. Prozessentwicklung, Optimierung und Aufarbeitung*, Dissertation Shaker Verlag.
- Ushio**, K., Honda, S., Toraya, T., Fukui, S. (1982) The mechanism of in situ reactivation of glycerol-inactivated coenzyme B12-dependent enzymes, glycerol dehydratase and diol dehydratase, *Journal of Nutrition Science and Vitaminology* 28:225-236.
- van Haaster** D.J., Silva, P.J., Hagedoorn, P.-L., Jongejan, J.A., Hagen W.R. (2007) Reinvestigation of the steady-state kinetics and physiological function of the soluble NiFe-hydrogenase I of *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriology* 190:1584-1587.
- Vignais**, P. M., Billoud, B. (2007) Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview, *Chemical Review*, 107:4206-4272.
- Vollenweider**, S., Grassi, G., König, I., and Puhon, Z. (2003) Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. *J.Agric.Food Chem.* 51:3287-3293.
- Winslow**, D. L., Garbers, S., Reid, C. et al. (1996) Selection conditions affect the evolution of specific mutations in the reverse transcriptase gene associated with resistance to DMP 266, *AIDS* 10:1205-1209.
- Wu**, J. T., Wu, L. H., Knight, J. A. (1987) Effect of various factors on the kinetics of degradation, *Clinical Chemistry* 32:314-319.
- Xu**, X.-L., Zhang, G.-L., Wang, L.-W., Ma, B.-B., Li, C. (2009) Quantitative analysis on inactivation and reactivation of recombinant glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Molecular Catalysis* 56:108-114.

- Yamanishi**, M., Kinoshita, K., Fukuoka, M., Saito, T., Tanokuchi, A., Ikeda, Y., Obayashi, H., Mori, K., Shibata N., Tobimatsu, T., Toraya T. (2012) Redesign of coenzyme B12 dependent diol dehydratase to be resistant to the mechanism-based inactivation by glycerol and act on longer chain 1,2-diols. *The FEBS Journal* 279:793-804.
- Zeng**, A.-P. (1996) Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioproc. Eng.* 14:169–175.
- Zeng**, A.-P., Biebl, H., Deckwer, W.-D. (1997) Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol — recent progress;:264–279. In: B. C. Saha and J. Woodward (eds.), *Fuels and chemicals from biomass*. ACS symposium series 666. ACS, Washington, DC.
- Zeng**, A.-P., Biebl, H. (2002) Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science* 74: 239-259.
- Zeng**, A.-P., Sabra, W. (2012) Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. *Current opinion in biotech.* 22:749-757.
- Zhang**, J.-H., Dawes, G., Stemmer, W. P. C. (1997) Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening, *Nat. Ac. Of Sc. USA* 94:4504-4509.
- Zhang**, Y., Huang, Z., Du, C., Li, Y., Cao, Z. (2009) Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol, *Metabolic Engineering* 51:101-106.
- Zhang**, L., Shi, J., Jiang, Z. (2011) Bioinspired preparation of polydopamine microcapsule for multienzyme system construction, *J. Green Chemistry* 13:300-308.
- Zhu**, J.-G., Li, S., Ji, X.-J., Huang, H., Hu, N. (2009) Enhanced 1,3-propanediol production in recombinant *Klebsiella pneumoniae* carrying the gene *yqhD* encoding 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme, *World J Microbiol Biotechnol* 25:1217–1223.
- Zlokarnik**, M. (2005) *Scale-up: Modellübertragung in der Verfahrenstechnik*, Wiley-VCH Verlag,