

# **Einfluss intrazellulärer Nukleotid-Cofaktoren auf Redoxreaktionen in rekombinanten Ganzzellsystemen**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Daniel Minör**  
aus Perleberg

Jülich, Mai 2011



Aus dem Institut für Bio-und Geowissenschaften-1: Biotechnologie der  
Forschungszentrum Jülich GmbH angeschlossen an die Heinrich-Heine Universität  
Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Jörg Pietruszka  
Korreferent: Apl. Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2011



## Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen, Darstellungen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Textstellen, die wortwörtlich oder sinngemäß anderen Werken oder sonstigen Quellen entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall unter genauer Angabe der jeweiligen Quelle, auch der Sekundärliteratur, als Entlehnung gekennzeichnet.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass die Dissertation in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht wurde.

Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

---

(Datum, Unterschrift)



## Danksagung

Ich möchte mich bei der Forschungszentrum Jülich GmbH bedanken, die mir mit ihrer Infrastruktur ein optimales Umfeld geboten hat, um diese Arbeit anzufertigen. Ohne die Unterstützung einer Vielzahl an Personen wäre diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen, aus diesem Grund möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben. Persönlich möchte ich mich vor allem bedanken bei:

- Herrn Prof. Dr. Wandrey und Herrn Prof. Dr. Wiechert für die Möglichkeit die Arbeit an einem hervorragenden Institut, dem alten IBT 2 und dem nun neuen IBG-1: Biotechnologie, unter optimalen Bedingungen durchführen zu können.
- Herrn Prof. Dr. Jörg Pietruszka für die Übernahme der Promotion und die Hilfe bei den chemischen Fragestellungen innerhalb der Arbeit.
- Frau Prof. Dr. Martina Pohl für die Betreuung und Korrektur dieser Arbeit sowie die konstruktiven Diskussionen über die Arbeit, die für mich sehr hilfreich waren.
- Dr. Tina Kubitzki, die neben ihrer eigenen Arbeit stets ein offenes Ohr für mich hatte und die ich über die Jahre in Jülich nicht nur dienstlich sehr schätzen gelernt habe.
- Heike Offermann für den Anteil den sie zu dieser Arbeit beigetragen hat und dafür dass sie es die ganze Zeit geduldig mit mir in einem Labor ausgehalten hat, ich habe viel von ihr gelernt.
- Christoph Scheeren für die Ergebnisse, die aus aus seinem Praxissemester und der anschließenden Bachelorarbeit hervorgegangen sind.
- Doris Hahn für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten, Lilia Arnold, die mir meine ersten Gehversuchen mit der LC-MS/MS erleichtert hat und Ursula Mackfeld für die kompetente Beratung bei praktischen Problemen auf dem Gebiet der Biokatalyse.
- Der Bioprozesstechnik und Bioanalytik-Gruppe für die Unterstützung bei der Kultivierung meiner Biokatalysatoren und den Support bei der Messung der intrazellulären Cofaktoren.
- Der Micro Scale Bioengineering-Gruppe und dort vor allem Dr. Dietrich Kohlheyer und Alexander Grünberger die es mir ermöglicht haben meinen Zellen mal tiefer in die Augen schauen zu können.
- Dr. Stephanie Bringer-Meyer für die Diskussionen über die intrazellulären Cofaktoren und ihr Interesse an meiner Arbeit.
- Marianne Hess für die Hilfe zur Überwindung der bürokratischen Hürden meiner Arbeit und die alltäglichen Fragestellung beim Überleben in Jülich.

- Hubert Ruhrig und Mario Fricke für die ständige Unterstützung und Bereitschaft, wenn ganz kurzfristig Etwas gebaut werden musste oder eine Schraube klemmte und für die kurzweiligen Ablenkungen zwischendurch.
- Der gesamten Mannschaft der elektronischen Werkstatt, die mir bei elektronischen Problemen immer eine sehr große Hilfe waren.
- Meinem Vater und Renate für ihre Zuversicht, die stetige Unterstützung über die Jahre der Arbeit und einfach nur dafür dass ich weiß, dass ihr immer für mich da seid.
- Meiner Freundin Christiane für ihre unendliche Geduld, die sie mit mir bewiesen hat und immer währendes Verständnis für meine Arbeit.
- Dem europäischen Fonds für regionale Entwicklung für die Finanzierung des Projektes im Rahmen des Förderwettbewerbes Bio.NRW RedoxCell



**Europäische Union**

**Europäischer Fonds für regionale Entwicklung  
Europa - Investition in unsere Zukunft**

„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.“

*Marie Curie*

Für Christiane



## Abstract

Enzymatic reaction systems performed under mild reaction conditions represent an interesting alternative to multistep chemical routes. In the recent years, the use of enzyme-catalyzed reactions for the production of chiral building blocks has significantly increased. Oxidoreductases are often used for such reactions, either as isolated enzymes or in whole cell systems. These enzymes require cofactors, such as NAD(P)H, which have to be added to the reaction system in case of isolated enzymes. This increases the production costs, which can be avoided by using intracellular cofactors of whole cell systems. A recycling system needs to be implemented in the whole cell system to cope with the stoichiometric consumption of the cofactor within the reaction. This can be accomplished by a substrate-coupled regeneration system, in which one enzyme catalyzes the production and the regeneration reaction, or an enzyme-coupled regeneration system, in which two enzymes are required. In the past, whole cell biotransformation systems have been intensively characterized and optimized with regard to reaction engineering, but only little information is available on the involved cofactors, their stability and availability within the reaction.

In this thesis, the cofactor stability and availability has been investigated using two reaction systems: a substrate-coupled whole cell system using an alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* (*LbADH*) and a new established enzyme-coupled whole cell reaction system using an ene reductase (ER) from *Saccharomyces carlsbergensis* together with the *LbADH*.

For the *LbADH* system the lower limit of necessary cofactor concentration for this reaction was identified at the timepoint of decreasing conversion. The very short shelf life of the cofactors is the main limiting factor for long-term processes. In contrast, the availability of the cofactors for redox reactions could be increased by reducing the reaction time in case of a batch reaction mode. It was obvious that the substrate-coupled cofactor regeneration is very effective, even at low cofactor levels and that a certain loss of cofactor, using higher concentrations of substrates in batch reactions, is acceptable leading in higher product yields.

The ER/*LbADH* system was applied for the asymmetric reduction of nitroacrylate, using isopropanol as substrate for cofactor regeneration in continuous- and batch reaction modes. While a rapid loss of intracellular cofactors could be observed in the continuous reaction, their stability and availability could again be increased by applying a batch reaction mode. The decrease in cofactors in the continuous reaction was even more pronounced compared to the *LbADH* system.

The more detailed knowledge of the limiting influences, caused by decreasing intracellular cofactor concentrations, can now be used to make large scale or industrial applications of whole cell systems economically more feasible. The presented results show that especially for enzyme-coupled approaches a fine-tuned adjustment of the reaction conditions is essential for effective cofactor regeneration to achieve high conversions. The loss of intracellular cofactors is a complex process, encompassing the influence of organic substrates and products and the reaction time, thus these parameters should be tested for every whole cell system before upscale.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Stereoselektive Synthesen . . . . .	1
1.2	Biokatalytische Reaktionen mit isolierten Oxidoreduktasen . . . . .	3
1.2.1	Cofaktorabhängigkeit von Oxidoreduktasen . . . . .	7
1.2.2	Methoden der Cofaktorregenerierung . . . . .	9
1.3	Ganzzellbiotransformationen . . . . .	13
1.4	Betrachtung der Cofaktoren bei Biotransformationen mit ruhenden Zellen . . . . .	15
1.5	Cofaktoranalytik . . . . .	17
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>22</b>
3.1	Cofaktoranalytik . . . . .	22
3.1.1	Quantifizierung intrazellulärer Cofaktoren . . . . .	22
3.2	Cofaktorstabilität während der Probenaufarbeitung und der Messung	26
3.2.1	Zusammenfassung . . . . .	28
3.3	Intrazelluläre Cofaktorstabilitäten im <i>Escherichia coli</i> -Wirtsstamm . . .	29
3.3.1	Zusammenfassung . . . . .	32
3.4	Ganzzellbiotransformationen mit Substrat-gekoppelter Cofaktorregenerierung . . . . .	33
3.4.1	Ganzzellbiotransformation mit dem ADH/ADH-System . . . . .	33
3.4.2	Kontinuierliche Ganzzellbiotransformation . . . . .	33
3.4.3	Cofaktorstabilität ohne den Einfluss von Substraten und Produkten . . . . .	38
3.4.4	Ganzzellbiotransformationen im Satzverfahren . . . . .	41
3.4.5	Zusammenfassung . . . . .	47
3.5	Ganzzellbiotransformationen mit Enzym-gekoppelter Cofaktorregenerierung . . . . .	49
3.5.1	Produktion und Aufreinigung der ER . . . . .	49
3.5.2	Charakterisierung der ER . . . . .	51
3.5.3	Synthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat . . . . .	52
3.5.4	Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat mit Natriumborhydrid . . . . .	54

3.5.5	Ermittlung der kinetischen Parameter für (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat . . . . .	54
3.5.6	Biokatalytische Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat mit isolierter ER im Satzreaktor . . . . .	55
3.5.7	Zusammenfassung . . . . .	58
3.6	Ganzzellbiotransformationen mit dem ER/ADH-System . . . . .	59
3.6.1	Klonierung und Transformation des pCDF-Duet- <i>LbADH</i> - <i>OYE</i> -Vektors . . . . .	59
3.6.2	Expressionsoptimierung ER/ADH-System . . . . .	60
3.6.3	Ganzzellbiotransformation im Satzverfahren . . . . .	63
3.6.4	Kontinuierliche Ganzzellbiotransformation . . . . .	66
3.6.5	Zusammenfassung . . . . .	70
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>77</b>
6.1	Chemikalien . . . . .	77
6.2	Verwendete Geräte . . . . .	77
6.3	Verwendete Materialien . . . . .	80
6.4	Biologische Materialien . . . . .	81
6.4.1	Verwendete Plasmide . . . . .	81
6.4.2	Verwendete Stämme . . . . .	81
6.4.3	Klonierung des pCDF-Duet- <i>OYE</i> - <i>LbADH</i> -Plasmids . . . . .	82
6.4.3.1	Klonierung des <i>lbadh</i> -Gens und des <i>oye</i> -Gens . . . . .	82
6.4.3.2	Präperative Agarosegele . . . . .	88
6.5	Expressionsoptimierung für das ER/ADH-System . . . . .	88
6.6	Herstellung der Ganzzellbiokatalysatoren . . . . .	91
6.7	Ganzzellbiotransformationen . . . . .	93
6.7.1	Ermittlung der Cofaktorstabilität ohne den Einfluss von Substraten . . . . .	93
6.7.2	Ganzzellbiotransformationen mit dem ADH/ADH-System . . . . .	94
6.7.2.1	Kontinuierliche Reaktionsführung . . . . .	94
6.7.2.2	Ganzzellbiotransformationen im Satzverfahren . . . . .	95
6.7.3	Ganzzellbiotransformation mit dem ER/ADH-System . . . . .	95
6.7.3.1	Kontinuierliche Reaktionsführung . . . . .	96
6.7.3.2	Ganzzellbiotransformationen im Satzverfahren . . . . .	96
6.8	Produktion und Aufreinigung der ER . . . . .	97
6.8.1	Expressionsoptimierung der ER . . . . .	97
6.8.2	Produktion der ER im 5 L Maßstab . . . . .	98
6.8.3	Isolierung und Aufreinigung der ER . . . . .	98
6.8.4	Charakterisierung der ER . . . . .	99

6.8.5	Bestimmung der kinetischen Parameter der ER bezüglich (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat . . . . .	99
6.9	Synthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat . . . . .	100
6.10	Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat mit Natriumborhydrid	102
6.11	Biokatalyse mit isolierter ER . . . . .	103
6.12	Analytik . . . . .	103
6.12.1	Biomassespezifische Analytik . . . . .	103
6.12.1.1	Bestimmung der optischen Dichte . . . . .	103
6.12.1.2	Bestimmung der Biotrockenmasse . . . . .	104
6.12.1.3	Bestimmung des Zellvolumens . . . . .	104
6.12.1.4	Visualisierung der Zellintegrität . . . . .	105
6.12.2	Proteinanalytik . . . . .	105
6.12.2.1	SDS-PAGE . . . . .	105
6.12.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	106
6.12.2.3	Aktivitätstest für die ER . . . . .	106
6.12.2.4	Ermittlung der Cofaktorabhängigkeit der ER . . . . .	107
6.12.2.5	Aktivitätstest für den Ganzzellbiokatalysator des ADH/ADH-System . . . . .	107
6.12.2.6	Aktivitätstest für den Ganzzellbiokatalysator des ER/ADH-System . . . . .	108
6.12.3	Gaschromatographie . . . . .	108
6.12.4	Enantiomerenanalytik . . . . .	109
6.12.5	Kernresonanzspektroskopie . . . . .	111
6.12.6	Cofaktoranalytik . . . . .	111
6.12.6.1	Herstellung der <sup>13</sup> C-markierten Cofaktorstandards . .	111
6.12.6.2	Probenaufarbeitung . . . . .	114
6.12.6.3	Messung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen	115
6.12.6.4	Bestimmung der Stabilität der Cofaktoren während der Probenaufarbeitung . . . . .	118
	<b>Literaturverzeichnis . . . . .</b>	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>Anhang . . . . .</b>	<b>133</b>
7.1	Sequenzen der verwendeten Gene . . . . .	133
7.1.1	Sequenz des <i>adh</i> -Gens . . . . .	133
7.1.2	Sequenz des <i>oye</i> -Gens . . . . .	134
7.2	NMR-Spektren der Nitro-Verbindungen . . . . .	135
7.3	Chromatogramme Enantiomerenanalytik . . . . .	138

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau von Stereozentren durch asymmetrische Reduktion . . . . .	2
1.2	Beispiele chemischer asymmetrischer Reduktion . . . . .	3
1.3	ADH aus <i>Lactobacillus brevis</i> . . . . .	5
1.4	Monomer der Enreduktase aus <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> . . . . .	6
1.5	Nicotinamid-Cofaktoren . . . . .	7
1.6	Übertragung des Hydridions vom Cofaktor auf das Substrat bei ADH's	8
1.7	Übertragung des Hydridions vom Cofaktor auf das FMN und folgend auf den entsprechenden Akzeptor . . . . .	8
1.8	Beispiel für eine <i>LbADH</i> -katalysierte Reaktion unter Cofaktorregene- rierung . . . . .	10
3.1	Cofaktorverteilung ohne artifizielle Veränderung der Cofaktorpools .	24
3.2	Cofaktorverteilung mit artifizieller Veränderung der Cofaktorpools nach der Kultivierung mit <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -Glukose . . . . .	25
3.3	Stabilitäten der Cofaktoren während der Probenaufarbeitung . . . . .	27
3.4	Cofaktorstabilitäten während der Standzeiten im Autosampler . . . . .	28
3.5	Entwicklung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen von <i>E. coli</i> BL21* (DE3) Wirtszellen ohne den Einfluss von Substraten und Pro- dukten bei 30 °C . . . . .	30
3.6	Entwicklung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen von <i>E. coli</i> BL21* (DE3) Wirtszellen ohne den Einfluss von Substraten und Pro- dukten bei 4 °C . . . . .	32
3.7	Umsätze während der kontinuierlichen Biotransformation von Methyl- acetoacetat . . . . .	35
3.8	Intrazelluläre NADP(H)-Konzentration während der kontinuierlichen Umsetzung von Methylacetoacetat . . . . .	36
3.9	Entwicklung der Cofaktorkonzentrationen bei rekombinanten <i>E. coli</i> BL21* (DE3)- <i>LbADH</i> -Zellen ohne den Einfluss von Substraten und Produkten bei 30 °C . . . . .	39
3.10	Beeinflussung der Zellintegrität rekombinanter <i>E. coli</i> BL21* (DE3)- <i>LbADH</i> -Zellen durch die Lagerung der Zellen in 50 mM Phos- phatpuffer bei pH 6,0 . . . . .	40
3.11	Umsätze über den zeitlichen Verlauf der Reduktion von Methylacetoa- cetate innerhalb der einzelnen Batch-Reaktionen . . . . .	42

3.12	Entwicklung der intrazellulären Cofaktorkonzentration in <i>E. coli</i> BL21* (DE3)- <i>LbADH</i> -Zellen mit 3,0 M Isopropanol im Satzverfahren . . . . .	43
3.13	Beeinflussung der Zellintegrität durch 3 M Isopropanol . . . . .	46
3.14	Beeinflussung der Zellintegrität durch 0,3 M Isopropanol . . . . .	46
3.15	(Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat . . . . .	52
3.16	Erste Stufe der Substratsynthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat	53
3.17	Zweite Stufe der Substratsynthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat	53
3.18	Einfluss der (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat-Konzentration auf die Aktivität der ER . . . . .	55
3.19	Reaktionsschema der Bio-reduktion mit der ER in Verbindung mit der <i>LbADH</i> . . . . .	56
3.20	Produktkonzentration der ER-katalysierten Umsetzung von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat über den zeitlichen Verlauf der Reaktion . . . . .	57
3.21	SDS-PAGE des Rohextraktes von rekombinanten <i>E. coli</i> BL21* (DE3)-ER- <i>LbADH</i> -Zellen nach Silberfärbung . . . . .	59
3.22	SDS-PAGE des Rohextraktes nach Silberfärbung von rekombinanten <i>E. coli</i> BL21* (DE3)-ER- <i>LbADH</i> -Zellen nach der Expressionsoptimierung	62
3.23	Produktkonzentrationen über den Reaktionszeitraum bei der Ganzzellbiotransformation mit <i>E. coli</i> BL21* (DE3)-ER- <i>LbADH</i> von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat im Satzverfahren . . . . .	64
3.24	Intrazelluläre NADP(H)-Konzentrationen während der Ganzzellreduktion mit <i>E. coli</i> BL21* (DE3)-ER- <i>LbADH</i> von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat im Satzverfahren . . . . .	65
3.25	Umsätze innerhalb der kontinuierlichen Ganzzellbiotransformation von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat . . . . .	67
3.26	Intrazelluläre Cofaktorkonzentrationen bei der kontinuierlichen Umsetzung von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat . . . . .	67
3.27	Beeinflussung der Zellintegrität innerhalb der kontinuierlichen Umsetzung von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat . . . . .	68
6.1	Erstellung des pCDF-Duet- <i>OYE-LbADH</i> -Plasmides . . . . .	82
6.2	Parallelerfermentationsanlage der Firma DASGIP AG . . . . .	89
6.3	7,5 L Laborfermenter der Firma Bioengineering AG . . . . .	91
6.4	Schema Herstellung Ganzzellbiokatalysator . . . . .	93
6.5	Schema Kontinuierliche Ganzzellbiotransformation . . . . .	94
6.6	Erste Stufe der Substratsynthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat	100
6.7	Zweite Stufe der Substratsynthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat . . . . .	101
6.8	Probenaufarbeitung intrazelluläre Cofaktoren . . . . .	114
7.1	<sup>1</sup> H-NMR des 2-Hydroxy-2-methyl-3-nitropropanoat . . . . .	135
7.2	<sup>13</sup> C-NMR des 2-Hydroxy-2-methyl-3-nitropropanoat . . . . .	135
7.3	<sup>1</sup> H-NMR des (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat . . . . .	136
7.4	<sup>13</sup> C-NMR des (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat . . . . .	136

7.5	$^1\text{H}$ -NMR des Produktes der ER katalysierten Reaktion . . . . .	137
7.6	$^{13}\text{C}$ -NMR des Produktes der ER katalysierten Reaktion . . . . .	137
7.7	( <i>R</i> )-Methylhydroxybutyrat (16,2 min) und ( <i>S</i> )-Methylhydroxybutyrat (16,8 min) . . . . .	138
7.8	( <i>R</i> )-Ethyl-2-methyl-3-nitropropanoat (14,2 min) und ( <i>S</i> )-Ethyl-2-methyl- 3-nitropropanoat (16,5 min) . . . . .	138

# Tabellenverzeichnis

1.1	Klassifizierung der Enzyme mit den zugehörigen katalysierten Reaktionen . . . . .	4
1.2	Beispiele möglicher Enzyme für eine Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung . . . . .	11
1.3	Beispiele für „designer bugs“ mit rekombinantem <i>Escherichia coli</i> . . . . .	14
3.1	Retentionszeiten der einzelnen Cofaktoren bei der Analytik mittels LC-MS/MS . . . . .	23
3.2	Zusammenfassung der prozentualen Wiederfindung der intrazellulären Cofaktoren nach der ersten Minute der Reaktion . . . . .	44
3.3	Optimale Parameter für die Expression der ER im 200 mL Maßstab . . . . .	50
3.4	Ergebnisse für die Expressionsoptimierung des ER/ADH-Ganzzellsystems . . . . .	61
6.1	Zusammensetzung LB-Medium bzw. LB-Agar . . . . .	83
6.2	Schmelztemperatur und GC-Gehalt der verwendeten Primer . . . . .	84
6.3	Zusammensetzung PCR Isolierung <i>lbadh</i> - und <i>oye</i> -Gen . . . . .	84
6.4	Bedingungen der Amplifikation des <i>lbadh</i> - und <i>oye</i> -Gens . . . . .	85
6.5	Zusammensetzung des Restriktionsansatzes PCR Produkte <i>lbadh</i> und Plasmid . . . . .	86
6.6	Zusammensetzung des Restriktionsansatzes PCR Produkte <i>oye</i> und pCDF-Duet- <i>LbADH</i> -Plasmid . . . . .	86
6.7	Transformation von <i>E. coli</i> BL21* (DE3) . . . . .	87
6.8	Zusammensetzung TAE-Puffer . . . . .	88
6.9	Zusammensetzung TB-Medium . . . . .	88
6.10	Prozessparameter vor Induktion der ER- und <i>LbADH</i> -Expression . . . . .	90
6.11	Parameter für die Expressionsoptimierung des ER/ADH-Systems während der Expression . . . . .	90
6.12	Prozessparameter Kultivierung Ganzzellkatalysatoren vor Induktion . . . . .	92
6.13	Zusammensetzung FB-Medium . . . . .	98
6.14	Zusammensetzung des Aktivitätstests ER . . . . .	107
6.15	Betriebsparameter GC . . . . .	109
6.16	Temperaturprofile und Retentionszeiten der achiralen Gaschromatographie . . . . .	109
6.17	Retentionszeiten Enantiomerenanalytik . . . . .	110

6.18	Zusammensetzung Minimalmedium . . . . .	113
6.19	Zusammensetzung TE-Puffer-Methanol-Lösung . . . . .	115
6.20	Zusammensetzung Laufmittel LC-MS/MS . . . . .	116
6.21	Ionenpaare die nach der Elektrospray-Ionisation der einzelnen Cofaktoren für deren Detektion im Massenspektrometer genutzt wurden . .	117

**Abkürzungen:**

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
$^{12}\text{C}$	Kohlenstoffisotop mit der Massenzahl 12
$^{13}\text{C}$	Kohlenstoffisotop mit der Massenzahl 13
$^{13}\text{C}_6$ -Glukose	vollständig $^{13}\text{C}$ -markierte Glukose
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
Amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
BFM	Biofeuchtmasse
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BTM	Biotrockenmasse
bzw.	beziehungsweise
C=C-Bindung	Kohlenstoffdoppelbindung
ca.	cirka
CBS-Boranreduktion	Corey-Bakshi-Shibita-Boranreduktion
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxiribonukleinsäure
EC	Enzymklasse, engl. enzyme class
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Enreduktase
FB	<i>fertilization broth</i>
FD	<i>fast digest</i>
FMN	Flavinmononucleotid

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
$K_m$ -Wert	Michealis-Menten-Konstante
$K_i$ -Wert	Inhibierungskonstante
lacI	lacI-Repressor
LbADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
LB	Luria Bertani
MAA	Methylacetoacetat
MHB	Methylhydroxybutyrat
MS	Massenspektroskopie
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	oxidiertes $\beta$ -1,4-Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes $\beta$ -1,4-Nicotinamidadenindinukleotid
NADP <sup>+</sup>	oxidiertes $\beta$ -1,4-Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	reduziertes $\beta$ -1,4-Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OD	optische Dichte
OYE	<i>old yellow enzyme</i>
pI	isoelektrischer Punkt
P <sub>T7</sub>	T7-Promotor
P <sub>tac</sub>	Tac-Promotor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sm <sup>R</sup>	Streptomycinresistenz
t <sub>0</sub>	Zeitpunkt zu Beginn der Reaktion

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
TB	<i>terrific broth</i>
TBA-Puffer	Tributylamin-Essigsäure-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
$V_{max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
$\lambda$	Wellenlänge

**Einheiten:**

<b>Einheit</b>	<b>Bedeutung</b>
°C	Grad Celsius
%	Prozent
bar	Druck
d	Tag
g/L	Gramm pro Liter
h	Stunde
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Molar
mbar	Millibar
mg	Milligramm
mg/L	Milligramm pro Liter
min	Minute
mL	Milliliter
mL/min	Milliliter pro Minute
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
NL	Normliter
nm	Nanometer
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde
U/g	Units pro Gramm
$\mu$ L	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
$\mu$ m	Mikrometer

# 1 Einleitung

## 1.1 Stereoselektive Synthesen

Für die biologische Wirkung von chemischen Produkten in der Medizin, im Pflanzenschutz und bei Nahrungsergänzungsmitteln ist die Chiralität ein entscheidendes Kriterium. Die steigende Bedeutung von chiralen Substanzen wird anhand der Entwicklung des globalen Umsatzes für enantiomerenreine Medikamente deutlich. In den letzten fünfzehn Jahren hat sich der Umsatz von 40 Mrd. US\$ Mitte der 90er Jahre auf ca. 200 Mrd. US\$ im Jahre 2008 verfünffacht. Somit haben enantioselektive Synthesewege eine entscheidende Bedeutung für die Wirkstoffentwicklung und -produktion (Breuer *et al.*, 2004; DECHEMA und VCI, 2006).

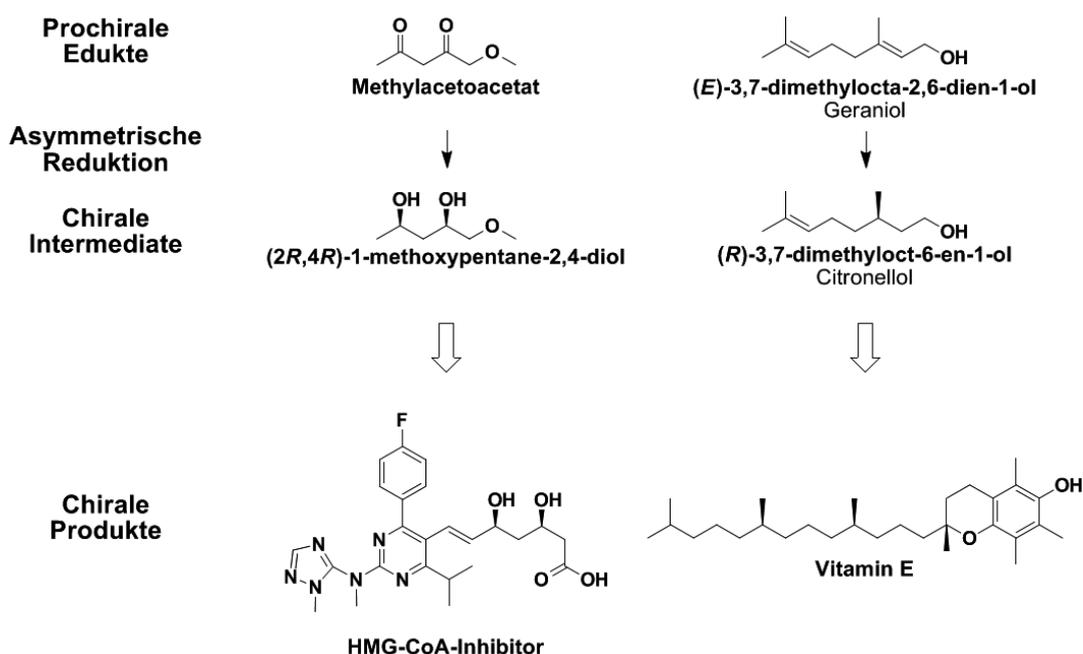
Aufgrund der großen Bedeutung von chiralen Verbindungen finden sich für die enantioselektive Synthese in der Chemie eine Vielzahl von Beispielen. So bietet sich die Einführung einer chiralen Information ausgehend von prochiralen Verbindungen an, da hier die chiralen Verbindungen mit nur einem Syntheseschritt zugänglich sind. Exemplarisch für die Umsetzung von prochiralen Verbindungen lassen sich die asymmetrische Reduktion von Carbonylverbindungen oder die asymmetrische Reduktion von Olefinen nennen. Hierbei können durch die stereoselektive Reduktion eines Carbonyls oder einer Kohlenstoffdoppelbindung neue Stereozentren aufgebaut werden, was in Abbildung 1.1 näher verdeutlicht wird.



**Abbildung 1.1:** Aufbau von Stereozentren durch asymmetrische Reduktion, A: Reduktion von Carbonylverbindungen B: Reduktion von C=C-Bindungen

Etablierte Syntheserouten für die Herstellung von chiralen Verbindungen sind beispielsweise die CBS-Boranreduktion (CBS: Corey, Bakshi und Shibita) von Carbonylverbindungen (Corey *et al.*, 1987; Corey und Helal, 1998) oder die asymmetrische Reduktion mit 2,2-Bis-(diphenylphosphino)-1,1-binaphthyl (BINAP) in Verbindung mit Rhodium oder Ruthenium (Noyori, 2002). Die für die Reaktion notwendigen Reduktionsäquivalente können dabei durch Boran oder elementaren Wasserstoff gestellt werden. Beide Verfahren lassen sich mit hervorragenden Ausbeuten und hohen Stereoselektivitäten durchführen (Blaser *et al.*, 2003; Corey *et al.*, 1987; Takaya *et al.*, 1987). Beispiele für asymmetrische Reduktionen von prochiralen Ausgangsverbindungen zu chiralen Bausteinen und möglichen Endprodukten sind in Abbildung 1.2 dargestellt.

Bei rein chemisch katalysierten Reduktionen wirkt sich die Verwendung des giftigen Borans bei der CBS-Boranreduktion oder der Einsatz von Wasserstoff unter hohen Drücken bei der Reduktion von Olefinen negativ auf die Nachhaltigkeit der Verfahren aus. Zusätzlich müssen die Katalysatoren über mehrstufige Prozesse synthetisiert werden. Durch die Verwendung von biokatalytischen Methoden kann die Nachhaltigkeit der Reaktionen erhöht werden, da sowohl die katalysierten Reaktionen und als auch die Herstellung der Biokatalysatoren unter milderer Reaktionsbedingungen erfolgen kann.



**Abbildung 1.2:** Beispiele für die asymmetrische Reduktion von prochiralen Verbindungen zu chiralen Verbindungen (Floris *et al.*, 2009; Narasaka und Pai, 1984, 1980; Noyori, 2002)

## 1.2 Biokatalytische Reaktionen mit isolierten Oxidoreduktasen

In Tabelle 1.1 sind die einzelnen Enzymklassen aufgeführt. Die Klassifizierung der Enzyme erfolgt anhand der von ihnen katalysierten Reaktionstypen. Durch die Klassifizierung der Enzyme in die 6 Hauptklassen und die jeweiligen Unterklassen ergeben sich die sogenannten vierstelligen EC-Nummern, mit denen Enzyme eindeutig identifiziert werden können. Bei den EC-Nummern gibt die erste Zahl die Hauptklasse an, die beiden folgenden die Unterklassen und die letzte Zahl dient als laufende Nummer. Die Oxidoreduktasen werden innerhalb dieser Klassifizierung in der ersten Hauptgruppe zusammengefasst. Die Enzyme dieser Klasse katalysieren Redoxreaktionen.

**Tabelle 1.1:** Klassifizierung der Enzyme mit den zugehörigen katalysierten Reaktionen (Voet *et al.*, 2002)

Enzymklasse	Katalysierte Reaktion
1. Oxidoreduktasen	Oxidations- und Reduktionsreaktionen
2. Transferasen	Übertragung chemischer Gruppen
3. Hydrolasen	Hydrolysereaktionen
4. Lyasen	Nicht hydrolytische Spalt- und Kopplungsreaktionen
5. Isomerase	Isomerisierungsreaktionen
6. Ligasen	Kopplungsreaktionen unter Energieverbrauch

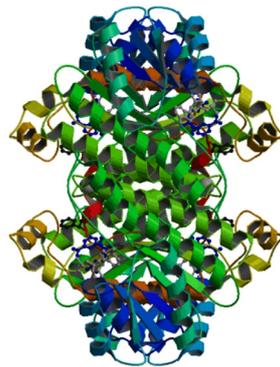
Aufgrund der mildereren Reaktionsbedingungen (pH, Temperatur u.a.), die bei biokatalytischen Methoden verwendet werden können, und der hohen Chemo-, Regio- und Stereoselektivitäten von Enzymen hat die Anzahl der Biokatalysatoren in der organischen Synthese in den letzten Jahrzehnten rapide zugenommen (Honda *et al.*, 2006). Dadurch konnten zahlreiche Verfahren für die Reduktion von Carbonylverbindungen (Fischer und Pietruszka, 2010; Goldberg *et al.*, 2007) und Kohlenstoffdoppelbindungen (Stuermer *et al.*, 2007; Toogood *et al.*, 2010) als Alternative zur chemischen Reduktion etabliert werden. Diese Reaktionen können dabei durch Nicotinamid-Cofaktor-abhängige Enzyme wie Alkoholdehydrogenasen (ADH) oder Enreduktasen (ER) katalysiert werden.

### *Enzymatische Reduktion von Carbonylverbindungen*

ADH's erweisen sich für die Reduktion von Carbonylverbindungen zu optisch aktiven Alkoholen als sehr geeignete Katalysatoren, wobei schon eine Vielzahl von Anwendungen für diese Enzyme realisiert wurde. So katalysieren ADH's die Reduktion von  $\beta,\delta$ -Diketonen für die Herstellung von Intermediaten in der Synthese von Statinen (Wolberg *et al.*, 2008). Des Weiteren können ADH's für die Herstellung von 5-Hydroxyhept-6-enoaten genutzt werden, welche als Schlüsselintermediate in der Synthese von Prostaglandinen oder Leukotrienen fungieren (Pietruszka und Fischer,

2007). Diese Reaktionen werden durch eine ADH aus *Lactobacillus brevis* (LbADH EC 1.1.1.2) (Hummel, 1997) katalysiert.

Dieses Enzym zählt zur Klasse der kurzkettigen ADH's und ist aus vier identischen Unterheiten aufgebaut. Jede Untereinheit des Homotetramers hat eine Größe von 252 Aminosäuren. Das Tetramer ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Magnesium in Form von  $Mg^{2+}$  wird von diesem Enzym als ein weiterer Cofaktor benötigt.



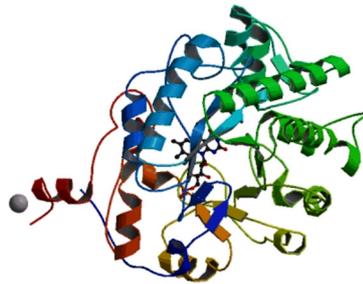
**Abbildung 1.3:** ADH aus *Lactobacillus brevis* (Schlieben *et al.*, 2005)

### *Enzymatische Reduktion von C=C-Bindungen*

Für die biokatalytische Reduktion von C=C-Bindungen lässt sich ebenfalls ein breites Methodenspektrum finden. Für eine enzymatische Reduktion von C=C-Bindungen müssen diese jedoch mit Elektronen-ziehenden Gruppen aktiviert werden, wenn die Reduktion zum Beispiel durch eine ER aus *Saccharomyces carlsbergensis* (EC. 1.6.99.1) katalysiert werden soll. Als Beispiele lassen sich hier die asymmetrischen Reduktionen von Terpenoiden, Carbonyl- oder Nitro-aktivierten C=C-Bindungen aufzuführen.

Eine technische Anwendung ist die Reduktion von Ketoisoprenon zu (*R*)-Levodion, welches als Schlüsselintermediat in der Carotinoidsynthese fungiert (Kataoka *et al.*, 2004; Leuenberger *et al.*, 1976). Ein weiteres Beispiel findet sich im Tahasago-Prozess,

worin die Reduktion von Citral zu (*S*)-Citronellal erfolgt, einem wichtigen Baustein für die Herstellung von (*L*)-Menthol (Müller *et al.*, 2006). Für die Herstellung von optisch aktiven  $\beta$ -Aminosäuren ist die biokatalytische Reduktion als Zwischenschritt für die Einführung einer chiralen Information eine etablierte Methode (Swiderska und Stewart, 2006). Das bei diesen Reaktionen genutzte Enzym ist bereits 1933 von Warburg als „gelbes Ferment“ (yellow enzyme) beschrieben worden (Warburg und Christian, 1933). Bei diesem Enzym handelt es sich um ein Homodimer mit einer Größe von 400 Aminosäuren pro Untereinheit. Beide Untereinheiten des Enzyms tragen den farbgebenden nicht kovalent gebundenen Cofaktor Flavinmononucleotid (FMN). In Abbildung 1.4 ist eine Untereinheit der ER aus *Saccharomyces carlsbergensis* dargestellt. Das 1933 aus der Bierhefe isolierte Enzym war dabei namensgebend für eine Gruppe von analogen Enzymen, die unter dem Namen *Old Yellow Enzymes* (OYE) zusammengefasst werden.



**Abbildung 1.4:** Monomer der Enreduktase aus *Saccharomyces carlsbergensis* (Brown *et al.*, 1998)

Vorteilhaft bei der Nutzung von isolierten Enzymen ist der Einsatz von nur einem oder zwei Enzymen, so dass das Auftreten von Nebenprodukten innerhalb der Reaktion minimiert werden kann. Dadurch verringert sich ebenfalls der notwendige Aufwand für die Aufarbeitung der Produkte. Isolierte Enzyme können innerhalb der Reaktion hohen Konzentrationen an organischen Substraten oder Lösungsmitteln ausgesetzt sein, dies kann sich negativ auf die Stabilität der Enzyme auswirken (Liese *et al.*, 1998; Schmid *et al.*, 2001; Villela *et al.*, 2003).

Durch die Abhängigkeit der beschriebenen Oxidoreduktasen von teuren Cofaktoren wie  $\beta$ -1,4-Nicotinamidadeninucleotid (NADH) oder  $\beta$ -1,4-Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADPH), welche in Abbildung 1.5 abgebildet sind, müssen diese bei Reaktionen mit isolierten Enzymen stets zugesetzt werden.

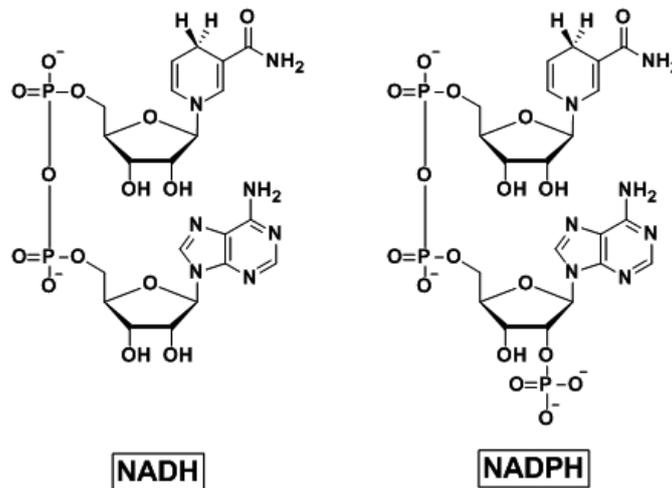


Abbildung 1.5: Nicotinamid-Cofaktoren NADH (links) und NADPH (rechts)

### 1.2.1 Cofaktorabhängigkeit von Oxidoreduktasen

Neben der Abhängigkeit der *LbADH* von Metallionen oder dem in der ER assoziierten FMN als Cofaktor benötigen die enzymatisch katalysierten Reduktionen vor allem Reduktionsäquivalente. Diese werden der Reaktion biokompatibel in Form von NAD(P)H zur Verfügung gestellt. Dabei ist die *LbADH* in der Lage beide Cofaktoren zu akzeptieren, wobei der  $K_M$ -Wert für NADH um einen Faktor von ca. 1000 größer ist als für NADPH (Schroer *et al.*, 2009). Bei der *LbADH* katalysierten Reaktion wird während der Reaktion das Hydridion vom Cofaktor direkt auf den Carbonylkohlenstoff übertragen, wie in Abbildung 1.6 dargestellt.

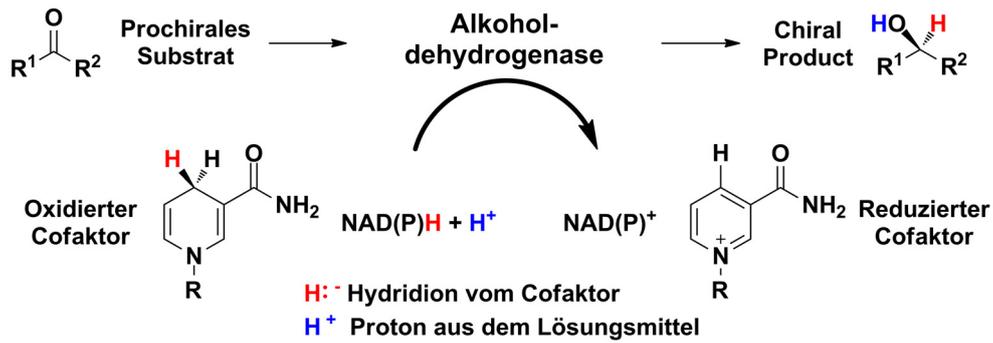


Abbildung 1.6: Übertragung des Hydridions vom Cofaktor auf das Substrat bei ADH's

Hingegen erfolgt bei der ER-katalysierten Reaktion die Übertragung des Hydridions, ausgehend vom reduzierten Cofaktor auf das FMN. Erst der reduzierte FMN-Enzymkomplex überträgt, wie in Abbildung 1.7 dargestellt, das Hydridion auf den entsprechenden Akzeptor. Wobei die ER in der Literatur als NADP(H) abhängiges Enzym beschrieben wird (Brown *et al.*, 1998, 2002; Fox und Karplus, 1994; Saito *et al.*, 1991).

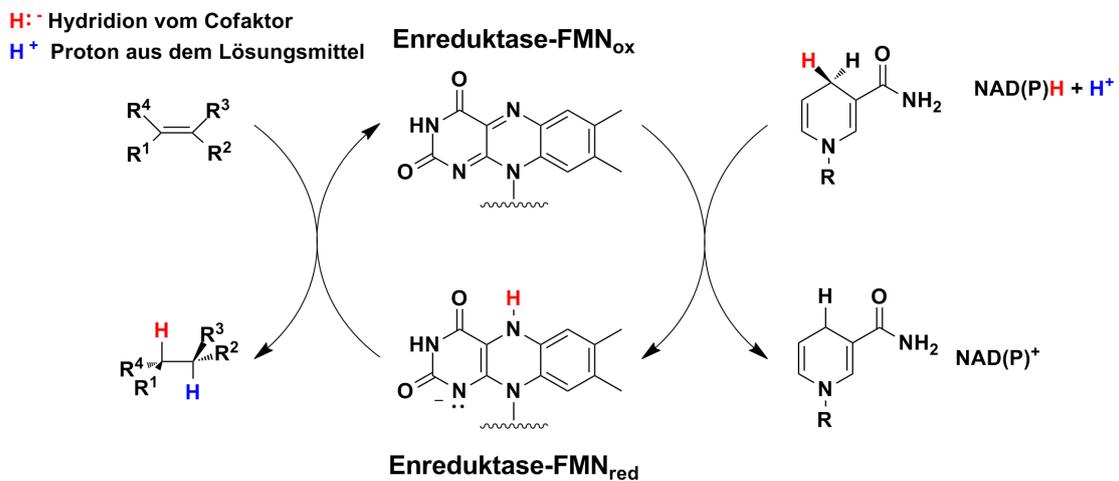


Abbildung 1.7: Übertragung des Hydridions vom Cofaktor auf das FMN und folgend auf den entsprechenden Akzeptor

Dabei ist der Verbrauch an reduziertem Cofaktor bei beiden Enzymen stöchiometrisch, so dass für jedes reduzierte Produktmolekül die Oxidation eines Cofaktormoleküls erfolgen muss.

### 1.2.2 Methoden der Cofaktorregenerierung

Wie gezeigt, erfolgt der Verbrauch an reduziertem Cofaktor während der Reduktionsreaktion in stöchiometrischen Mengen. Dies bedeutet, dass ein äquimolarer Einsatz dieser kostenintensiven Cofaktoren (NADH: 360 €/mmol, NADPH: 2500 €/mmol; Katalogpreise Sigma-Aldrich Co. (Deutschland), Stand Mai 2011) in technischen Bio-transformationen nicht ökonomisch möglich wäre. Somit ist es notwendig, die absoluten Mengen an benötigtem Cofaktoren innerhalb der Reaktion zu reduzieren. Dies gelingt durch unterschiedliche Methoden der Cofaktorregenerierung.

Für die Regenerierung der Cofaktoren wurden unterschiedliche Methoden etabliert. Für isolierte Enzyme kann eine Unterteilung in chemische, elektrochemische, photochemische oder enzymatische Methoden getroffen werden (Chenault und Whitesides, 1987). Ein weiterer Ansatz für die Regenerierung von Cofaktoren besteht in der Verwendung von Ganzzellbiokatalysatoren und der Ausnutzung der Stoffwechsellaktivitäten der Zellen. Hierbei erfolgt die Cofaktorregenerierung durch die Verstoffwechselung von energiereichen Substraten wie beispielsweise Glukose.

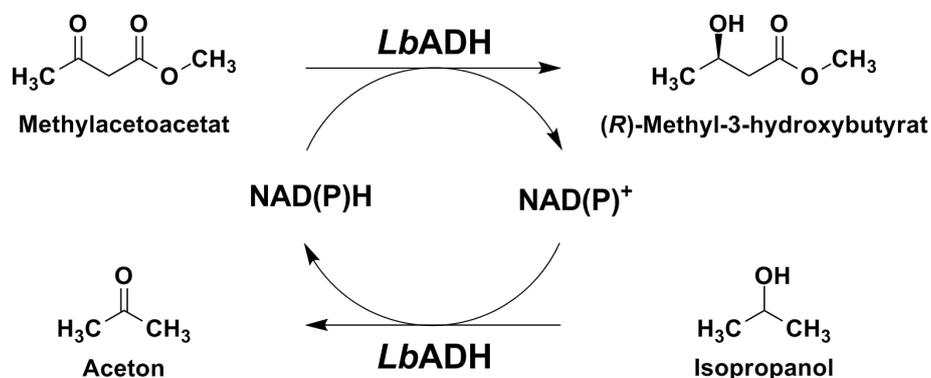
Die chemische Cofaktorregenerierung kann durch Wasserstoff in Verbindung mit einem Rutheniumkomplex erfolgen, der die Reduktion des Cofaktors katalysiert. Die Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid, katalysiert durch einen Rhodiumkomplex, kann ebenfalls für eine chemische Regenerierung der Cofaktoren genutzt werden (Ruppert *et al.*, 1988; Wagenknecht *et al.*, 2003).

Bei der elektrochemischen Cofaktorregenerierung erfolgt die Recycling der Cofaktoren durch die Übertragung von Elektronen von der Elektrode über ein Mediatorsystem auf die oxidierten Cofaktoren (Günther *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 1995).

Die Ausnutzung des Sonnenlichtes kann bei photosynthetisch aktiven Mikroorganismen, wie Cyanobakterien, für die Cofaktorregenerierung ausgenutzt werden. So erfolgt die Cofaktorregenerierung durch die photosynthetische Elektronentransferreaktion (Nakamura und Yamanaka, 2002).

Die Möglichkeit der enzymatischen Cofaktorregenerierung unterteilt sich wiederum in zwei Gruppen. So kann die Regenerierung entweder Substrat-gekoppelt mit nur einem Enzym erfolgen oder Enzym-gekoppelt mit zwei Enzymen (Hummel und Kula, 1989; Schenkels *et al.*, 2001).

Bei einer Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung wird die Produktionsreaktion und die Regenerierung des Cofaktors durch das selbe Enzym katalysiert. Ein Beispiel dafür ist die Umsetzung von Methylacetoacetat zu Methylhydroxybutyrat unter Einsatz von Isopropanol für die Cofaktorregenerierung. Dabei wird das Isopropanol unter Reduktion des Cofaktors zu Aceton oxidiert, wie in Abbildung 1.8 ersichtlich ist (Schroer *et al.*, 2007b).



**Abbildung 1.8:** Umsetzung von Methylacetoacetat zu (R)-Methylhydroxybutyrat als Beispiel für eine LbADH-katalysierte Reaktion mit Substrat-gekoppelter Cofaktorregenerierung

Besteht innerhalb der Reaktion nicht die Möglichkeit, die oxidierten Cofaktoren durch eine entsprechende Reaktion mit dem selben Enzym zu regenerieren, kann dies durch die Verwendung eines zweiten Enzyms erfolgen. Da bei der Enzym-gekopp-

pelten Cofaktorregenerierung ein zweites Enzym eingesetzt wird, müssen bei der Auswahl des Regenerierenzym bestimmte Parameter beachtet werden. So ist es beispielsweise notwendig, dass die Cofaktorpräferenz des Arbeitsenzym auch vom regenerierenden Enzym geteilt wird. Das bedeutet, dass beide Enzyme den gleichen Cofaktor, entweder das phosphorylierte NADP(H) oder das nicht phosphorylierte NAD(H), mit vergleichbarer Affinität akzeptieren müssen. Des Weiteren muss gewährleistet sein, dass beide Enzyme unter den gegebenen Reaktionsbedingungen aktiv sind und es nicht zu Nebenreaktionen kommt, bedingt durch Kreuzreaktionen. Beispiele für mögliche Enzyme, mit denen Produktionsreaktionen gekoppelt werden können, sind in Tabelle 1.2 aufgelistet.

**Tabelle 1.2:** Beispiele möglicher Enzyme für eine Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung mit der entsprechenden Cofaktorpräferenz des Enzyms, den Cosubstraten und den entsprechenden Coprodukten (Weckbecker *et al.*, 2010; Wichmann und Vasic-Racki, 2005)

Regenerierenzym	Cofaktorpräferenz	Cosubstrat	Coprodukt
Formiatdehydrogenase (EC 1.2.1.2)	NAD <sup>+</sup> NADP <sup>+</sup>	Formiat	CO <sub>2</sub>
Glukosedehydrogenase (EC 1.1.1.47)	NADP <sup>+</sup>	D-Glukose	D-Glukono- 1,5-lakton
Glukose-6-phosphat- dehydrogenase (EC 1.1.1.49)	NAD <sup>+</sup> NADP <sup>+</sup>	D-Glukose- 6-phosphat	D-Glukono- 1,5-lakton- 6-phosphat
ADH's (EC 1.1.1.1 u. 1.1.1.2)	NAD <sup>+</sup> NADP <sup>+</sup>	Ethanol Isopropanol	Acetaldehyd Aceton

Eine etablierte Methode für die Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung ist die Verwendung einer Formiatdehydrogenase (Allen und Holbrook, 1995; Gul-Karaguler *et al.*, 2001; Izumi *et al.*, 1989). Bei dieser Reaktion wird Formiat zu Kohlendioxid unter Reduktion des Cofaktors oxidiert. Formiatdehydrogenasen sind in der Lage sowohl

den nicht phosphorylierten Cofaktor (Allen und Holbrook, 1995; Gul-Karaguler *et al.*, 2001; Izumi *et al.*, 1989) als auch den phosphorylierten Cofaktor zu akzeptieren (Lutz *et al.*, 2002; Pasta *et al.*, 1996; Rissom *et al.*, 1997). Das Kohlendioxid, welches während der Reaktion frei wird, kann dabei leicht aus der Reaktion entfernt und so das Gleichgewicht der Reaktion vollständig auf die Seite des Produktes verschoben werden.

Dies kann bei der Reaktion mit Glukosedehydrogenase und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase ebenfalls durch die Hydrolyse der Coprodukte zu den entsprechenden korrespondierenden Säuren erfolgen. Glukosedehydrogenase und Glukose-6-phosphat-dehydrogenase eignen sich dabei sowohl für die Regenerierung von NADH als auch NADPH (Bright *et al.*, 1993; Naylor *et al.*, 2001).

Ebenso können auch ADH's für die Regenerierung beider Cofaktoren eingesetzt werden (Adolph *et al.*, 1991; Drewke und Ciriacy, 1988; Hummel, 1997; Keinan *et al.*, 1986). Die Regenerierung kann mit Hilfe von Alkoholdehydrogenasen durch kostengünstige Cosubstrate wie Ethanol oder Isopropanol erfolgen. Das Gleichgewicht der Reaktion lässt sich hierbei durch einen Überschuss an Cosubstrat oder durch das Entfernen der Coprodukte durch Strippen oder Pervaporation ebenfalls auf die Seite des Produktes verschieben (Goldberg *et al.*, 2006; Lye und Woodley, 1999; Stark, 2003; Takkors, 2004).

Für eine Cofaktorregenerierung innerhalb biokatalytischer Redoxreaktionen stehen somit eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. So können bei einer enzymatischen Regenerierung Cofaktoren durch die Verwendung von kostengünstigen Substraten innerhalb der Reaktion recycelt werden. Der Zusatz von kostenintensiven Cofaktoren bei NAD(P)H-abhängigen Enzymen ist aber bei der Verwendung von isolierten Enzymen trotzdem unumgänglich, da sonst die notwendigen Reduktionsäquivalente für die Redoxreaktionen nicht zur Verfügung gestellt werden können.

Im industriellen Maßstab findet beispielsweise die Enzym-gekoppelte Cofaktorre-generierung eine Anwendung bei der Herstellung von *L-tert*-Leucin im Tonnenmaßstab. Die Umsetzung von Trimethylbrenztraubensäure erfolgt bei diesem Verfahren durch eine Leucindehydrogenase unter NADH-Verbrauch, dabei wird der Cofaktor durch eine Formiatdehydrogenase regeneriert (Bommarius *et al.*, 1995; Drauz *et al.*, 2002). Ein weiteres Beispiel für die industrielle Cofaktorre-generierung ist die Her-stellung von (*S*)-4-Chlor-3-hydroxybutanoatester, einem Intermediat in der Statin-synthese, durch eine Carbonylreduktase aus *Candida magnoliae*. Die Regenerierung des Cofaktors (NADPH) erfolgt Enzym-gekoppelt mit einer Glukosedehydrogenase (Kita *et al.*, 1996; Ogawa und Shimizu, 2002; Wada *et al.*, 1998).

### 1.3 Ganzzellbiotransformationen

Die Verwendung von Ganzzellbiokatalysatoren kann auf zwei unterschiedliche Ar-ten erfolgen. So wird zwischen Prozessen mit wachsenden, metabolisch aktiven Zel-len und ruhenden Zellen unterschieden (Yamada und Shimizu, 1988). Bei wachsen-den Zellen können die Zielprodukte beispielsweise ausgehend von billigen Kohlen-stoffquellen hergestellt werden, wie bei der Ethanolproduktion (Kosaric, 1996) oder der Herstellung von organischen Säuren, wie Essigsäure, Citronensäure oder Pyruvat (Roehr, 1996). Neben den genannten primären Stoffwechselmetaboliten lassen sich aber auch anspruchsvollere Strukturen herstellen, wie Penicillin (O’Sullivan, 1986). Bei der Umsetzung von nicht natürlichen Substraten lassen sich wachsende Zellen auch nutzen, um Cofaktoren wie NAD(P)H durch den Redoxmetabolismus der Mi-kroorganismen zu regenerieren (Blank *et al.*, 2010).

Hingegen ist die Biotransformation mit ruhenden Zellen nicht an das Wachstum der Mikroorganismen gekoppelt. Dadurch ergibt sich bei der Verwendung von re-kombinanten Ganzzellbiokatalysatoren der Vorteil, dass die Herstellung des Bioka-

talysators unabhängig von der Biotransformation optimiert werden kann. Für diese sogenannten „designer bugs“ eignen sich vor allem genetisch sehr gut charakterisierte und mit molekularbiologischen Methoden leicht zugängliche Mikroorganismen, wie *Escherichia coli*. Beispiele für derartige Ganzzellbiokatalysatoren sind in Tabelle 1.3 aufgeführt.

**Tabelle 1.3:** Beispiele für „designer bugs“ mit rekombinantem *Escherichia coli*, den entsprechenden Produkten, den genutzten Enzymen und deren Ursprungsorganismus sowie den für die Reaktion notwendigen Cofaktoren.

Produkt	Enzym	Cofaktor	Ref.
(R)-Methyl-3-hydroxybutyrat	Alkoholdehydrogenase ( <i>L. brevis</i> )	NADPH	Schroer <i>et al.</i> 2007a
Glutathion	$\gamma$ -Glutamylcystein-synthetase ( <i>E. coli</i> )	ATP	Fujio 2001
L-Glyceraldehyd	Glyceroldehydrogenase ( <i>G. oxydans</i> )	NADPH	Richter <i>et al.</i> 2010
(3S)-Acetoin	Butandioldehydrogenase ( <i>B. subtilis</i> )	NAD <sup>+</sup>	Xiao <i>et al.</i> 2010
15 $\beta$ -Hydroxyprogesteron	Cytochrom P450 Monooxygenasen ( <i>B. megaterium</i> )	NAD(P)H	Zehentgruber <i>et al.</i> 2010

Die Nachteile bei der Verwendung von isolierten Enzymen für die Biokatalyse lassen sich durch den Einsatz von rekombinanten Ganzzellsystemen als Biokatalysator zum Teil aufheben. So entfällt zum Beispiel eine aufwendige Aufarbeitung der Biokatalysatoren im Vergleich zu isolierten Enzymen. Durch den Einschluss der Enzyme innerhalb der Zelle liegen diese weiterhin in ihrer natürlichen Umgebung vor und sind so besser geschützt vor äußeren Einflüssen, was sich in der Regel positiv

auf die Stabilität der Enzyme auswirkt (Ishige *et al.*, 2005). Besonders geeignet sind Ganzzellsysteme jedoch bei Cofaktor-abhängigen Enzymen, wie den Oxidoreduktasen. Die notwendige Zugabe von externen Cofaktoren ( $\text{NAD(P)}^+ / \text{NAD(P)H}$ ) kann bei Ganzzellbiokatalysen entfallen, da die bereits intrazellulär vorhandenen Cofaktoren für die Reaktionen genutzt werden können. Somit kann die Wirtschaftlichkeit von biokatalytischen Reaktionen ohne den Zusatz von externen Cofaktoren weiter gesteigert werden. Als Nachteil bei der Verwendung von Ganzzellsystemen ist jedoch die Möglichkeit der Nebenproduktbildung zu sehen, die durch den enzymatischen Hintergrund der Zelle (Enzyme des Stoffwechsels) hervorgerufen werden kann. Ebenso ist bei der Aufarbeitung der Produkte ein zusätzlicher Schritt notwendig, da die Zellen vom Reaktionsmedium abgetrennt werden müssen.

## 1.4 Betrachtung der Cofaktoren bei Biotransformationen mit ruhenden Zellen

Dass die intrazelluläre Cofaktorkonzentration einen direkten Einfluss auf die möglichen Umsätze bei Ganzzellbiotransformation haben, wird beispielsweise bei Zhang *et al.* (2006) deutlich. Es erfolgte hier die Umsetzung von Ethyl-3-keto-4,4,4-trifluorbutanoat zu (*R*)-Ethyl-3-hydroxy-4,4,4-trifluorbutanoat im Satzverfahren durch eine Kettoreduktase-katalysierte Reaktion, wobei die Cofaktorregenerierung mit Hilfe einer Glukose-6-phosphat-dehydrogenase durchgeführt wurde. Bei diesem Beispiel erfolgte die Steigerung der Umsätze parallel zur steigenden Menge an zugesetztem Cofaktor bis auf > 90 %. Dass eine nähere Betrachtung der intrazellulären Cofaktoren notwendig ist, wird auch bei Kataoka *et al.* (1999) deutlich, hier erfolgte die Umsetzung von 4-Chlor-3-oxobutanoat durch eine Aldehydreduktase im Satzverfahren mit Hilfe einer Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierung durch eine Glukosedehydrogenase. Auch bei diesem Beispiel wurde trotz der Verwendung eines rekombinanten Ganzzellbiokatalysators externer Cofaktor zur Reaktion zugesetzt. Bei Kaup (2005)

konnte bei der Herstellung von *D*-Mannitol durch die Zugabe von  $\text{NAD}^+$  eine Steigerung der Produktausbeute um den Faktor 3 festgestellt werden, im Vergleich zur Ganzzellbiotransformation ohne die Zugabe des Cofaktors.

Vor allem aber ist bei kontinuierlichen Prozessen eine nähere Betrachtung der intrazellulären Cofaktoren notwendig. Dies wird bei der kontinuierlichen Umsetzung von Methylacetoacetat zu (*R*)-Methylhydroxybutyrat durch eine ADH-katalysierte Reaktion deutlich. Es konnten hier Prozesszeiten von über einem Monat mit Raumzeitausbeuten von bis zu  $700 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  realisiert werden, jedoch nur unter Zugabe von externem Cofaktor, wobei die Cofaktorregenerierung Substrat-gekoppelt erfolgte (Schroer *et al.*, 2007a). Dadurch wird deutlich, dass es innerhalb dieser kontinuierlichen Biotransformation zu einer Limitierung der Reaktion durch die intrazelluläre Verfügbarkeit der Cofaktoren gekommen ist.

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass bei der Verwendung von Ganzzellbiotransformationen sowohl bei Reaktionen im Satzverfahren als auch bei kontinuierlichen Reaktionen Limitierungen durch die Verfügbarkeit von intrazellulären Cofaktoren auftreten können. Untersuchungen zu den Ursachen dieser Limitierungen fehlen jedoch bisher.

Somit wäre an dieser Stelle eine genauere Analyse der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen von Nöten, um eine Limitation der Reaktion von Seiten des Cofaktors genauer zu beschreiben zu können. Beispiele für die Beschreibung der intrazellulären Cofaktoren bei ruhenden Zellen (*E. coli*) sind durch Heuser *et al.* (2007); Schroer *et al.* (2009) gegeben. Bei Schroer *et al.* (2009) erfolgte die Ermittlung der Cofaktorkonzentrationen innerhalb einer Ganzzellbiotransformation im Satzverfahren und die Ermittlung der Cofaktorstabilität unter dem Einfluss der Substrate und Produkte als auch unter den Zellaufschlussbedingungen für die Analytik der Cofaktoren. Bei Heuser *et al.* (2007) wurde die Erhöhung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen

für eine höhere Produktivität innerhalb der Ganzzellbiotransformation beschrieben, wobei hier die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration um den Faktor 7 erhöht werden konnte.

## 1.5 Cofaktoranalytik

Bei Reaktionen mit isolierten Enzymen sind die Cofaktoren durch photometrische Messungen einfach zu detektieren. So besitzen die oxidierten Cofaktoren (NAD(P)<sup>+</sup>) ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm. Die reduzierten Cofaktoren (NAD(P)H) hingegen besitzen zwei Absorptionsmaxima bei  $\lambda=260$  nm und bei  $\lambda=340$  nm. Aus diesem Grund können bei einer Wellenlänge von 340 nm sehr spezifisch die reduzierten Cofaktoren photometrisch erfasst werden. So kann die Quantifizierung der Cofaktoren innerhalb von biokatalytischen Reaktionen mit isolierten Enzymen aufgrund der geringen Komplexität der Systeme mit einfachen Methoden erfolgen. Dadurch lassen sich die Einflüsse der Reaktionsbedingungen auf die Stabilität und somit die Verfügbarkeit der Cofaktoren für die katalysierten Reaktionen leicht bestimmen. Wie die Verfügbarkeit der Cofaktoren ist auch die Effizienz der Cofaktorregenerierung für biokatalytische Redoxreaktionen entscheidend. Diese kann mit isolierten Enzymen sowohl für die Substrat- als auch die Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung durch photometrische Messungen leicht erfasst werden. So können Limitierungen bezüglich der Verfügbarkeit von Cofaktoren und der Effizienz der Regenerierung bei Reaktionen mit isolierten Enzymen unkompliziert identifiziert werden.

Hingegen sind bei Ganzzellbiotransformationen die Cofaktoren im Zellinneren lokalisiert und können durch photometrische Messungen während der Reaktion nicht erfasst werden. Bei Ganzzellbiotransformationen müssen die Zellen aufgeschlossen werden, um die intrazellulären Cofaktoren analysieren zu können. Neben der Quan-

tifizierung der Cofaktoren und der Ermittlung des Verhältnisses von oxidierten zu reduzierten Cofaktoren muss aufgrund der Cofaktorpräferenz der Enzyme, auch das Verhältnis von phosphoryliertem zu nicht phosphoryliertem Cofaktor bestimmt werden. Dies kann bei Reaktionen mit isolierten Enzymen entfallen, da durch Zugabe des geeigneten Cofaktors der Präferenz des jeweiligen Enzyms entsprochen werden kann.

Methoden für die Quantifizierung von intrazellulären Cofaktoren wurden bereits in den 1970er Jahren entwickelt und optimiert. So kann die intrazelluläre Konzentration der einzelnen Cofaktoren mit zyklischen Assays basierend auf einer farbgebenden Reaktion ermittelt werden (Bernofsky und Swan, 1973; Lilius *et al.*, 1979). Durch den hohen experimentellen Aufwand eignen sich diese jedoch nicht für Messungen bei Ganzzellbiotransformationen mit einem hohen Probenaufkommen. Daher bieten sich automatisierte Messmethoden, wie die Hochdruckflüssigkeitschromatographie an (Mailinger *et al.*, 1998), bei denen die Analyten voneinander getrennt detektiert (UV-Detektor) werden. Vorteilhafter ist jedoch eine Detektion mittels Massenspektrometrie, da hier die Cofaktoren ausgehend von einem komplexen Probengemisch gleichzeitig identifiziert und quantifiziert werden können (Luo *et al.*, 2007; van Dam *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2006). So können Cofaktoren mit Hilfe einer Flüssigkeitschromatographie in Verbindung mit einem Massenspektrometer (LC-MS/MS) als Detektor bis zu einer Konzentration im fmol-Bereich detektiert und quantifiziert werden (Schroer *et al.*, 2009). Für eine Quantifizierung der intrazellulären Cofaktoren mit LC-MS/MS-Methoden ist der Einsatz eines Standards, entweder extern oder intern, unabdingbar. Durch den Einsatz eines externen Standards können jedoch auftretende Matrixeffekte bei der Analyse der Proben nicht korrigiert werden. Mit Matrixeffekt ist dabei der Einfluss des Hintergrunds in den Proben auf die Intensität des Analytensignals gemeint. So kann es bei gleichen Analytkonzentration und einer unterschiedlichen Hintergrundkonzentration, beispielsweise bedingt durch die Probenaufarbeitung, zu unterschiedlichen Intensitäten der Signale bei der Detektion kommen.

Proben mit einem abweichendem Anteil an Hintergrund könnten so nicht miteinander verglichen werden. Dies gelingt jedoch durch die Quantifizierung der Cofaktoren über einen internen Standard (Oldiges *et al.*, 2007). Mittels Massenspektrometrie können für die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen Isotopen-markierte Cofaktoren als interner Standard eingesetzt (Wu *et al.*, 2005) und so sichere Konzentrationsangaben über intrazelluläre Metaboliten auch in Anwesenheit einer komplexen Probenmatrix getroffen werden. Die Quantifizierung erfolgt dann über die Peakflächenverhältnisse zwischen den  $^{13}\text{C}$ -markierten Metaboliten und den in der Probe enthaltenen  $^{12}\text{C}$ -haltigen Metaboliten. Des Weiteren haben Isotopen-markierte Cofaktoren den Vorteil, dass diese bei einer Degradation der Cofaktoren innerhalb der Probe in gleicher Weise betroffen sind. Das Verhältnis von Analyt zu internem Standard ändert sich somit nicht. Dabei müssen die markierten Cofaktoren nicht kommerziell erworben werden. Durch die Kultivierung von Mikroorganismen mit  $^{13}\text{C}_6$ -markierter Glukose und anschließender Extraktion sind vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierte Cofaktoren leicht zugänglich (Wu *et al.*, 2005).

## 2 Zielsetzung

Intrazelluläre Cofaktoren sind ein entscheidender Bestandteil von Oxidoreduktase-katalysierten Reaktionen. Mit Hilfe von Ganzzellbiotransformationen kann eine Zugabe von externen Cofaktoren, wie dies bei Reaktionen mit isolierten Enzymen notwendig ist, umgangen werden. Durch die aufgeführten Beispiele wurde jedoch deutlich, dass hohe Umsätze und lange Reaktionszeiten mit kontinuierlichen Prozessen bei Ganzzellbiotransformationen zum Teil nur durch die Zugabe von externen Cofaktoren, sowohl bei Substrat- als auch bei Enzym-gekoppelter Cofaktorregenerierung, erreicht werden können.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die intrazellulären Nicotinamid-abhängigen Cofaktoren hinsichtlich ihrer Stabilität und Verfügbarkeit bei Ganzzellbiotransformationen anhand von zwei Beispielreaktionen zu charakterisieren. Der Einfluss der intrazellulären Cofaktoren auf die Gesamtsysteme sollte dabei anhand einer Substrat-gekoppelten und einer Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierung näher beschrieben werden und mögliche Limitierungen durch die intrazellulären Cofaktoren identifiziert werden.

Der Einfluss der intrazellulären Cofaktoren sollte zunächst an einem bereits reaktionstechnisch bekannten System mit einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (ADH/ADH-System) und einer Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung erfolgen. Die Reaktionen sollten mit rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen durchgeführt werden. Als Testreaktion für die Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung

wurde die Synthese von (*R*)-Methylhydroxybutyrat unter Regenerierung des Cofaktors mit Isopropanol gewählt, weil hier aus Vorarbeiten bereits ein breiter Datensatz verfügbar war. Die Reaktionen sollte sowohl im kontinuierlichen Modus als auch im Satzverfahren durchgeführt werden, um so eventuelle Unterschiede im Cofaktorpool hinsichtlich der Reaktionsführung zu erkennen und zusätzlich die geeignetste Reaktionsführung unter Betrachtung der Cofaktorverfügbarkeit für diese Reaktion zu identifizieren.

Darüber hinaus sollte die Charakterisierung der intrazellulären Cofaktoren für ein System erfolgen, bei dem Cofaktorregenerierung Enzym-gekoppelt durchgeführt wird. Als Beispiel wurde hier eine durch eine Enreduktase aus *Saccharomyces carlsbergensis* katalysierte Reaktion gewählt, welche zunächst als Ganzzellsystem etabliert werden musste. Auch hier sollte die Cofaktorregenerierung aus Gründen der Vergleichbarkeit mit dem ersten System und aufgrund der guten Charakterisierung dieses Systems mit der *LbADH* als Regenerierungsenzym und Isopropanol als Cosubstrat durchgeführt werden. Ein entsprechendes System musste zunächst aufgebaut werden. Dazu sollte das für die Enreduktase kodierende Gen kloniert und exprimiert werden, das Enzym gereinigt, hinsichtlich aller wichtigen Parameter (Stabilität, Kinetik) charakterisiert werden und basierend auf diesen Parametern die Biotransformation eines Substrates, dass eindeutig nur von der Enreduktase und nicht von der *LbADH* umgesetzt wird, untersucht werden. Als geeignetes Substrat wurde hier (*Z*)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat gewählt, dessen Synthese und Analytik im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls erst etabliert werden musste. Geeignete Reaktionsparameter für beide Enzyme sollten zunächst *in vitro* und später im Ganzzellsystem untersucht werden. Dazu musste ein entsprechender Ganzzellbiokatalysator hergestellt werden, bei dem beide Enzyme plastidär auf einem Vektor kodiert vorliegen. Abschließend sollte dieser Ganzzellbiokatalysator im Satz- und im kontinuierlichen Reaktor eingesetzt werden und die Reaktion als Funktion der Stabilität der intrazellulären Cofaktoren untersucht werden.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Cofaktoranalytik

#### 3.1.1 Quantifizierung intrazellulärer Cofaktoren

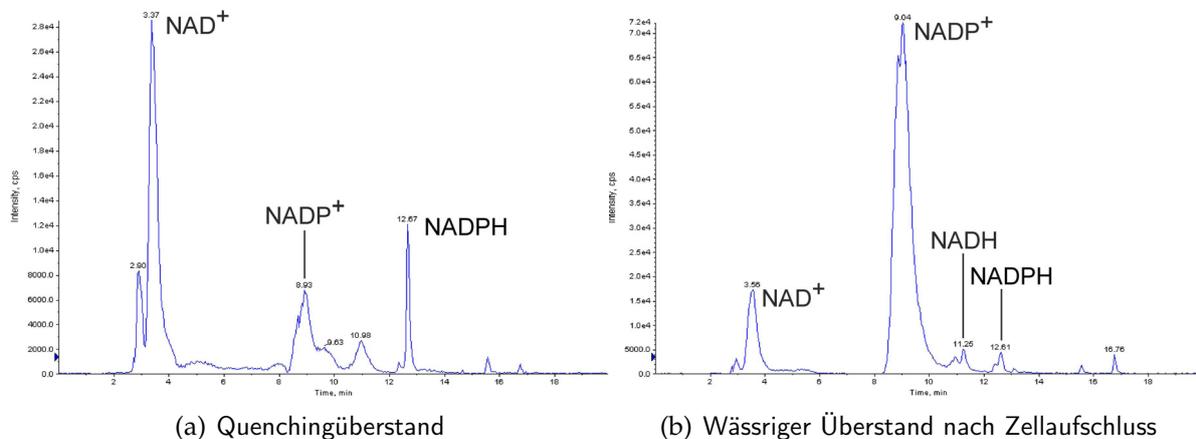
Die Analytik der Cofaktoren wurde in dieser Arbeit mit einer LC-MS/MS Methode durchgeführt, die innerhalb der Arbeitsgruppe Bioprozesse und Bioanalytik des IBG-1: Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH für die Analyse von Metaboliten des Zentralstoffwechsels optimiert wurde. Mit dieser Methode war es möglich, die reduzierten und oxidierten Formen von NAD(H) und NADP(H) aus einem Zellextrakt selektiv zu identifizieren und zu quantifizieren. Für die genaue Identifikation der vier Cofaktoren (NAD(H) und NADP(H)) und für die Verifikation der Retentionszeiten wurden diese, ausgehend von Reinsubstanzen, separat analysiert. Mit dieser Methode konnten die einzelnen Cofaktoren voneinander getrennt detektiert werden, was in den Retentionszeiten der Cofaktoren (Tabelle 3.1) deutlich wird.

**Tabelle 3.1:** Retentionszeiten der einzelnen Cofaktoren bei der Analytik mittels LC-MS/MS;  
Die Probenkonzentration betrug 2,5  $\mu\text{M}$  in TE-Puffer/Methanol (1:1 v/v) pH 7,0. Die Trennung auf der LC erfolgte mit einem TBA-Puffer-Methanol-Gradienten, der in Kapitel 6.12.6.3, Tabelle 6.20 angegeben ist, die Detektion wurde mittels MS/MS durchgeführt.

<b>Cofaktor</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>
NAD <sup>+</sup>	3,6
NADP <sup>+</sup>	9,0
NADH	11,3
NADPH	12,6

Die Quantifizierung der Cofaktoren erfolgte über „*Isotope dilution*“ (Wu *et al.*, 2005), wobei vollständig <sup>13</sup>C-markierte Cofaktoren als interner Standard den Proben zugesetzt wurden. Nach der Analyse erfolgte die Quantifizierung über die Peakflächenverhältnisse zwischen den unmarkierten und den markierten Cofaktoren. Gegenüber der Kalibrierung mit <sup>12</sup>C-Standards können die <sup>13</sup>C-Standards innerhalb der Proben separat detektiert werden. So konnten Matrixeffekte, bedingt durch die in den Proben verbleibenden Zellreste, aufgehoben werden. Dadurch war es möglich die Kalibrierung mit reinen Cofaktoren durchzuführen. Eine nähere Bestimmung des Einflusses der Probenmatrix innerhalb der zu analysierenden Proben musste daher nicht durchgeführt werden. Der Matrixeffekt äußerte sich innerhalb der Analytik durch unterschiedliche Peakflächen bei gleicher Analytkonzentration in Abhängigkeit vom Hintergrund der Probe. Die <sup>13</sup>C-markierten Cofaktoren wurden in gleichbleibender Konzentration den einzelnen Proben zugesetzt. Die Peakflächen für <sup>13</sup>C-NAD<sup>+</sup> im Quenchingüberstand und der wässrigen Phase nach der Zellextraktion hatten dagegen ein Verhältnis von ca. 2:1. Damit würde bei einem geringeren Hintergrund die Analytenkonzentration fälschlich zu hoch bestimmt werden. Dieser Effekt wirkt sich jedoch sowohl auf die nicht markierten Cofaktoren als auch auf die als Standard verwendeten <sup>13</sup>C-markierten Cofaktoren aus, so dass der Einfluss des Probenmatrix aufgehoben wurde.

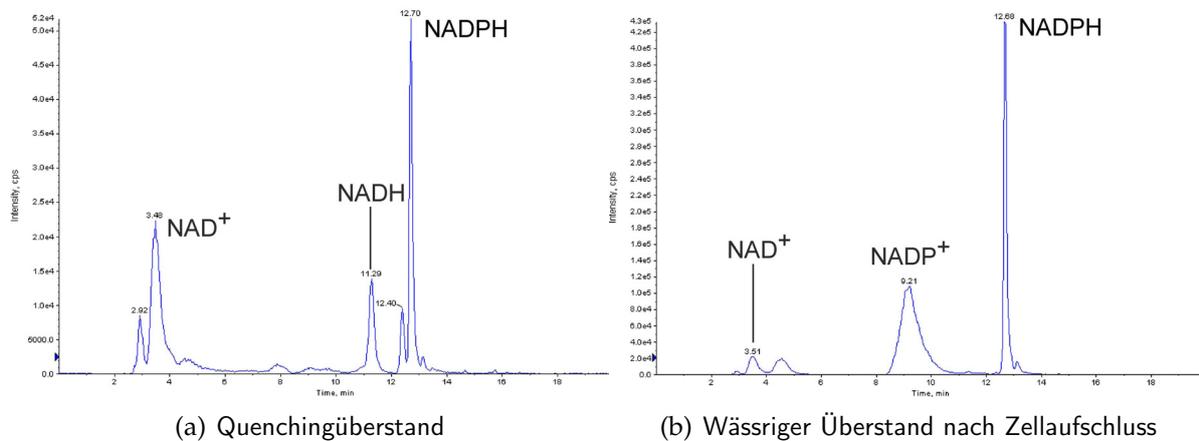
Die markierten Cofaktoren lassen sich durch die Kultivierung von *E. coli* mit  $^{13}\text{C}_6$ -Glukose gewinnen. Dabei erfolgte die Kultivierung mit einem definierten Minimal-Medium, um einen möglichen Eintrag von  $^{12}\text{C}$ -Atomen aus anderen Quellen, wie beispielsweise Hefeextrakt oder Pepton, zu unterbinden. In Vorversuchen wurde jedoch festgestellt, dass die intrazellulären Konzentrationen an reduzierten Cofaktoren (NAD(P)H) vergleichsweise gering waren, was anhand der Chromatogramme in Abbildung 3.1 noch einmal verdeutlicht wird. Da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit noch kein geeigneter Standard für die Kalibrierung zur Verfügung stand, wurden die genauen Cofaktorkonzentrationen innerhalb dieses Versuches nicht bestimmt.



**Abbildung 3.1:** Cofaktorverteilung ohne artifizielle Veränderung der Cofaktorpools im Quenchingüberstand (a) und in der wässrigen Phase nach Aufschluss des Zellpellets (b); Kultivierung in Minimal-Medium mit  $25 \text{ g}^{12}\text{C}_6\text{-Glukose/L}_{\text{Medium}}$  bei  $37^\circ\text{C}$  über 10 h, Zellernte durch Zentrifugation, Resuspendieren der Zellen in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0, Abstoppen der intrazellulären Enzymaktivitäten durch Quenching in  $-50^\circ\text{C}$  kaltem Methanol (60 % v/v) und Zellaufschluss bei  $-20^\circ\text{C}$ , Analyse des Quenchingüberstandes und der wässrigen Phase nach Zellaufschluss mittels LC-MS/MS.

Da bei sehr geringen Konzentrationen an internem Standard keine zuverlässige Quantifizierung erfolgen kann, wurden die Konzentrationen der reduzierten Cofaktoren artifiziell durch spiken erhöht. Nach der Kultivierung eines rekombinanten *E. coli*, der die *LbADH* überexprimierte, wurden die Zellen nach der Ernte in Phosphatpuffer resuspendiert und nach Zugabe von Isopropanol für die partielle Reduktion von oxidierten Cofaktoren eingesetzt. Dadurch konnten die Konzentrationen

an reduzierten Cofaktoren innerhalb der  $^{13}\text{C}$ -Markierung der Cofaktoren angehoben werden, was in den Chromatogrammen des Quenchingüberstandes und der wässrigen Phase nach dem Zellaufschluss (Abbildung 3.2) im Vergleich zu nicht weiter behandelten Zellen (Abbildung 3.1) noch einmal verdeutlicht wird. Somit konnte einer zu geringen Konzentration an internem Standard in Bezug auf die reduzierten Cofaktoren und einer daraus folgenden unzuverlässigen Quantifizierung dieser Cofaktoren vorgebeugt werden.



**Abbildung 3.2:** Cofaktorverteilung mit artifizierter Veränderung der Cofaktorpools nach der Kultivierung mit  $^{13}\text{C}_6$ -Glukose im Quenchingüberstand (a) und in der wässrigen Phase nach Aufschluss des Zellpellets (b);

Kultivierung in Minimal-Medium mit  $25 \text{ g } ^{13}\text{C}_6\text{-Glukose/L}_{\text{Medium}}$  bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $\text{pH } 7,0$  über  $10 \text{ h}$ , Induktion der *LbADH*-Expression mit  $0,2 \text{ mM IPTG}$ , Zellernte durch Zentrifugation, Resuspendieren der Zellen in  $50 \text{ mM}$  Phosphatpuffer  $\text{pH } 7$ , partielle Reduktion von oxidierten Cofaktoren mit  $150 \text{ mM}$  Isopropanol über  $5 \text{ min}$ , Abstoppen der intrazellulären Enzymaktivitäten durch Quenching in  $-50 \text{ }^\circ\text{C}$  kaltem Methanol ( $60 \text{ } \%$  v/v) und Zellaufschluss bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , Analyse des Quenchingüberstandes und der wässrigen Phase nach Zellaufschluss mittels LC-MS/MS.

In den Abbildungen 3.1 und 3.2 sind jeweils zwei Chromatogramme dargestellt, die für die Analyse einer Probe notwendig sind. Die zusätzliche Analyse des Quenchingüberstands ist notwendig, da es beim Abstoppen der intrazellulären Enzymaktivität mit Hilfe von  $-50 \text{ }^\circ\text{C}$  kaltem  $60 \text{ } \%$ igem Methanol bereits zu einer Permeabilisierung der Zellmembranen und zu einem Austreten der Cofaktoren in diesem Schritt der Probenaufarbeitung kommt. Für eine vollständige Erfassung der intrazellulären Co-

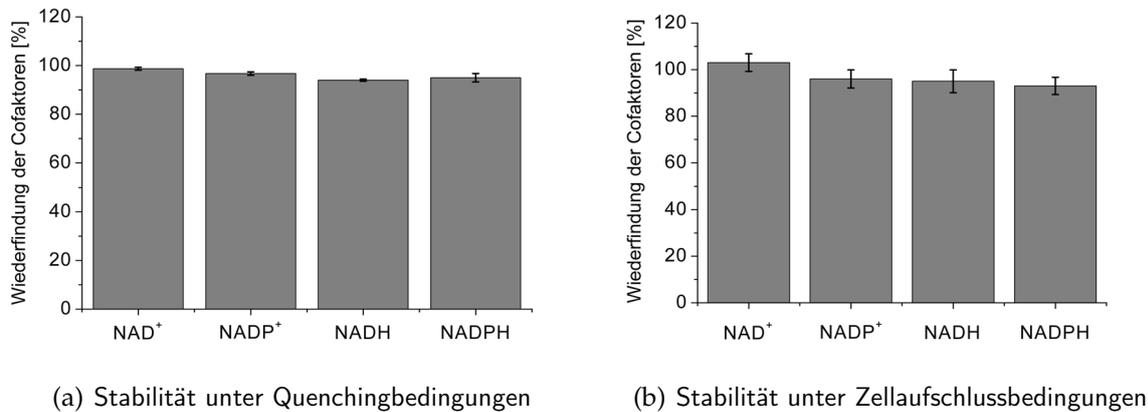
faktoren wäre somit die Analyse der wässrigen Phase nach dem Zellaufschluss nicht ausreichend.

### 3.2 Cofaktorstabilität während der Probenaufarbeitung und der Messung

Ausgehend von ruhenden, katalytisch aktiven Zellen aus zu untersuchenden Biotransformationen muss direkt nach der Probennahme die intrazelluläre Enzymaktivität unterbunden werden, um Folgereaktionen zu vermeiden und den intrazellulären Zustand zum Zeitpunkt der Probennahme zu erfassen. Das Abstoppen der Enzymaktivität erfolgte dabei durch das Einbringen der Probe in  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltes Methanol (Quenching). Im Weiteren wurde der Zellaufschluss in Anwesenheit von Chloroform durchgeführt. Um den Einfluss der Aufschlussbedingungen auf die Stabilität der Cofaktoren zu ermitteln, wurden die vier Cofaktoren den Bedingungen der Probenaufarbeitung ausgesetzt.

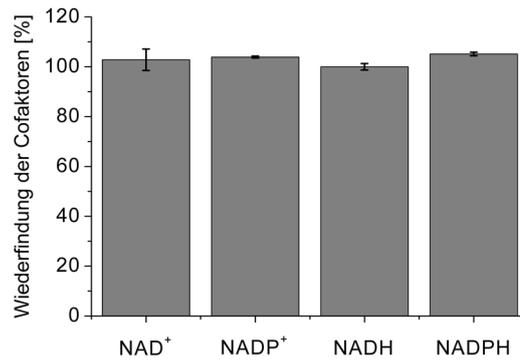
In Abbildung 3.3 sind die Stabilitäten der einzelnen Cofaktoren innerhalb der Quenchingprozedur und unter den Bedingungen des Zellaufschlusses dargestellt. Es konnte bei allen Cofaktoren während der Quenchingprozedur und unter den Bedingungen des Zellaufschlusses eine  $> 90\%$ ige Wiederfindung der Cofaktoren festgestellt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Cofaktoren während der Probenaufarbeitung ausreichend stabil blieben und eine Degradation nicht nachweisbar war. Die von Schroer *et al.* (2009) gefundenen Degradierungseffekte innerhalb der Probenaufarbeitung konnten so nicht bestätigt werden. Es wurden hier ebenso die Stabilitäten unter den Bedingungen der Probenaufarbeitung über einen Zeitraum von 2 h ermittelt, jedoch erfolgten die Messungen bei Schroer *et al.* (2009) bei einer höheren Temperatur von  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dabei ergaben sich Wiederfindungen von  $64\%$  für  $\text{NAD}^+$ ,  $75\%$  für  $\text{NADP}^+$ ,  $44\%$  für  $\text{NADH}$  und  $71\%$  für  $\text{NADPH}$ . Der einzige Unterschied lag dabei

in der verwendeten Temperatur während der Stabilitätsmessungen. Die Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass der Einfluss der Temperatur entscheidend für die Cofaktorstabilität während der Probenaufarbeitung ist.



**Abbildung 3.3:** Stabilitäten der Cofaktoren unter Quenchingbedingungen (a) und unter Zellaufschlussbedingungen (b);  
 (a) Inkubation der Cofaktoren 2  $\mu$ M in 10 mL 60 %igem Methanol bei -20 °C über 2 h (Quenchingbedingungen), (b) Inkubation der Cofaktoren 2  $\mu$ M in 2 mL TE-Puffer/Methanol (1:1 v/v) und 2 mL Chloroform über 2 h bei -20 °C (Zellaufschlussbedingungen), Analyse der Cofaktoren nach Inkubation mittel LC-MS/MS, die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.

Da es bei der Vermessung der Proben zu längeren Standzeiten im Autosampler kommt, wurde die Stabilität der Cofaktoren ebenfalls während dieser Zeit über einen Zeitraum von 48 h ermittelt. In Abbildung 3.4 sind die Wiederfindungen der Cofaktoren dargestellt. Wie dort zu erkennen ist, konnten während der Standzeiten im Autosampler Wiederfindungen von > 95 % ermittelt werden. Demnach kommt es auch während längerer Messzeiten nicht zu einer Degradation der Cofaktoren. Damit konnten Messungen mit einem großen Probenumfang ohne zusätzliche Zwischenlagerung der Proben bei tieferen Temperaturen erfolgen.



**Abbildung 3.4:** Cofaktorstabilitäten während der Standzeiten im Autosampler bei 4 °C; Inkubation der Cofaktoren in TE-Puffer/Methanol (1:1 v/v) bei 4 °C im Autosampler der LC-MS/MS, Vermessung der Proben über einen Zeitraum von 48 h, die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.

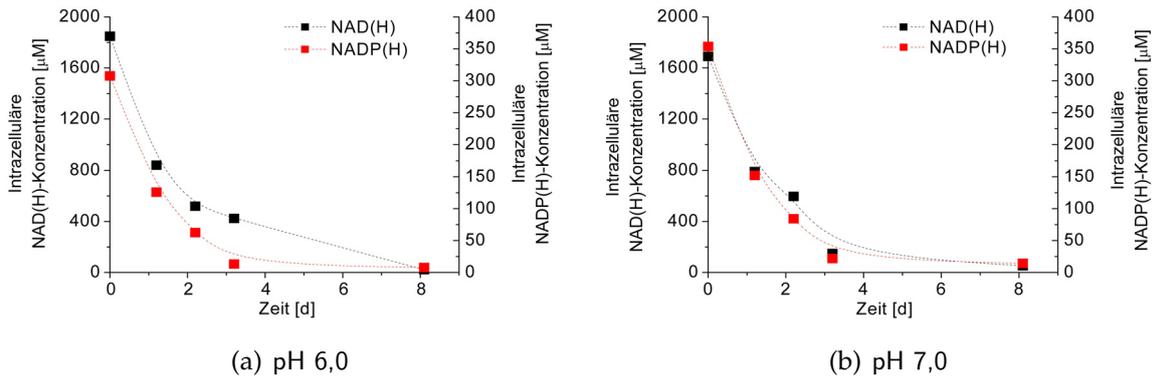
### 3.2.1 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit einer Messzeit von 25 min die verwendete Methode geeignet war, um ein hohes Probenaufkommen vermessen zu können. Weiterhin konnte mit der Erhöhung der reduzierten Cofaktoren während der <sup>13</sup>C-Markierung ein geeigneter Standard erstellt werden, um eine Quantifizierung über „*Isotop dilution*“ nach Wu *et al.* (2005) durchzuführen. Dabei eventuell auftretende Matrixeffekte innerhalb der Analysen, bedingt durch eine sehr komplexe Probenzusammensetzung, konnten mit Hilfe dieser Methode aufgehoben werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Cofaktoren unter den verwendeten Bedingungen der Probenaufarbeitung und der Standzeiten der Proben im Autosampler der LC-MS/MS stabil blieben. Negative Einflüsse auf die Cofaktoren durch die Bedingungen der Probenaufarbeitung und während der Analytik können somit ausgeschlossen werden.

### 3.3 Intrazelluläre Cofaktorstabilitäten im *Escherichia coli*-Wirtsstamm

Um die Stabilitäten der intrazellulären Cofaktoren ohne den Einfluss von Substraten und der Überexpression von intrazellulären Proteinen zu ermitteln, wurden *E. coli* B21\* (DE3)-Zellen, im 5 L Maßstab im Bioreaktor mit TB-Medium kultiviert und bei 30 °C sowie 4 °C in 50 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6 und 7 inkubiert. Die Versuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination der Zellsuspension und ein Wachstum anderer Mikroorganismen zu verhindern.

Innerhalb des Inkubationszeitraums (8 Tage) war bei einer Temperatur von 30 °C und einem pH-Wert von 6 als auch 7 eine fast vollständige Abnahme der intrazellulären Cofaktoren festzustellen. Daraus ergab sich für die Cofaktoren eine Halbwertszeit von ungefähr einem Tag, was in Abbildung 3.5 noch einmal graphisch verdeutlicht wird. Dabei konnte zum Zeitpunkt  $t_0$  ein Cofaktorverhältnis von NAD(H)/NADP(H) von 6:1 ermittelt werden, welches durch Angaben in der Literatur bestätigt werden kann (Andersen und Meyenburg, 1977; Lee *et al.*, 2010; Siedler, 2011). Eine mögliche Ursache für den starken Abfall der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen während der Inkubation der Zellsuspension bei einer Temperatur von 30 °C ist der intrazelluläre Erhaltungsstoffwechsel der Zellen. Dieser ist für Prozesse wie die Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten, Reparatur von geschädigter DNA oder falsch gefalteten Enzymen verantwortlich (Chmiel, 2006).



**Abbildung 3.5:** Entwicklung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen von *E. coli* BL21\* (DE3) Wirtszellen ohne den Einfluss von Substraten und Produkten bei pH 6 (a) und pH 7 (b) bei 30 °C; Kultivierung mit TB-Medium über 24 h im Bioreaktor (5 L), Zellernte und Resuspendieren der Zellen unter sterilen Bedingungen, Resuspendieren der Zellen in 50 mM Phosphatpuffer mit pH 6 (a) und 7 (b) und Einstellen einer Biomassekonzentration von 100 g<sub>BFM</sub>/L, Inkubation der Zellsuspensionen bei 30 °C, Probenahme unter sterilen Bedingungen und Analyse der Cofaktoren nach Probenaufarbeitung mittels LC-MS/MS, die gestrichelten Linien dienen der Orientierung und geben nicht die Messwerte zu den einzelnen Zeitpunkten wieder.

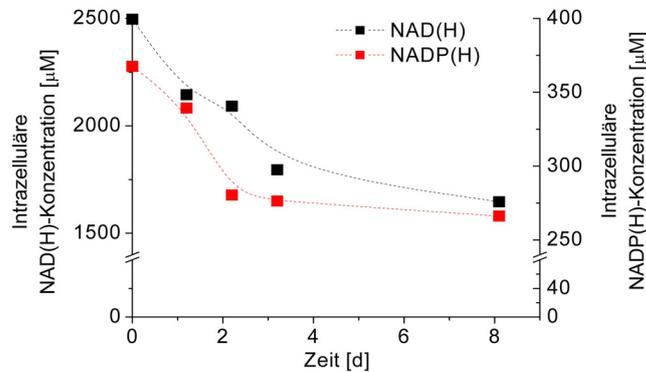
Der Erhaltungsstoffwechsel ist auch bei ruhenden Zellen nicht vollständig unterbunden, so dass die Zellen zwar nicht weiter wachsen, jedoch einen gewissen Grundumsatz an energiereichen Verbindungen haben. Da keine weiteren energiereichen Substanzen zum Puffer zugesetzt wurden, müssen die Zellen in diesem Fall auf intrazelluläre Verbindungen zurückgreifen, aus denen sie Energie gewinnen können. So sind auch die Cofaktoren in der Lage durch Hydrolyse Energie zu liefern. Cofaktoren enthalten für die Energiegewinnung energiereiche Bindungen wie *N*-glykosidische Bindungen (Zatman *et al.*, 1953) oder eine Diphosphatbindung, deren Bindungsenergie ist gleich der analogen Bindung in ATP (Kornberg, 1950). Diese energiereichen Bindungen sind somit auch die Stellen, an denen die Cofaktormoleküle degradieren können (Ferro und Olivera, 1987), wobei eine nähere Bestimmung der möglichen Degradationsprodukte nicht erfolgte. Die Halbwertszeit von NAD<sup>+</sup> wird bei exponentiell wachsenden *E. coli* mit 1-2 h angegeben (Manlapaz und Olivera, 1973). Diese Halbwertszeit ist ein Indiz dafür, dass die Cofaktorkonzentrationen innerhalb der Zellen durch die Enzymaktivitäten des Zellstoffwechsels stark beeinflusst wer-

den. Die Redox-Eigenschaften der Cofaktoren werden jedoch bei einigen Enzymkatalysierten Reaktionen, wie bei der posttranslationalen Modifikation von Proteinen durch ADP-Ribosylierung (Hilz, 1997) oder bei der Reparatur von geschädigter DNA durch DNA-Ligase (Foster und Moat, 1980; Singleton *et al.*, 1999) nicht ausgenutzt. Finden solche Reaktionen statt, werden die Cofaktoren intrazellulär abgebaut.

Eine zweite Erklärung für die Abnahme der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen wäre eine partielle Zelllyse, wobei die Cofaktoren in den Überstand der Zellsuspension austreten würden. Dies wäre durch eine Erhöhung der extrazellulären Cofaktoren feststellbar. Im Verlauf dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass im extrazellulären Überstand zwar Cofaktoren detektiert werden konnten, deren Konzentration über den Zeitraum der Versuche aber nicht in dem Maße zunahm, in dem die intrazelluläre Konzentration abgenommen hat. Dadurch kann die Zelllyse für die Abnahme der intrazellulären Cofaktoren als alleinige Ursache ausgeschlossen werden.

Im Vergleich dazu erfolgte die Inkubation der Zellen unter analogen Bedingungen auch bei 4 °C. Auch hier konnte eine Abnahme der intrazellulären Cofaktoren festgestellt werden, die im Vergleich zur Inkubation bei 30 °C nicht so stark ausfiel, wie in Abbildung 3.6 exemplarisch für die Inkubation bei pH 6 dargestellt ist. So konnte eine Abnahme der intrazellulären Cofaktorkonzentration von 10 % nach einem Tag für die nicht-phosphorylierten Cofaktoren NAD(H) und eine Abnahme von 20 % für die phosphorylierten Cofaktoren NADP(H) ermittelt werden. Über den gesamten Zeitraum der Inkubation (8 Tage) kam es dabei zu einer Abnahme der Cofaktoren von 50 % für NAD(H) und 60 % für NADP(H). Dieser Unterschied lässt sich dabei durch den positiven Einfluss der niedrigeren Temperatur während der Lagerung der Zellen bei 4 °C auf die Stabilität der Cofaktoren erklären. Durch die verminderte Temperatur wird die Enzymaktivität und somit auch der Erhaltungsstoffwechsel herabgesetzt, wodurch die Abnahme der Cofaktoren im Vergleich zu den Ergebnissen bei einer In-

kubation bei 30 °C langsamer erfolgte.



**Abbildung 3.6:** Entwicklung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen von *E. coli* BL21\* (DE3) Wirtszellen ohne den Einfluss von Substraten und Produkten bei pH 6 und 4 °C; Kultivierung mit TB-Medium über 24 h im Bioreaktor (5 L), Zellernte und Resuspendieren der Zellen unter sterilen Bedingungen, Resuspendieren der Zellen in 50 mM Phosphatpuffer mit pH 6 und Einstellen einer Biomassekonzentration von 100 g<sub>BFM</sub>/L, Inkubation der Zellsuspensionen bei 4 °C, Probenahme unter sterilen Bedingungen und Analyse der Cofaktoren nach Probenaufarbeitung mittels LC-MS/MS, die gestrichelten Linien dienen der Orientierung und geben nicht die Messwerte zu den einzelnen Zeitpunkten wieder.

### 3.3.1 Zusammenfassung

Bei *E. coli* BL21\* (DE3) Zellen ohne intrazelluläre Überexpression eines heterologen Proteins wurde eine Halbwertszeit von ca. einem Tag bei 30 °C und einem pH-Wert von 6 oder 7 ermittelt. Die Abnahme der Cofaktorkonzentration konnte durch die Absenkung der Inkubationstemperatur auf 4 °C nicht verhindert, jedoch verlangsamt werden. Wobei das Einfrieren der Zellen keine Alternative darstellt, da es ohne den Zusatz von Frostschutzmitteln wie z. B. Glycerin zu einer Permeabilisierung der Zellen durch Eiskristalle kommen würde und die Zellen nach dem Auftauen so noch schneller lysieren würden. Aus diesem Grund und da trotz Kühlung schon nach 2 Tagen mehr als 1/4 der intrazellulären Cofaktorkonzentration verloren ging, wurden die weiteren Versuche jeweils mit frisch hergestellter Biomasse durchgeführt.

## 3.4 Ganzzellbiotransformationen mit Substrat-gekoppelter Cofaktorregenerierung

### 3.4.1 Ganzzellbiotransformation mit dem ADH/ADH-System

Mit Hilfe der reaktionstechnischen Optimierung der Umsetzung von Methylacetoacetat zu (*R*)-Methylhydroxybutyrat konnten Reaktionszeiten von > 30 Tagen und Raumzeitausbeuten von  $700 \text{ g d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  erzielt werden, bei einem Enantiomerenüberschuss von > 99 % *ee* (Schroer *et al.*, 2007a). Gleichzeitig wird jedoch bei Schroer *et al.* (2007a) deutlich, dass es zu einer Limitierung des kontinuierlichen Verfahrens durch die für die Reaktion notwendigen Cofaktoren kam. Dadurch war es notwendig, der Reaktion zusätzliche Cofaktoren zuzuführen. Aufgrund der sehr guten reaktionstechnischen Charakterisierung und Optimierung dieser Reaktion war eine gezielte Betrachtung der intrazellulären Cofaktoren hinsichtlich ihrer Verfügbarkeit und Stabilität ohne große Vorarbeiten möglich.

### 3.4.2 Kontinuierliche Ganzzellbiotransformation

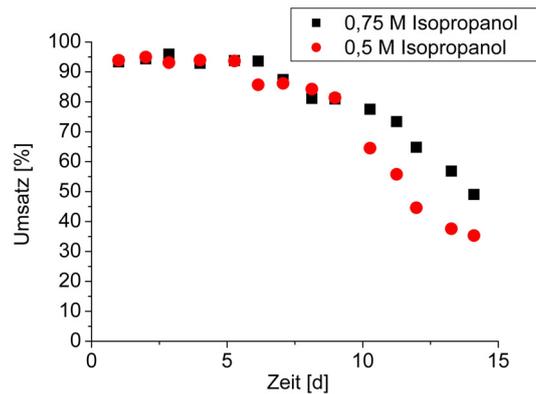
Hinsichtlich der Charakterisierung der intrazellulären Cofaktoren bezüglich ihrer limitierenden Eigenschaften erfolgten die kontinuierlichen Biotransformationen in einem Maßstab von 200 mL. Dabei wurde eine konstante Substratkonzentration von 0,3 M Methylacetoacetat, eine Cosubstratkonzentration von 0,5 M und 0,75 M Isopropanol und eine Verweilzeit von 2 h eingestellt.

Um die intrazellulären Cofaktorkonzentrationen anzugeben, wurde am Ende der Kultivierung das Gesamzellvolumen nach einer 1:250000 Verdünnung vermessen. Danach erfolgte die Berechnung des Zellvolumens bezogen auf die Biotrockenmasse mit den Formeln 01-03 (Kapitel 6.12.1.3). Mit der Verdünnung der Zellsuspension und einer Biotrockenmasse von  $9,4 \text{ mg}_{BTM}/\text{mL}$  ergab sich ein Zellvolumen von

$2,08 \mu\text{L}/\text{mg}_{\text{BTM}} \pm 0,03 \mu\text{L}/\text{mg}_{\text{BTM}}$ , welches für die weitere Berechnung der intrazellulären Cofaktorkonzentration verwendet wurde. Dieses Zellvolumen entsprach den in der Literatur angegebenen Größenordnungen (Bennett *et al.*, 2009; Buchholz *et al.*, 2001; Pramanik und Keasling, 1997).

Um eine Limitierung der Reaktion bedingt durch die intrazelluläre *LbADH*-Konzentration zu vermeiden wurde die intrazelluläre Enzymkonzentration in Anlehnung an Schroer *et al.* (2009) bestimmt. Dabei konnte eine Aktivität von  $400 \text{ U}/\text{g}_{\text{BFM}}$  ermittelt werden, was einer Enzymkonzentration von  $40 \text{ mg}/\text{g}_{\text{BFM}}$  entspricht. Die gefundenen Werte lagen dabei um den Faktor 4 höher als der vergleichbare Wert bei Schroer *et al.* (2009), was sich durch die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen erklären lässt. So erfolgte die Kultivierung der Biomasse mit TB-Medium im Bioreaktor, die Expression der *LbADH* wurde wie bei Schroer *et al.* (2009) zu Beginn der stationären Wachstumsphase mit  $0,2 \text{ mM}$  IPTG induziert und die Expression bei  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Hingegen erfolgte die Kultivierung bei Schroer *et al.* (2009) mit LB-Medium im Schüttelkolben. Durch die Verwendung des Bioreaktors konnten Limitierungen, die beispielsweise durch eine zu geringe Gelöstsauerstoffkonzentration oder durch eine Verschiebung des pH-Wertes innerhalb des Mediums, vermieden werden. Darüber hinaus ist das TB-Medium im Vergleich zum LB-Medium höher konzentriert (Zusammensetzung LB-Medium: Kapitel 6.4.3.1, Tabelle 6.1; Zusammensetzung TB-Medium: Kapitel 6.5 Tabelle 6.9), so dass Substratlimitierungen während der Kultivierung erst zu einem späteren Zeitpunkt auftreten und die Expression des Enzyms über einen längeren Zeitraum unter nicht limitierten Bedingungen ablaufen konnte.

Bei der kontinuierlichen Umsetzung von Methylacetoacetat zu (*R*)-Methylhydroxybutyrat konnte während der Reaktion ein konstanter Umsatz von  $93 \%$  über einen Zeitraum von  $150 \text{ h}$  erreicht werden. Danach kam es zu einem Abfall des Umsatzes auf weniger als  $50 \%$ , wie in Abbildung 3.7 zu erkennen ist.



**Abbildung 3.7:** Umsätze während der kontinuierlichen Biotransformation von Methylacetoacetat mit *E. coli* BL21\* (DE3)-*LbADH*; Umsetzung von MAA mit einer Konzentration von 0,3 M im Zulauf (50 mM Phosphatpuffer pH 6,0) und 0,75 M sowie 0,5 M Isopropanol, 100 g<sub>BFM</sub>/L in 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,0, Verweilzeit im Reaktor 2 h, Reaktionstemperatur von 30 °C, Reaktionsdauer 14 Tage, Analyse des zellfreien Überstandes mittels GC.

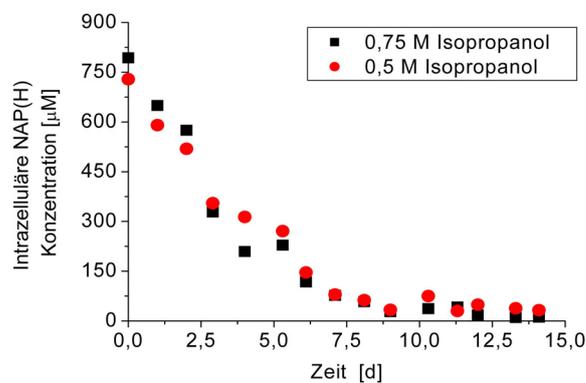
Die erreichte Raum-Zeit-Ausbeute lag während der Phase des konstanten Umsatzes bei 77 g<sub>MHB</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, was in etwa 10 % der in der Literatur erreichten maximalen Raum-Zeit-Ausbeute entspricht (Schroer *et al.*, 2007a). Der Enantiomerenüberschuss betrug bei dieser Reaktion > 99 % *ee*, wie auch bei den weiteren Reaktionen mit dem ADA/ADH-System und bestätigten so das Ergebnis von Schroer *et al.* (2007a). Dabei muss jedoch bedacht werden, dass bei dem in der Literatur beschriebenen Prozess variierende Biomassekonzentrationen (50-270 g<sub>BFM</sub>/L), Substratkonzentrationen (0,1-2,5 M) und Isopropanolkonzentrationen (0,2-2,8 M) sowie Verweilzeiten von 0,5-25 h verwendet wurden. So konnten dort mit höheren Biomassekonzentrationen und Substratkonzentrationen auch höhere Ausbeuten erzielt werden. Der erreichte Umsatz stagnierte jedoch bei einem Wert von 80 %.

Um die Limitierung innerhalb der Reaktion zu ermitteln, wurde nach Beendigung des kontinuierlichen Prozesses eine Batch-Reaktion mit den selben Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit Puffer gespült, bis die Substrate und Produkte vollständig entfernt waren. Anschließend erfolgte unter Zugabe von 0,2 mM NADP<sup>+</sup> eine Batch-Reaktion mit 0,3 M Methylacetoacetat und 0,75 M Isopropanol. Dabei

konnte bereits nach 10 min eine vollständige Umsetzung des Substrats festgestellt werden, was zeigt, dass der Abfall des Umsatzes auf weniger als 50 % bei der kontinuierlichen Reaktion nicht durch den Aktivitätsverlust des Ganzzellbiokatalysators verursacht wurde.

### *Intrazelluläre Cofaktoren innerhalb der kontinuierlichen Reaktion*

Parallel zur Ermittlung des Umsatzes innerhalb des Prozesses erfolgte die Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen, wobei der Verlauf der NADP(H)-Konzentrationen über die Reaktionszeit in Abbildung 3.8 dargestellt ist. Die ausschließliche Darstellung der phosphorylierten Cofaktoren erfolgte auf Grund der Präferenz der *LbADH* gegenüber diesem Cofaktor, was sich in einem um den Faktor 1000 niedrigeren  $K_M$ -Wert im Vergleich zum nicht-phosphorylierten Cofaktor widerspiegelt.



**Abbildung 3.8:** Verlauf der intrazellulären NADP(H)-Konzentrationen während der kontinuierlichen Umsetzung von Methylacetoacetat mit *E. coli* BL21\* (DE3)-*LbADH*; Umsetzung von Methylacetoacetat mit einer Konzentration von 0,3 M im Zulauf (50 mM Phosphatpuffer, pH 6,0) und 0,75 M und 0,5 M Isopropanol, 100  $g_{BFM}/L$  in 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,0, Verweilzeit im Reaktor 2 h, Reaktionstemperatur von 30 °C, Reaktionsdauer 14 Tage, Analyse der intrazellulären Cofaktoren nach Probenaufarbeitung mittels LC-MS/MS.

Die Anfangskonzentrationen für NADP(H) lagen bei 730  $\mu M$  (0,5 M Isopropanol) und 790  $\mu M$  (0,75 M Isopropanol). Über den Verlauf der Reaktion konnte eine ste-

tige Abnahme bis auf 4 % (0,5 M Isopropanol) und 1,5 % (0,75 M Isopropanol) der ursprünglichen intrazellulären NADP(H)-Konzentrationen festgestellt werden. Trotz der kontinuierlichen Abnahme der Cofaktorkonzentration konnte ein konstanter Umsatz über einen Zeitraum von 150 h beobachtet werden. Die zu diesem Zeitpunkt vorliegende Cofaktorkonzentration kann somit als unteres Limit angesehen werden, bei der die Reaktion unbeeinflusst weiterläuft. Dabei lag die verbleibende Cofaktorkonzentration bei einem Wert von 15-20 % der ursprünglichen Konzentration. Die weitere Abnahme der Cofaktoren führte dann zu einer Limitierung der Reaktionen, die durch die Zugabe von externem Cofaktor in der anschließenden Batch-Reaktion wieder aufgehoben werden konnte. Zwischen den beiden Isopropanolkonzentrationen konnte hinsichtlich der Intensität der Konzentrationsabnahme kein Unterschied festgestellt werden.

Mögliche Ursachen für die Abnahme liegen zum einen im bereits diskutierten Erhaltungsstoffwechsel der Mikroorganismen. So konnten diese auch nach Beendigung des kontinuierlichen Prozesses reaktiviert werden. Die Anzahl der Kolonien nach 24 h Inkubation auf LB-Agar mit 100 mg<sub>Carbenicillin</sub>/L betrug 1800 pro mL, im Vergleich zu  $8 \cdot 10^{10}$  zu Beginn der Reaktion. Damit konnte gezeigt werden, dass auch am Ende der Reaktion noch intakte, teilungsfähige Zellen im Reaktionssystem vorlagen, die den Erhaltungsstoffwechsel aufrecht erhalten konnten. Zum andern ist die Permeabilisierung der Zellmembran durch das Vorhandensein der organischen Substrate und Produkte als ein weiterer Grund für die Abnahme der Cofaktorkonzentrationen zu sehen. Durch die Permeabilisierung der Membran können die Cofaktoren aus den Zellen austreten und, bedingt durch die kontinuierliche Betriebsweise, aus dem Gesamtsystem ausgetragen werden. Die im Überstand der Reaktion befindlichen Cofaktoren konnten allerdings aufgrund ihrer geringen Konzentration und des Verdünnungseffekts durch das Reaktionsgemisch nicht detektiert werden. Der Effekt des Austragens der Cofaktoren aus dem Gesamtsystem wurde bei Schroer *et al.* (2007a) zu einem Zeitpunkt, an dem die Limitierung durch den Cofaktor zum Tragen

kam, durch längere Verweilzeiten und durch die Erhöhung der Biomassekonzentration auf  $200 \text{ g}_{BFM}/\text{L}$  aufgehoben. Danach wurde nach 7 Tagen Reaktionszeit keine Abnahme des Umsatzes festgestellt.

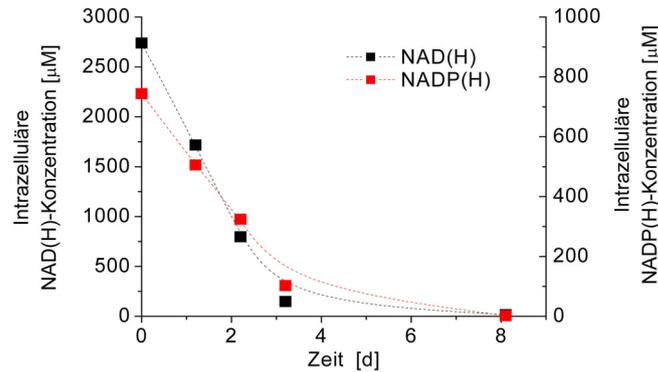
Die erreichten hohen Umsätze noch bei einer Cofaktorkonzentration von 15-20 % der ursprünglichen NADP(H)-Konzentration zu Reaktionsbeginn können dabei auf die Art der Regenerierung zurückgeführt werden. So kann der Cofaktor bei einer Substrat-gekoppelten Regenerierung direkt am Enzym regeneriert werden und muss nicht, wie bei einer Enzym-gekoppelten Regenerierung, zwischen zwei Enzymen diffundieren. Somit kann bei Substrat-gekoppelten Ansätzen auch bei geringen Cofaktorkonzentrationen eine effektive Regenerierung und somit ein hoher Umsatz erzielt werden.

### 3.4.3 Cofaktorstabilität ohne den Einfluss von Substraten und Produkten

Um die Stabilität der intrazellulären Cofaktoren nach der Überexpression eines heterologen Proteins zu ermitteln, erfolgte die Inkubation der Ganzzellbiokatalysatoren ohne den Einfluss der Substrate und Produkte in Phosphatpuffer (50 mM, pH 6) bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

In Abbildung 3.9 ist der prozentuale Verlauf der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen für die phosphorylierten und nicht phosphorylierten Cofaktoren dargestellt, die dabei zum Zeitpunkt  $t_0$  ein Cofaktorverhältnis (NAD(H)/NADP(H)) von 4:1 hatten, was auch durch Angaben in der Literatur bestätigt wird (Andersen und Meyenburg, 1977; Lee *et al.*, 2010; Siedler, 2011).

Es war auch in diesem Versuch eine kontinuierliche Abnahme der intrazellulären Cofaktoren feststellbar, wobei eine etwas höhere Halbwertszeit von ca. 1,5 Tagen für



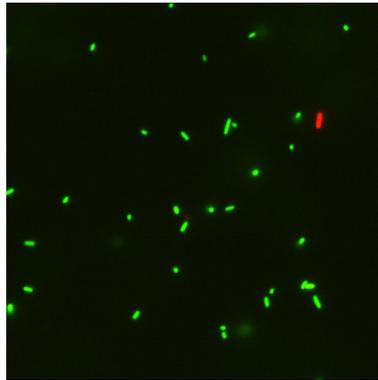
**Abbildung 3.9:** Verlauf der Cofaktorkonzentrationen bei rekombinanten *E. coli* BL21\* (DE3)-*LbADH*-Zellen ohne den Einfluss von Substraten und Produkten bei 30 °C; Kultivierung mit TB-Medium über 24 h im Bioreaktor (5 L), Zellernte und Resuspendieren der Zellen unter sterilen Bedingungen, Resuspendieren der Zellen in 50 mM Phosphatpuffer mit pH 6 und Einstellen einer Biomassekonzentration von 100 g<sub>BFM</sub>/L, Inkubation der Zellsuspensionen bei 30 °C, Probenahme unter sterilen Bedingungen und Analyse der Cofaktoren nach Probenaufarbeitung mittels LC-MS/MS, die gestrichelten Linien dienen der Orientierung und geben nicht die Messwerte zu den einzelnen Zeitpunkten wieder.

den nicht-phosphorylierten Cofaktor und eine Halbwertszeit von ca. 2 Tagen für den phosphorylierten Cofaktor ermittelt werden konnte. Die Halbwertszeiten lagen damit geringfügig über den Werten bezüglich der *E. coli*-Zellen ohne Überexpression (Kapitel 3.3). Dies kann daran liegen, dass die intrazellulären Cofaktorkonzentrationen zu Beginn des Versuches für NAD(H) um den Faktor 1,5 und für NADP(H) um den Faktor 2 höher waren als bei den *E. coli*-Zellen ohne Überexpression und sich somit eine längere Halbwertszeit ergab. Diese Abweichungen der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen können sich ergeben, da für die einzelnen Versuche unterschiedliche Zellchargen aus unterschiedlichen Kultivierungen benutzt wurden. Die Abweichung könnte aber auch mit der Redoxaktivität der rekombinanten Zellen zu tun haben.

Im Vergleich zur kontinuierlichen Umsetzung von Methylacetoacetat konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Halbwertszeiten festgestellt werden. Die Halbwertszeit innerhalb der Reaktion lag bei ca. 2,5 Tagen und die intrazellulären Cofaktorkonzentrationen lagen mit 728 µM bei 0,5 M Isopropanol und 793 µM bei 0,75 M

Isopropanol in vergleichbaren Größenordnungen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Substrate und Produkte in der kontinuierlichen Reaktion keinen nennenswerten Einfluss auf die intrazelluläre Verfügbarkeit der Cofaktoren hat und die Abweichungen zwischen den Halbwertszeiten bei rekombinantem *E. coli* BL21\* (DE3)-*LbADH*-Zellen nur die Standardabweichung innerhalb des Versuches widerspiegelt. Somit kann der intrazelluläre Erhaltungsstoffwechsel als hauptsächliche Ursache für die Abnahme der Cofaktorkonzentration innerhalb der kontinuierlichen Umsetzung von Methylacetoacetat angesehen werden.

Dass die Zellen ohne den Einfluss von Substraten und Produkten nicht in ihrer Zellintegrität beeinflusst werden, ist in Abbildung 3.10 zu erkennen.



**Abbildung 3.10:** Beeinflussung der Zellintegrität rekombinanter *E. coli* BL21\* (DE3)-*LbADH*-Zellen durch die Lagerung der Zellen in 50 mM Phosphatpuffer bei pH 6,0; 100 g<sub>BFM</sub>/L in 50 mM Phosphatpuffer mit pH 6,0, Inkubation der Zellsuspension über einen Zeitraum von 24 h bei 30 °C, Färben der Zellen mit SYTO 9 und Propidiumiodid, Visualisierung der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm im Fluoreszenzmikroskop bei einer 1000fachen Gesamtvergrößerung.

Es erfolgte hier eine selektive Fluoreszenzfärbung von Zellen, die in Phosphatpuffer über 24 h bei 30 °C gelagert wurden. Bei dieser Färbung kommt es nach Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm zu grün fluoreszierenden Zellen, bedingt durch den Farbstoff SYTO 9 und zu rot fluoreszierenden Zellen, bedingt durch den Farbstoff Propidiumiodid, wobei beide Farbstoffe die intrazelluläre DNA anfärben. Dabei ist der Farbstoff SYTO 9 in der Lage, intakte Zellmembranen zu passieren, wo-

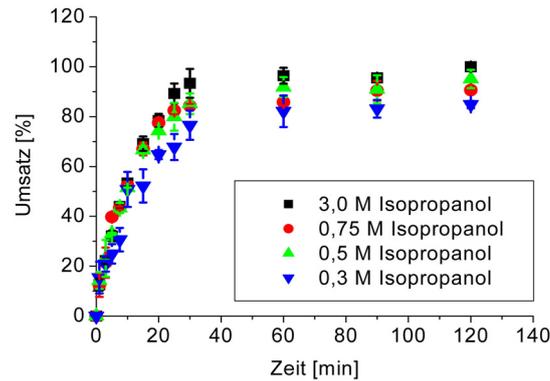
hingegen Propidiumiodid nur permeabilisierte Zellmembranen passieren kann. Bei permeabilisierten Zellen kommt es dabei zu einer Überlagerung der Fluoreszenz des SYTO 9 durch das Propidiumiodid. Wie in Abbildung 3.10 zu erkennen ist, waren weniger als 3 % an Zellen erkennbar, deren Zellintegrität beeinflusst war, so dass an dieser Stelle die Abnahme der intrazellulären Cofaktoren bedingt durch einen hohen Anteil von permeabilisierten Zellen ausgeschlossen werden konnte.

### 3.4.4 Ganzzellbiotransformationen im Satzverfahren

Da gezeigt werden konnte, dass die intrazellulären Cofaktoren in *E. coli* BL21\* (DE3)-*LbADH*-Zellen auch ohne den Einfluss der Substrate und Produkte eine Halbwertszeit von ca. 1-2 Tagen haben, wurde die Reaktionszeit durch die Umsetzung von Methylacetoacetat im Satzverfahren verkürzt. Gleichzeitig konnte damit einem möglichen Austreten der Cofaktoren aus dem Gesamtsystem vorgebeugt werden. Die Reaktionen erfolgten dabei mit der selben Methylacetoacetat-Konzentration (0,3 M) wie auch in der kontinuierliche Reaktion, nur die Isopropanolkonzentrationen für die Cofaktorregenerierung wurden variiert und lagen in einem Konzentrationsbereich von 0,3-3,0 M.

Die Reaktionen waren unabhängig von der Isopropanolkonzentration jeweils bereits nach 40 min beendet und es konnte innerhalb der Versuche ein Umsatz von > 80 % ermittelt werden. Die Umsätze über den zeitlichen Verlauf der Reaktionen sind in Abbildung 3.11 zusammengefasst.

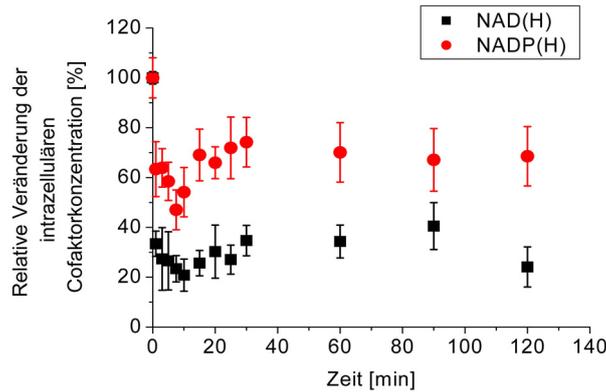
Die erreichten Umsätze von > 80 % korrelierten mit den bei Schroer *et al.* (2007a) angegebenen Werten. Durch das Absenken der Isopropanolkonzentration innerhalb der Versuche konnte keine signifikante Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt werden.



**Abbildung 3.11:** Umsätze über den zeitlichen Verlauf der einzelnen Batch-Reaktionen; Methylacetoacetat-Konzentration 0,3 M, Isopropanolkonzentration 3,0-0,3 M, Biomassekonzentration 100  $g_{BFM}/L$  in 50 mM Phosphatpuffer mit pH 6,0, 200 mL Reaktionsvolumen, Reaktionstemperatur von 30 °C, 1 mL Probe zu den einzelnen Zeitpunkten, Analyse des zellfreien und Hitze-inaktivierten Überstandes mittels GC, die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Bezüglich der intrazellulären Cofaktoren konnte jedoch festgestellt werden, dass es bereits direkt nach der Zugabe der Substrate, innerhalb der ersten Minute der Reaktion, zu einer Abnahme der intrazellulären Cofaktoren kam, außer bei einer Isopropanolkonzentration von 0,3 M. Dieses Phänomen konnte am deutlichsten bei der Verwendung von 3 M Isopropanol beobachtet werden, was in Abbildung 3.12 dargestellt ist.

Durch die Verkürzung der Reaktionszeiten bei der Umsetzung von Methylacetoacetat im Satzverfahren kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss des Erhaltungsstoffwechsels der Zellen auf die intrazellulären Cofaktorkonzentrationen vernachlässigt werden kann. Somit kann nur noch die Permeabilisierung der Zellen durch die Substrate als hauptsächliche Ursache für die Abnahme der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen angesehen werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass es bei den nicht phosphorylierten Cofaktoren zu einer deutlich stärkeren Abnahme kam als bei den phosphorylierten Cofaktoren, wie auch in Abbildung 3.12 zu erkennen ist.



**Abbildung 3.12:** Entwicklung der intrazellulären Cofaktorkonzentration in *E. coli* BL21\* (DE3)-*LbADH*-Zellen mit 3,0 M Isopropanol und 0,3 M Methylacetoacetat im Satzverfahren; 100  $g_{BFM}/L$  in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,0, 200 mL Reaktionsvolumen und 30 °C Reaktionstemperatur, Analyse der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen zu den einzelnen Zeitpunkten nach Zellaufschluss mittels LC-MS/MS, die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Dieses Phänomen konnte bereits während der Probenaufarbeitung für die Analysen der Cofaktoren mittels LC-MS/MS beobachtet werden. Hier kommt es bedingt durch den Einfluss des 50 %igen Methanols zu einem Übergang der Cofaktoren in den Quenchingüberstand, wobei hauptsächlich die nicht phosphorylierten Cofaktoren im Quenchingüberstand detektiert wurden. Dieser Effekt ist in Abbildung 3.1 a (Quenchingüberstand) vergleichend mit Abbildung 3.1 b (wässriger Überstand nach Zellaufschluss) zu erkennen. Folglich wird NADP(H) im Vergleich zu NAD(H) trotz Permeabilisierung der Zellmembran deutlich stärker in den Zellen zurückgehalten.

Nach dem initialen Abfall der intrazellulären Cofaktorkonzentration konnte eine relativ konstante Konzentration der Cofaktoren über den restlichen Verlauf der Biotransformation ermittelt werden. Die relativen Wiederfindungen an intrazellulären Cofaktoren bei der Variation der Isopropanolkonzentration innerhalb der Reaktionen im Satzverfahren sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

**Tabelle 3.2:** Zusammenfassung der prozentualen Wiederfindung der intrazellulären Cofaktoren nach der ersten Minute der Reaktion; 100 g<sub>BFM</sub>/L in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,0, Isopropanolkonzentrationen von 0,3-3,0 M, 0,3 M Methylacetoacetat, 30 °C Reaktionstemperatur, Analyse der intrazellulären Cofaktoren nach einer Minute Reaktionszeit mittels LC-MS/MS.

<b>Isopropanol- konzentration [M]</b>	<b>NAD(H)- konzentration [%]</b>	<b>NADP(H)- konzentration [%]</b>
3,0	33	63
0,75	66	78
0,5	81	93
0,3	100	98

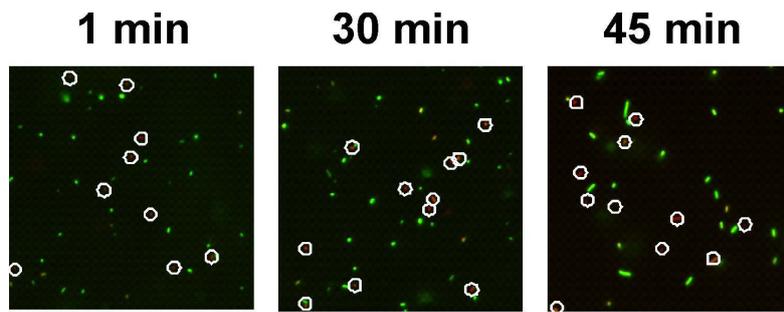
Entsprechend konnte ein Anstieg der Cofaktoren nach der ersten Minute der Reaktion im Reaktionsüberstand festgestellt werden. Dieser Effekt kann auf die Permeabilisierung der Zellen zurückgeführt werden. Bei einer Isopropanolkonzentration von 3,0 M konnte im Reaktionsüberstand nach dem initialen Anstieg der Cofaktorkonzentration eine kontinuierliche Abnahme der nicht-phosphorylierten Cofaktoren festgestellt werden, so dass die Bilanz zwischen den ausgetretenen und in der Zelle zurückgebliebenen Cofaktoren über die Zeit der Reaktion für den nicht-phosphorylierten Cofaktor nicht geschlossen werden konnte. Dieser Effekt ist auch bei Schroer *et al.* (2009) zu erkennen, wobei hier nicht zwischen den extrazellulären und intrazellulären Cofaktoren unterschieden wurde, sondern die Gesamtkonzentration angegeben ist. Hingegen konnte die Bilanz bei den phosphorylierten Cofaktoren zwischen den ausgetretenen und in der Zelle zurückgebliebenen Cofaktoren geschlossen werden, so dass die intrazellulären Verluste mit dem Anstieg im Reaktionsüberstand kompensiert werden konnten.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für die Versuche mit Isopropanolkonzentrationen von 0,75 M und 0,5 M. Wobei es auch hier nach initialer Zunahme der NAD<sup>+</sup>-Konzentration im Überstand zu einer kontinuierlichen Abnahme über den Zeitraum

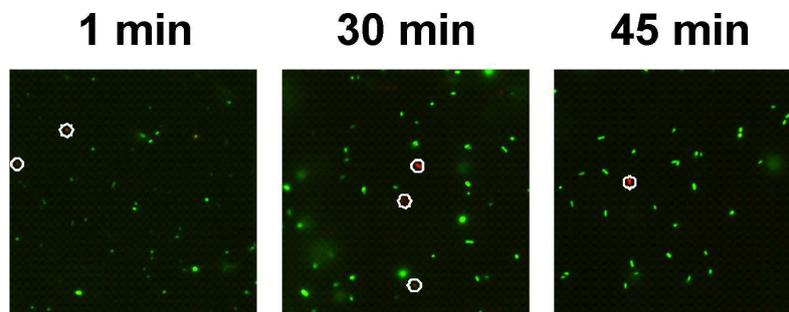
des Versuches kam. Die NADH-Konzentration blieb im Vergleich dazu relativ konstant. Somit konnte auch bei diesen Versuchen die Bilanz zwischen den ausgetretenen Cofaktoren und den in der Zelle verbliebenen Cofaktoren für den NAD(H)-Pool nicht geschlossen werden. Die Konzentrationen an extrazellulärem NADP(H) über den Zeitraum der Reaktion blieben wie zuvor konstant. Es konnte jedoch für den Versuch mit 0,75 M Isopropanol eine Abweichung von ca. 20 % bei der Bilanz zwischen den Cofaktoren im Überstand und den intrazellulären Cofaktoren festgestellt werden, was eine eindeutige Bilanzierung für den phosphorylierten Cofaktor in diesem Fall nicht möglich machte. Diesen initialen Effekt konnte man bei der kontinuierlichen Reaktion nicht erkennen, da dies durch die Probennahme im Abstand von ca. einem Tag nicht aufgelöst wurde.

Bei der Biotransformation mit einem äquimolaren Substratverhältnis (0,3 M Methylacetoacetat und 0,3 M Isopropanol) konnte kein Ausbluten der Cofaktoren beobachtet werden. Wobei auch hier die zu Beginn des Versuches vorhandene NAD<sup>+</sup>-Konzentration über den Zeitraum der Reaktion abnahm und die restlichen Cofaktoren in ihren Konzentrationen stabil blieben.

Da während der Versuche nur die Isopropanolkonzentration variiert wurde, während die Methylacetoacetat-Konzentration konstant blieb, scheint der beobachtete Leakage-Effekt einzig auf die unterschiedlichen Isopropanolkonzentrationen zurückzugehen. Dieser Effekt auf die Zellen wurde mit dem bereits beschriebenen Fluoreszenztest überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 und 3.14 dargestellt.



**Abbildung 3.13:** Beeinflussung der Zellintegrität durch 3 M Isopropanol nach 1 min, 30 min und 45 min; 100  $g_{BFM}/L$  in 50 mM Phosphatpuffer mit pH 6,0 und einer Isopropanolkonzentration von 3 M, Inkubation der Zellsuspension über einen Zeitraum von 1, 30 und 45 min, Färben der Zellen mit SYTO 9 und Propidiumiodid, Visualisierung der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm im Fluoreszenzmikroskop bei einer 1000fachen Gesamtvergrößerung, rote Zellen sind mit weißer Umrandung hervorgehoben.



**Abbildung 3.14:** Beeinflussung der Zellintegrität durch 0,3 M Isopropanol nach 1 min, 30 min und 45 min; 100  $g_{BFM}/L$  in 50 mM Phosphatpuffer mit pH 6,0 und einer Isopropanolkonzentration von 3 M, Inkubation der Zellsuspension über einen Zeitraum von 1, 30 und 45 min, Färben der Zellen mit SYTO 9 und Propidiumiodid, Visualisierung der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm im Fluoreszenzmikroskop bei einer 1000fachen Gesamtvergrößerung, rote Zellen sind mit weißer Umrandung hervorgehoben.

Mit Hilfe der Fluoreszenzfärbung der Zellen konnte dabei noch einmal gezeigt werden, dass die Beeinflussung der Zellen durch das Isopropanol ein initialer Effekt direkt nach der Zugabe zum Reaktionsansatz ist. Wie in Abbildung 3.13 und 3.14 zu erkennen ist, kam es im weiteren Verlauf der Inkubation mit den entsprechenden Isopropanolkonzentrationen zu keiner weiteren Beeinflussung der Zellintegrität. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass bei einer Isopropanolkonzentration von 3,0 M ca. 30 % der Zellen in ihrer Integrität beeinflusst wurden, bei einer Isopropanolkonzentration von 0,3 % dagegen nur ca. 3 %. Es muss hier aber verdeutlicht werden, dass nur die Zellen erfasst wurden, die nur zu einem gewissen Grad permeabilisiert

wurden, vollständig lysierte Zellen konnten dabei nicht berücksichtigt werden.

### 3.4.5 Zusammenfassung

Innerhalb der Ganzzellbiotransformationen mit dem ADH/ADH-System konnte gezeigt werden, dass es bei der kontinuierlichen Reaktion zu einer Limitierung bedingt durch die Abnahme der intrazellulären Cofaktorkonzentration kam. Die Reaktion mit einem Umsatz von  $> 90\%$  blieb bis zu einer Cofaktorkonzentration von 15-20 % der ursprünglichen Konzentration über einen Zeitraum von 7 Tagen stabil. Dies ist bedingt durch die Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung, bei der die Cofaktoren direkt am Enzym regeneriert werden. Dass die Abnahme der Cofaktoren dabei nicht nur durch den Einfluss der Substrate und Produkte bedingt ist, konnte durch die Bestimmung der Halbwertszeit von 1-2 Tagen in Abwesenheit der Substrate und Produkte gezeigt werden. Durch die vergleichbare Halbwertszeit des phosphorylierten Cofaktorpools in An- und Abwesenheit von Substraten und Produkten kann eine nennenswerte Beeinflussung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen durch die organischen Bestandteile in der Reaktion sogar ausgeschlossen werden.

Die Abnahme der Cofaktoren durch den Einfluss des Erhaltungsstoffwechsels konnte durch die Verkürzung der Reaktionszeit mit der Umsetzung von Methylacetoacetat im Satzverfahren vermindert werden. In dieser Arbeit konnte erstmals festgestellt werden, dass es bei Batchreaktion zu einer starken initialen Beeinflussung der intrazellulären Cofaktorkonzentration bedingt durch Isopropanol kommt. Dies äußerte sich vor allem bei einer Isopropanolkonzentration von 3,0 M. Bei einer Substratkonzentration von 0,3 M für beide Substrate konnte ein vollständiger Erhalt der intrazellulären Cofaktorkonzentration ermittelt werden. Da die Methylacetoacetatkonzentration über alle Versuche konstant war, kann für die initiale Beeinflussung der intrazellulären Cofaktorkonzentration nur das Isopropanol verantwortlich gemacht werden. Eine hohe Isopropanolkonzentration in einem 10-molaren Überschuss war bei dieser

Reaktion jedoch nicht nötig und für die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts auch nicht erforderlich, da bei 0,3 M Isopropanol noch ein Umsatz von > 80 % erreicht werden konnte. Bei dieser Reaktion beeinflusst vor allem das Isopropanol die Verfügbarkeit der intrazellulären Cofaktoren. Der Einfluss der Substrate und Produkte auf die intrazelluläre Verfügbarkeit muss jedoch für jedes System im Einzelnen überprüft werden.

Somit konnte für dieses System festgestellt werden, dass es für eine Erhöhung der Verfügbarkeit und Stabilität der Cofaktoren unter den getesteten Bedingungen notwendig war, die Reaktionszeit und die verwendete Isopropanolkonzentration herabzusetzen. Die Reaktion im Satzverfahren bei einer Konzentration an Substrat und Cosubstrat von 0,3 M erwies sich bezüglich der Stabilität und Verfügbarkeit der intrazellulären Cofaktoren am geeignetsten und ist dem kontinuierlichen Verfahren vorzuziehen.

## 3.5 Ganzzellbiotransformationen mit Enzym-gekoppelter Cofaktorregenerierung

Die Charakterisierung der Verfügbarkeit und Stabilität von intrazellulären Cofaktoren bei einer Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierung wurden mit einer ER-katalysierten Reaktion in Verbindung mit der bereits beschriebenen *LbADH* im Ganzzellsystem durchgeführt. Dafür musste die Reaktion mit dem Ganzzellbiokatalysator jedoch erst etabliert werden.

Für die Etablierung des Ganzzellsystems erfolgte die Optimierung der Produktion und Aufreinigung der ER sowie die Charakterisierung der Aktivität und Stabilität bei unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten im Rahmen einer Bachelorarbeit von Scheeren (2010). Weiterhin wurden in dieser Arbeit die kinetischen Parameter für den Cofaktor NADPH im Zusammenhang mit der Reduktion von Cyclohexenon bestimmt.

Um die Ganzzellbiotransformation in Verbindung mit der *LbADH* durchzuführen, erfolgte die Synthese eines geeigneten Substrates und die Überprüfung der Machbarkeit der Reaktion mit isolierten Enzymen sowie die Bestimmung der kinetischen Parameter für das Testsubstrat. Nach der Herstellung des Ganzzellbiokatalysators und der Expressionsoptimierung für die intrazellulären Proteine erfolgten Ganzzellbiotransformationen im Satzverfahren und kontinuierliche Biotransformationen.

### 3.5.1 Produktion und Aufreinigung der ER

Die Produktion der ER erfolgte innerhalb der Bachelorarbeit von Scheeren (2010) mit einem rekombinanten *E. coli* in Verbindung mit dem pET3b-OYE-Vektor.

Vor der Produktion der ER erfolgte eine Expressionsoptimierung hinsichtlich des

Expressionsmediums, der Induktorkonzentration, der Temperatur während der Expression und dem Zeitpunkt der Induktion. Dabei zeigte sich, dass TB-Medium für die Expression der ER am geeignetsten ist. Nach der Expressionsoptimierung im 200 mL Maßstab und einer Steigerung der Enzymausbeute um den Faktor 27 konnten die in Tabelle 3.3 zusammengefassten Parameter als die geeignetsten für die Expression der ER identifiziert werden.

**Tabelle 3.3:** Optimale Parameter für die Expression der ER im 200 mL Maßstab.

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Temperatur	32 °C
IPTG-Konzentration	0,6 mM
OD <sub>600</sub> bei Induktion	3

Nach der Übertragung dieser Parameter in den 5 L Maßstab wurde die höchste spezifische ER-Aktivität jedoch bei einer Expressionstemperatur von 27 °C ermittelt und die Enzymausbeute im Vergleich zur Kultivierung im 200 mL Maßstab noch einmal um 30 % gesteigert. Am Ende der Optimierung ergab sich bei der Produktion der ER eine Steigerung der Enzymausbeute um den Faktor 35, im Vergleich zur nicht optimierten Expression bei 37 °C mit 0,2 mM IPTG und einer Induktion zu Beginn der stationären Wachstumsphase. Mit der Optimierung der Expression wurde die Grundlage für eine effektive Aufarbeitung der ER gelegt.

Die Isolierung und Aufreinigung der ER erfolgte über eine Ionenaustauschchromatographie mit QFF-Sepharose und konnte in einem Schritt durchgeführt werden. Die isolierte ER hatte nach der Aufreinigung eine Reinheit von > 95 %. Für die Lagerung der ER wurde diese lyophilisiert, so dass aus der Aufreinigung von 15 g<sub>BFM</sub> 0,4 g Lyophilisat mit einer Gesamtaktivität von 530 U erzielt werden konnten. So konnte die Produktion und Aufreinigung der ER im Vergleich zu Saito *et al.* (1991) und Brown

*et al.* (1998) deutlich vereinfacht und der Gesamtprozess verkürzt werden.

### 3.5.2 Charakterisierung der ER

Bei der Charakterisierung der Abhängigkeit der Aktivität der ER von der Temperatur konnte bei Scheeren (2010) ein Temperaturoptimum bezüglich der Umsetzung von Cyclohexenon zu Cyclohexanon bei 45-50 °C mit einer spezifischen Aktivität von 5 U/mg<sub>ER</sub> ermittelt werden. Die Halbwertszeit der ER lag bei diesen Temperaturen jedoch nur noch bei 2,3 min (50 °C) bzw. 30 min (45 °C). Höhere Halbwertszeiten von > 1 Monat konnten bei einer Temperatur von 25 °C mit einer spezifischen Aktivität von 2,4 U/mg<sub>ER</sub> ermittelt werden.

Die Charakterisierung der Abhängigkeit der ER-Aktivität und -Stabilität vom pH-Wert ergab die höchste spezifische Aktivität bei einem pH-Wert von 7,5 mit 2,8 U/mg<sub>ER</sub>. Die höchste Stabilität der ER wurde jedoch bei einem pH-Wert von 7,0 ermittelt, wobei die Aktivität bei diesem pH-Wert über einen Zeitraum von 2 Wochen ausgehend von 2,4 U/mg<sub>ER</sub> nur um 4 % abgenommen hat. Die Ermittlung der Lagerstabilität bei -20 °C für das Lyophilisat ergab innerhalb von 2 Monaten keinen Aktivitätsverlust der ER.

Die ER erwies sich somit, unter den für die späteren Reaktionen vorgesehenen Parametern bezüglich der Temperatur und des pH-Werts, als ein sehr stabiles Enzym, welches sich bei einer Temperatur von -20 °C über einen langen Zeitraum ohne Aktivitätsverluste lagern lässt.

Durch die Arbeit von Scheeren (2010) konnte die Präferenz der ER gegenüber dem phosphorylierten Cofaktor noch einmal deutlich gezeigt werden. Die weiteren Charakterisierungen der ER erfolgten daher nur mit NADP(H). Durch die Arbeit von Scheeren (2010) wurden die bei Brown *et al.* (1998) angegebenen kinetischen Parame-

ter für die Standardreaktion der ER mit Cyclohexanon und NADPH bestätigt und spezifiziert. Für Cyclohexanon ergab sich ein  $K_m$ -Wert von  $0,004 \text{ mM} \pm 0,002 \text{ mM}$  und ein  $V_{max}$ -Wert von  $3,8 \text{ U/mg}_{ER} \pm 0,1 \text{ U/mg}_{ER}$  sowie ein  $K_i$ -Wert von  $40 \text{ mM} \pm 6 \text{ mM}$ . Die Ermittlung der kinetischen Parameter für den Cofaktor NADPH ergaben einen  $K_m$  von  $0,05 \text{ mM} \pm 0,007 \text{ mM}$  und einen  $V_{max}$ -Wert von  $4,1 \text{ U/mg}_{ER} \pm 0,1 \text{ U/mg}_{ER}$ . Für die Produkte der Reaktion (Cyclohexanon und  $\text{NADP}^+$ ) konnte keine Beeinflussung der Reaktion festgestellt werden.

### 3.5.3 Synthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat

Da die Cofaktorregenerierung innerhalb der Ganzzellbiotransformation durch die *LbADH* erfolgen sollte, kann es bei der Verwendung von Carbonyl-aktivierten C=C-Bindungen für die ER-katalysierte Reaktion zu Nebenreaktionen kommen, bedingt durch die *LbADH* (Hall *et al.*, 2006). Daher erfolgte die notwendige elektronische Aktivierung der C=C-Bindung innerhalb dieser Arbeit mit einer Nitrogruppe, so dass Nebenreaktionen mit der *LbADH* ausgeschlossen werden konnten. Da das entsprechende Substrat ((Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat, Abbildung 3.15) nicht kommerziell erhältlich war, wurde die Synthese des Substrats nach Martin *et al.* (2008) und Swiderska und Stewart (2006) durchgeführt.

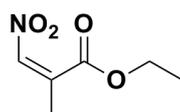
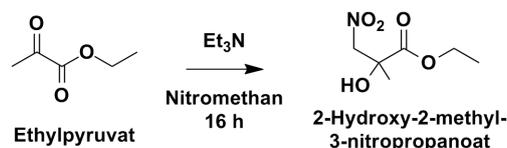


Abbildung 3.15: (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat

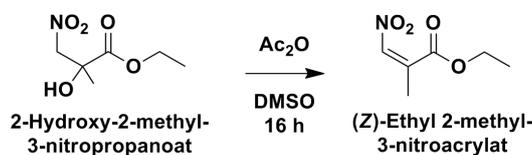
Die Synthese erfolgte ausgehend von Ethylpyruvat. Im ersten Schritt wurde mit einer Nitroaldolreaktion (*Henry*-Reaktion, Abbildung 3.16) die Nitrogruppe eingeführt. Für diese Reaktion konnte eine Ausbeute von 80 % bezogen auf das eingesetzte Ethylpyruvat ermittelt werden. Die Identifikation des Produktes erfolgte über über  $^1\text{H}$ -NMR sowie  $^{13}\text{C}$ -NMR und entsprach den Referenzwerten bei Martin *et al.* (2008)

und Swiderska und Stewart (2006).



**Abbildung 3.16:** Erste Stufe der Substratsynthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat, Henry-Reaktion.

Im zweiten Schritt erfolgte die Dehydratation des erhaltenen Nitroalkohols unter Bildung der C=C-Bindung (Abbildung 3.17). Die Ausbeute für diese Reaktion lag bezogen auf den eingesetzten Nitroalkohol bei 75 %, so dass sich eine Gesamtausbeute von 60 % bezogen auf das in der ersten Stufe eingesetzte Ethylpyruvat ergab. Die Ausbeute war im Vergleich zu Martin *et al.* (2008) und Swiderska und Stewart (2006) um 5 % geringer. Die Identifikation des Produktes erfolgte über über  $^1\text{H-NMR}$  sowie  $^{13}\text{C-NMR}$  und entsprach den Referenzwerten bei Martin *et al.* (2008) und Swiderska und Stewart (2006).



**Abbildung 3.17:** Zweite Stufe: Dehydratation des Nitroalkohols.

Im Gegensatz zu Martin *et al.* (2008); Swiderska und Stewart (2006) konnte das Produkt jedoch Diastereomeren-rein ohne das Auftreten von (E)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat als Nebenprodukt gewonnen werden. Das Auftreten von (E)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat im aufgereinigten Produkt konnte ausgeschlossen werden, da das für dieses Diastereomer auftretende Signal im  $^1\text{H-NMR}$  bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta=7,72$  ppm (Martin *et al.*, 2008) nicht beobachtet wurde. So konnte pro Ansatz aus 0,5 mol Ethylpyruvat 0,3 mol (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat synthetisiert werden. Dadurch wurde eine ausreichende Menge an Substrat für die biokatalytischen Reaktionen mit der ER bereitgestellt.

### 3.5.4 Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat mit Natriumborhydrid

Für die Kalibrierung der achiralen Gaschromatographie, die Etablierung der Enantiomerenanalytik und die Identifikation des Produktes aus der Biotransformation erfolgte eine chemische Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat mit Natriumborhydrid.

Die Reduktion wurde mit einer Ausbeute von 70 % durchgeführt, so dass 22 mmol (3,5 g) *rac*-Ethyl-2-methyl-3-nitropropanoat isoliert werden konnten. Die Identifikation erfolgte über  $^1\text{H-NMR}$  sowie  $^{13}\text{C-NMR}$  und entsprach den Referenzdaten von Martin *et al.* (2008) und Wakabayashi *et al.* (2008).

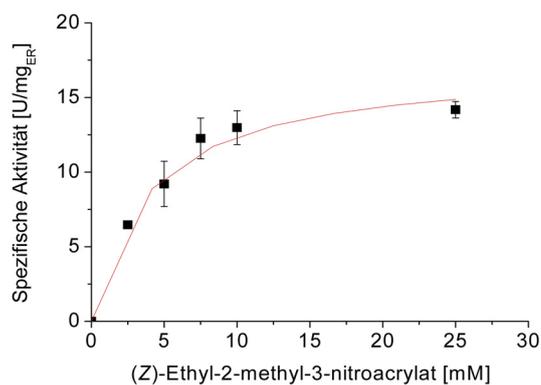
Mit der erhaltenen Menge an *rac*-Ethyl-2-methyl-3-nitropropanoat konnte die Kalibrierung der achiralen Gaschromatographie für die Ermittlung der Umsätze während der Biotransformationen und die Etablierung der Enantiomerenanalytik durchgeführt werden.

### 3.5.5 Ermittlung der kinetischen Parameter für (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat

Bei der Ermittlung der kinetischen Parameter der ER-katalysierten Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat, welche die Zielreaktion für Ganzzellbiotransformation darstellte, wurde nur der Einfluss von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat auf die Reaktion charakterisiert. Dies erfolgte deshalb, da bei Scheeren (2010) gezeigt werden konnte, dass die Produkte der Reduktion von Cyclohexanon ( $\text{NADP}^+$  und Cyclohexanon) keinen Einfluss auf die Reaktion hatten. Des Weiteren konnte mit den

eingesetzten Konzentrationen von bis zu 25 mM (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat kein inhibitorischer Effekt des Produktes innerhalb der Umsetzungen mit isoliertem Enzym und ganzen Zellen beobachtet werden.

Die Ermittlung der kinetischen Parameter erfolgte für dieses Substrat bis zu einer Konzentration von 25 mM, die die Löslichkeitsgrenze darstellte. Die Ermittlung der kinetischen Parameter für (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat (Abbildung 3.18) ergaben einen  $K_m$ -Wert von  $3,9 \text{ mM} \pm 3,4 \text{ mM}$  und ein  $V_{max}$  von  $17,2 \text{ U/mg}_{ER} \pm 5,4 \text{ U/mg}_{ER}$ . Eine inhibitorische Wirkung durch das Substrat konnte im gemessenen Konzentrationsbereich nicht ermittelt werden. Damit liegt der  $K_m$ -Wert bezüglich des Nitrosubstrates um den Faktor 1000 höher als der  $K_m$ -Wert für Cyclohexenon, hingegen ist der  $V_{max}$ -Wert im Vergleich zum Cyclohexenon ca. 4fach höher.

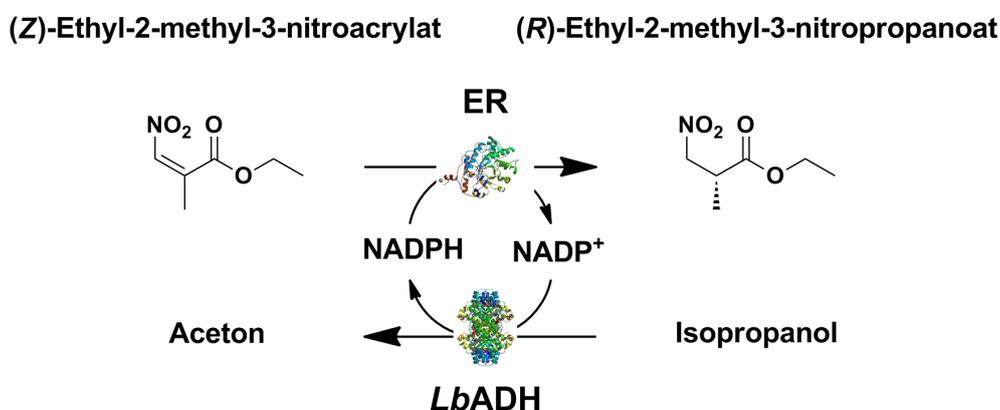


**Abbildung 3.18:** Einfluss der (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat-Konzentration auf die Aktivität der ER; Umsetzung von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat im Konzentrationsbereich von 0-25 mM unter Verwendung von 10 mM NADPH, Reaktionen in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,9, 2 mL Reaktionsvolumen, 25 °C Reaktionstemperatur, Bestimmung des Umsatzes nach 1 min Reaktionszeit durch Extraktion mit Ethylacetat und Analyse mittels GC, die Versuche wurden in 3fach Bestimmung durchgeführt.

### 3.5.6 Biokatalytische Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat mit isolierter ER im Satzreaktor

Bei der Etablierung der Ganzzellbiotransformation für die Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat wurde damit begonnen, die Machbarkeit der Reaktion *in vitro*

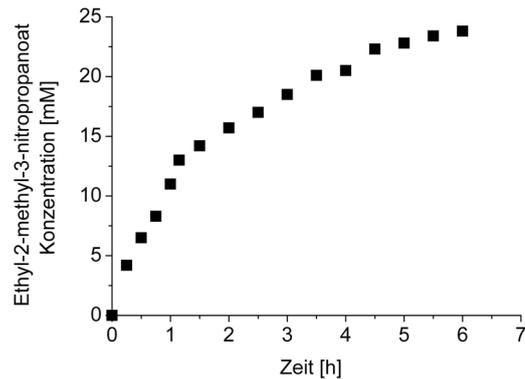
zu ermitteln. Bisher wurde für die Cofaktorregenerierung bei ER-katalysierten Reaktionen in der Literatur Glukosedehydrogenase (Müller *et al.*, 2010; Stueckler *et al.*, 2010) oder Glukose-6-phosphat-dehydrogenase (Hall *et al.*, 2008; Stueckler *et al.*, 2007; Swiderska und Stewart, 2006) eingesetzt. In dieser Arbeit sollte die Cofaktorregenerierung durch die bereits beschriebene *LbADH* in Verbindung mit Isopropanol als Co-substrat durchgeführt werden. Die Fähigkeit der *LbADH*, den Cofaktor im ADH/ADH-System Substrat-gekoppelt zu regenerieren, sollte bei diesem System (Abbildung 3.19) auf einen Enzym-gekoppelten Ansatz der Cofaktorregenerierung übertragen werden.



**Abbildung 3.19:** Reaktionsschema für die Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat mit der ER in Verbindung mit der *LbADH* für die Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung.

Die Verwendung der *LbADH* erfolgte unter anderem auch deshalb, weil für das ER/ADH-System im Vergleich zum ADH/ADH-System nur ein Enzym geändert wurde und so ein direkte Vergleich zur Ganzzellbiotransformation mit dem ADH/ADH-System möglich ist. Weiterhin handelt es sich bei der Oxidation von Isopropanol unter Reduktion der Cofaktoren durch die *LbADH* um eine bereits etablierte Reaktion, bei der der Effekt des Isopropanols auf die Ganzzellbiokatalysatoren (*E. coli* BL21\* (DE3)-Zellen) gut charakterisiert ist, auch sind die kinetischen Parameter für diese Reaktion bereits bekannt.

Die Reaktion erfolgte in Anlehnung an die von Swiderska und Stewart (2006) beschriebene Reduktion von Nitroacrylaten mit lyophilisierter ER. Für die Cofaktorregenerierung mit Isopropanol als Cosubstrat wurde lyophilisierte *LbADH* eingesetzt. Der Verlauf der Produktkonzentrationen über die Reaktionszeit ist in Abbildung 3.20 dargestellt.



**Abbildung 3.20:** Produktkonzentrationen der ER-katalysierten Umsetzung von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat über den zeitlichen Verlauf der Reaktion und einer Cofaktorregenerierung durch *LbADH* im Satzreaktor; 0,2 mg<sub>ER</sub>/mL und 0,1 mg<sub>LbADH</sub>/mL in 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,9, 0,025 M (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat und 0,4 M Isopropanol, 0,2 mM NADP<sup>+</sup>, Reaktionsvolumen 50 mL, Reaktionstemperatur 25 °C, Bestimmung des Umsatzes zu den entsprechenden Zeiten nach Extraktion von 1 mL Reaktionsansatz mit 300 µL Ethylacetat und Analyse mittels GC.

Nach 6,5 h Reaktionszeit konnte ein Umsatz von > 95 % festgestellt werden. Eine Erhöhung der Substratkonzentration über eine Konzentration von 0,025 M hinaus erfolgte nicht, da bei dieser Konzentration die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bereits erreicht ist, wie in Kapitel 3.5.5 gezeigt werden konnte. Gleichzeitig stellt die Konzentration von 0,025 M die Löslichkeitsgrenze des (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat in wässrigem Puffer dar.

Die kürzere Reaktionszeit im Vergleich zur Literatur (8 h) (Swiderska und Stewart, 2006) lässt sich durch die 100fach höhere Konzentration an eingesetzter ER erklären.

Die Proteinkonzentration wurde so hoch gewählt, da die Zugabe des Substrats und des Cosubstrats nicht wie bei Swiderska und Stewart (2006) sukzessiv erfolgte, sondern in einer Portion zu Beginn der Reaktion. Die sukzessive Zugabe der Substrate sollte dabei längere Prozesszeiten gewährleisten. Dafür konnte im Vergleich zur Literatur die eingesetzte Menge an Cofaktor halbiert werden.

Bei dieser Reaktion erfolgte nur die Zugabe von nicht reduziertem Cofaktor. Mit dem erzielten Umsatz konnte daher gleichzeitig gezeigt werden, dass die Cofaktoregenerierung mit der *LbADH* effektiv durchgeführt werden kann. Im Gegensatz zu den bei Hall *et al.* (2008, 2007); Müller *et al.* (2010); Stueckler *et al.* (2007, 2010); Swiderska und Stewart (2006) beschriebenen Cofaktoregenerierungen kann die Enzymgekoppelte Cofaktoregenerierung somit auch durch die *LbADH* durchgeführt werden. Jedoch nur mit Substraten, die nicht gleichzeitig auch mittels *LbADH* umgesetzt werden.

### 3.5.7 Zusammenfassung

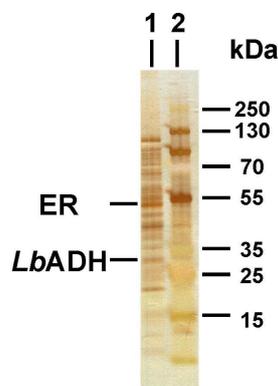
Bei der Umsetzung von (*Z*)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat mit isolierten Enzymen konnte gezeigt werden, dass die Kopplung der ER mit der *LbADH* für die Cofaktoregenerierung prinzipiell möglich ist und dabei ein Umsatz von > 95 % erreicht werden kann. Zudem konnte die notwendige Menge an Cofaktor innerhalb der Reaktion im Vergleich zur Literatur um die Hälfte reduziert werden.

## 3.6 Ganzzellbiotransformationenen mit dem ER/ADH-System

### 3.6.1 Klonierung und Transformation des pCDF-Duet-*LbADH*-*OYE*-Vektors

Nach der Selektion der positiven Klone, im Anschluss an die Transformation, wurde ein Klon in TB-Medium kultiviert und die intrazelluläre Enzymproduktion mit IPTG induziert. Für die Kontrolle der intrazellulären Enzymexpression erfolgte ein Zellaufschluss und die Analyse des geklärten Rohextraktes mittels SDS-PAGE.

In Abbildung 3.21 ist das Ergebnis der Auftrennung des Rohextraktes über SDS-PAGE nach der Silberfärbung zu erkennen. Es ist ersichtlich, dass die Expression sowohl der Enreduktase als auch der Alkoholdehydrogenase erfolgte, da nach der Visualisierung der Proteine deutliche Banden für die ER bei 49 kDa und für die *LbADH* bei 26 kDa zu erkennen waren.



**Abbildung 3.21:** SDS-PAGE des Rohextraktes von rekombinanten *E. coli* BL21\* (DE3)-ER-*LbADH*-Zellen nach Silberfärbung, Spur 1: geklärter Rohextrakt, Spur 2: Marker; Kultivierung in 200 mL TB-Medium (1000 mL Schüttelkolben), Kultivierung bei 150 rpm und 37 °C, Induktion der Expression mit 0,2 mM IPTG, Zellaufschluss in 50 mM Phosphatpuffer pH 7 mit einer Biomassekonzentration von 100 g<sub>BFM</sub>/L, 1:200 Verdünnung des geklärten Rohextraktes für den Auftrag auf das SDS-Gel, für die Elektrophorese wurde ein 4-12 %iges Bis-Tris Gel verwendet und der SeeBlue Plus2 Prestained Proteinstandard, Visualisierung der Proteinbanden durch Silberfärbung.

Somit verlief die Klonierung des *lbadh*- und *oye*-Gens in den pCDF-Duet1 Vektor und die Transformation des Vektors in *E. coli* BL21\* (DE3) erfolgreich. Beide Proteine wurden in einen Vektor kloniert, wobei jedes Protein unter der Kontrolle eines einzelnen Promotors stand. Dadurch konnte davon ausgegangen werden, dass beide Enzyme in gleicher Masse exprimiert wurden. Wie in Abbildung 3.21 jedoch zu erkennen ist, war die Bande für die ER intensiver als die Bande für die *LbADH*, so dass die ER vergleichsweise stärker exprimiert wurde als die *LbADH*. Daher konnte die Charakterisierung der intrazellulären Enzymaktivität über die *LbADH* erfolgen. Die Charakterisierung der ER mit Cyclohexenon und dem Nitrosubstrat erfolgte auch deshalb nicht, da es aufgrund der vorhandenen *LbADH* zu Nebenreaktionen bei der Verwendung des Cyclohexenons gekommen wäre und das Nitrosubstrat nur im begrenzten Maße zur Verfügung stand. Die Ausnutzung der intrazellulären *LbADH*-Aktivität hatte weiterhin den Vorteil, dass die gut wasserlöslichen Substrate innerhalb eines Zeitraums von 3 min umgesetzt wurden, der eine schnelle Quantifizierung der Enzymaktivität ermöglichte. So hatten die Zellen, die auch für die Analyse mittels SDS-PAGE genutzt wurden, eine *LbADH*-Aktivität von 50 U/g<sub>BTM</sub>. Damit konnte das Ganzzellsystem für die Biotransformationen benutzt werden.

### 3.6.2 Expressionsoptimierung ER/ADH-System

Die in dieser Arbeit bereits beschriebenen Expressionsparameter konnten nicht auf dieses System übertragen werden, da es sich hier um einen anderen Vektor, im Vergleich zum ADH/ADH-System und der Produktion der ER, handelte. Da die intrazelluläre *LbADH*-Aktivität ohne eine weitere Optimierung der Enzymexpression nach der Klonierung nur 50 U/g<sub>BTM</sub> im Vergleich zu 8000 U/g<sub>BTM</sub> beim ADH/ADH-System betrug, wurde eine Optimierung der Expression durchgeführt. Die Optimierung der intrazellulären Enzymaktivität innerhalb des ER/ADH-Systems erfolgte im 200 mL Maßstab mit einer Parallelfertigungsanlage der Firma DASGIP bezüglich der Expressionstemperatur, der Induktorkonzentration (IPTG) und dem Zeitpunkt

der Induktion innerhalb der Kultivierung. Wie bereits bei der Expressionsoptimierung der Enreduktase gezeigt werden konnte, hat die Absenkung der Kultivierungstemperatur einen positiven Einfluss auf die Expression von aktiven Enzymen. Deshalb wurde die Expression nur bei Temperaturen von 27 °C und 32 °C betrachtet. Die Quantifizierung der Expression erfolgte über die intrazelluläre *LbADH*-Aktivität.

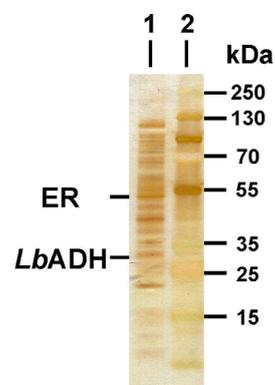
Die Ergebnisse der Expressionsoptimierung sind in Tabelle 3.4 mit den entsprechenden Parametern bezüglich der Expression zusammengefasst.

**Tabelle 3.4:** Ergebnisse für die Expressionsoptimierung des ER/ADH-Ganzzellsystems mit den entsprechenden Parametern während der Expression;  
Kultivierung im 200 mL Maßstab im Bioreaktor mit TB-Medium, Induktion der Expression bei  $OD_{600}=3$  und 20 mit IPTG in den Konzentrationen von 0,2-0,5 mM, Gesamtdauer der Kultivierung 24 h, Zellernte durch Zentrifugation und Resuspendieren der Zellen in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0, Aktivitätsassay mit 300 mM Methylacetoacetat und 600 mM Isopropanol bei Raumtemperatur über 3 min, Analyse des zellfreien Überstandes mittels GC.

Temperatur nach Induktion [°C]	Induktor- konzentration [mM]	Optische Dichte bei Induktion [-]	<i>LbADH</i> -Aktivität [U/g <sub>BTM</sub> ]
32	0,2	20	61
32	0,5	20	56
32	0,2	3	169
32	0,4	3	90
27	0,2	3	62
27	0,4	20	62

Bei den Optimierungsversuchen konnte die höchste intrazelluläre *LbADH*-Aktivität (169 U/g<sub>BTM</sub>) bei einer Expressionstemperatur von 32 °C und einer Induktion mit 0,2 mM IPTG zu Beginn der exponentiellen Phase ermittelt werden. Im Vergleich dazu erfolgte die Herstellung des Ganzzellbiokatalysators für das ADH/ADH-System bei 27 °C und unter sonst gleichen Bedingungen (Kapitel 3.4.2). Eine weitere Erhöhung der IPTG-Konzentration führte zu keiner weiteren Steigerung der *LbADH*-Aktivität. Die Aktivität bei höherer IPTG-Konzentration (0,4 mM) war dabei um ca.

50 % geringer. Wie auch bei der Expressionsoptimierung während der ER-Produktion war hier während der Expression eine geringere Enzymexpression bei 27 °C und bei einem Induktionszeitpunkt zu Beginn der stationären Wachstumsphase festzustellen (Scheeren, 2010). So ergab die Expression bei 27 °C eine *LbADH*-Aktivität von 62 U/g<sub>BTM</sub>, was einer 63 % geringeren Aktivität zum maximalen Wert entspricht. Die Expressionsparameter von 32 °C und eine Induktion mit 0,2 mM IPTG zu einem frühen Zeitpunkt der exponentiellen Wachstumsphase zeigten sich somit als die geeignetsten für die intrazelluläre Enzymexpression hinsichtlich der *LbADH*. Da bereits gezeigt wurde, dass die ER, unter nicht optimierten Bedingungen (37 °C, 0,2 mM IPTG und Kultivierung im Schüttelkolben) stärker exprimiert wird als die *LbADH*, konnte davon ausgegangen werden, dass dies auch nach der Expressionsoptimierung der Fall war. In Abbildung 3.22 ist das Ergebnis der Auftrennung des Rohextraktes nach der Expressionsoptimierung über SDS-PAGE nach Silberfärbung zu erkennen. Es kann hier gezeigt werden, dass auch nach der Expressionsoptimierung die ER in bezug auf die *LbADH* geringfügig stärker exprimiert wurde.



**Abbildung 3.22:** SDS-PAGE des Rohextraktes nach Silberfärbung von rekombinanten *E. coli* BL21\* (DE3)-ER-*LbADH*-Zellen nach Expressionsoptimierung, Spur 1: geklärter Rohextrakt nach Expressionsoptimierung, Spur 2: Marker; Kultivierung im 200 mL Maßstab mit TB-Medium im Bioreaktor bei 37 °C bis zur Induktion, Induktion der Expression mit 0,2 mM IPTG bei OD<sub>600</sub> von 3 und 32 °C Expressionstemperatur, Zellaufschluss in 50 mM Phosphatpuffer pH 7 mit einer Biomassekonzentration von 100 g<sub>BFM</sub>/L, 1:400 Verdünnung des geklärten Rohextraktes für den Auftrag auf das SDS-Gel, für die Elektrophorese wurde ein 4-12 %iges Bis-Tris Gel verwendet und der SeeBlue Plus2 Prestained Proteinstandard, Visualisierung der Proteinbanden durch Silberfärbung.

Nach der Übertragung der ermittelten Expressionsparameter in den 5 L Maßstab für die Produktion der Ganzzellkatalysatoren konnte eine weitere Erhöhung der intrazellulären *LbADH*-Aktivität beobachtet werden. Durch den Scale-up stieg die Aktivität um den Faktor 1,6 auf 306 U/g<sub>BTM</sub>. Die weiteren Kultivierungen für die Herstellung der Ganzzellkatalysatoren erfolgten mit den genannten Parametern.

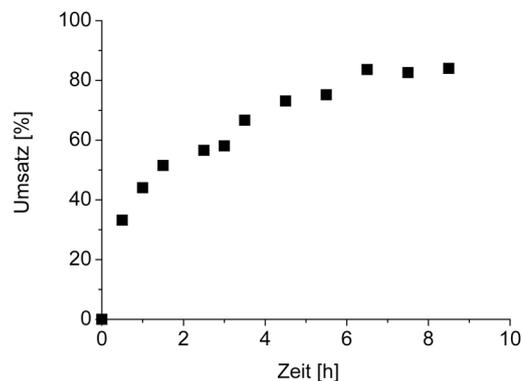
### 3.6.3 Ganzzellbiotransformation im Satzverfahren

Damit die Quantifizierung der intrazellulären Cofaktoren innerhalb der Biotransformation erfolgen konnte, wurde das spezifische Volumen (Volumen/Biotrockenmasse) der Zellen direkt nach der Kultivierung ermittelt. Anschließend erfolgte die Übertragung der Reaktionsparameter aus der Reaktion mit den isolierten Enzymen auf den Einsatz von ganzen Zellen als Biokatalysator.

Nachdem am Ende der Kultivierung das Gesamtvolumen nach einer 1:200000 Verdünnung vermessen wurde, erfolgte die Berechnung des Zellvolumens bezogen auf die Biotrockenmasse mit den Formeln 01-03 (Kapitel 6.12.1.3). Mit einer 1:200000 Verdünnung der Zellsuspension und einer Biotrockenmasse von 5,6 mg<sub>BTM</sub>/mL ergab sich ein Zellvolumen von  $2,6 \mu\text{L}/\text{mg}_{\text{BTM}} \pm 0,02 \mu\text{L}/\text{mg}_{\text{BTM}}$ , welches für die weiteren Berechnungen der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen verwendet wurde. Dieses Zellvolumen entsprach wiederum den in der Literatur angegebenen Größenordnungen (Bennett *et al.*, 2009; Buchholz *et al.*, 2001; Pramanik und Keasling, 1997) und war im Vergleich zum ADH/ADH-System um 20 % größer.

Um den Einfluss des enzymatischen Zellhintergrunds auf das Substrat zu bestimmen, wurde dieses in einem geklärten Zellaufschluss von nicht rekombinanten *E. coli* BL21\* (DE3)-Zellen bei Raumtemperatur über 24 h inkubiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass es nicht zu einer Umsetzung des Substrates (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat durch die Stoffwechsellenzyme von *E. coli* BL21\* (DE3) kommt.

Innerhalb der Ganzzellbiotransformationen mit dem ADH/ADH-System konnte gezeigt werden, dass Isopropanolkonzentrationen unterhalb von 0,5 M einen vergleichsweise geringen Effekt auf die Verfügbarkeit von intrazellulärem Cofaktor für die Biotransformation haben. Die Abnahme des NADP(H) war bei 0,5 und 0,3 M Isopropanol  $\leq 7\%$  (Kapitel 3.4.4). Um eine möglichst hohe Effektivität der Cofaktorgenerierung bei gleichzeitig geringer Beeinflussung der Zellintegrität zu erhalten, erfolgte die Umsetzung von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat unter Verwendung von 0,4 M Isopropanol. Der vergleichsweise hohe Überschuss an Cosubstrat wurde eingesetzt, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass dieser Überschuss für einen vollständigen Umsatz notwendig ist. Die Produktkonzentration über den zeitlichen Verlauf der Umsetzung mit *E. coli* BL21\* (DE3)-ER-*Lb*ADH-Zellen ist in Abbildung 3.23 dargestellt.

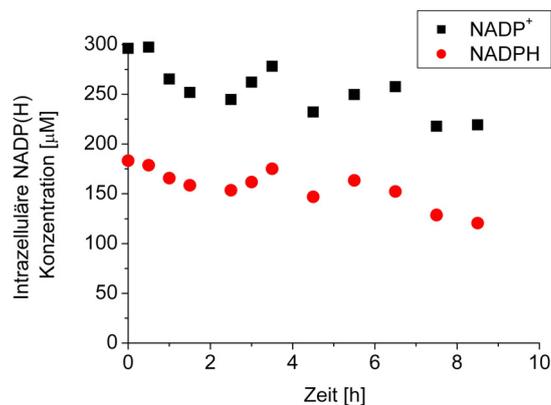


**Abbildung 3.23:** Produktkonzentrationen über den Reaktionszeitraum bei der Ganzzellbiotransformation mit *E. coli* BL21\* (DE3)-ER-*Lb*ADH von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat im Satzverfahren; 100 g<sub>BFM</sub>/L in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,9, 0,025 M (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat und 0,4 M Isopropanol, 25 °C Reaktionstemperatur, 1 mL Probe für die Bestimmung des Umsatzes nach Extraktion mit 300  $\mu$ L Ethylacetat und Analyse der Probe mittels GC.

Wie aus Abbildung 3.23 hervorgeht war diese Reaktion, wie auch die Umsetzung mit isoliertem Enzym, nach ca. 6,5 h abgeschlossen. Eine Limitierung der Biotransformation durch eine Diffusionsbehinderung der Substrate über die Zellmembran

konnte somit ausgeschlossen werden. Innerhalb der Ganzzellbiotransformation war der Umsatz im Vergleich zur Reaktion mit isoliertem Enzym (Umsatz > 95 %) etwas geringer. Da bei einer Konzentration von 0,025 M (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat bereits  $V_{max}$  sowie die Löslichkeitsgrenze erreicht wurde erfolgte keine weitere Steigerung der Substratkonzentration.

Bezüglich der intrazellulären Verfügbarkeit von NADP(H) konnte eine Abnahme des oxidierten Cofaktors um 25 % und des reduzierten Cofaktors um 35 % über den Verlauf der gesamten Batchreaktion ermittelt werden. Dabei kam es nicht, wie bei der Biotransformation im ADH/ADH-System, zu einer initialen Absenkung der Cofaktorkonzentration (Kapitel 3.4.4, Abbildung 3.12), da nur 0,4 M Isopropanol eingesetzt wurden. Die Abnahme der intrazellulären Cofaktoren erfolgte in diesem Fall kontinuierlich über den gesamten Zeitraum der Reaktion, wie in Abbildung 3.24 zu erkennen ist.



**Abbildung 3.24:** Intrazelluläre NADP(H)-Konzentrationen während der Ganzzellreduktion mit *E. coli* BL21\* (DE3)-ER-LbADH von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat im Satzverfahren; 100 g<sub>BFM</sub>/L in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,9, 0,025 M (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat und 0,4 M Isopropanol, 25 °C Reaktionstemperatur, 5 mL Probe für die Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen nach Probenaufarbeitung und Messung mittels LC-MS/MS.

Wie aus Abbildung 3.24 hervorgeht, konnte innerhalb der Reaktion keine Limitierung an reduziertem Cofaktor festgestellt werden. Das weist darauf hin, dass die

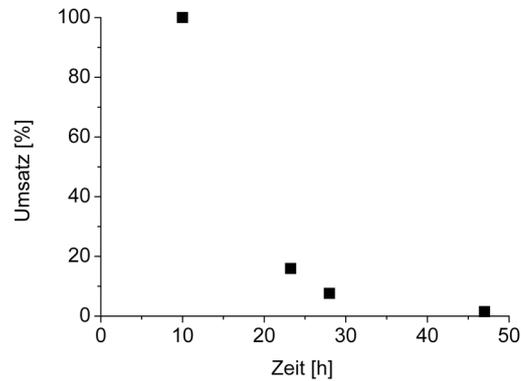
Regenerierung der Cofaktoren, wie auch bei der Reaktion mit den isolierten Enzymen, im Ganzzellsystem effektiv durch die *LbADH* über den gesamten Zeitraum der Reaktion erfolgte.

### 3.6.4 Kontinuierliche Ganzzellbiotransformation

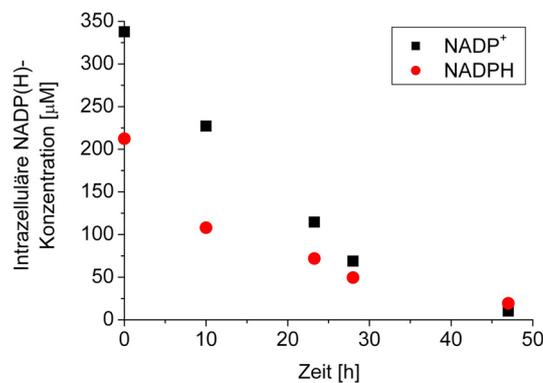
Um die mögliche Raum-Zeit-Ausbeute der Reaktion zu erhöhen, erfolgte die Umsetzung von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat in einer kontinuierlichen Reaktion. Für eine Vergleichbarkeit mit dem ADH/ADH-System wurde ebenfalls eine Verweilzeit von 2 h eingestellt. Damit innerhalb dieser Verweilzeit eine vollständige Umsetzung des Substrates erfolgen konnte, wurde eine (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat-Konzentration von 0,01 M im Zulauf eingestellt. Diese Konzentration ergab sich aus der Umsetzung innerhalb der Reaktion im Satzverfahren, die nach 1,5 h bei 0,013 M lag. Die Isopropanolkonzentration im Zulauf betrug bei diesem Versuch wie auch bei der Batch-Reaktion 0,4 M, da bei der Verwendung von 0,05 M Isopropanol keine vollständiger Umsatz festgestellt werden konnte.

Die Umsätze innerhalb der kontinuierlichen Reaktion sind in Abbildung 3.25 ersichtlich. Während der Biotransformation war eine drastische Abnahme des Umsatzes festzustellen. Ausgehend von 100 % Umsatz nach 5 Verweilzeiten betrug dieser nach 2 Tagen Reaktionszeit nur noch 1,5 %.

Gleichzeitig konnte, wie in Abbildung 3.26 zu erkennen ist, eine rapide Abnahme der intrazellulären Cofaktorkonzentration beobachtet werden. Die intrazelluläre Konzentration der Cofaktoren (NADP(H)) nahm dabei innerhalb von zwei Tagen um > 90 % ab. Die Abnahme des oxidierten Cofaktors erfolgte dabei etwas schneller als die Abnahme des reduzierten Cofaktors.



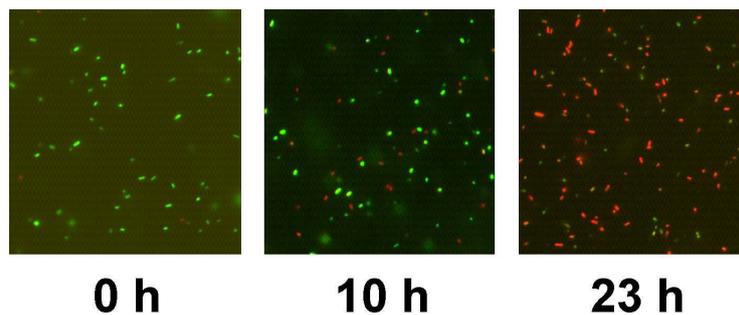
**Abbildung 3.25:** Umsätze innerhalb der kontinuierlichen Ganzzellbiotransformation von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat;  
 100 g<sub>BFM</sub>/L in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,9, 0,01 M (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat und 0,4 M Isopropanol im Zulauf, Verweilzeit von 2 h, Reaktionsvolumen 200 mL, Reaktionstemperatur 25 °C, Bestimmung des Umsatzes aus 1 mL Probe nach Extraktion mit Ethylacetat und Analyse mittels GC.



**Abbildung 3.26:** Intrazelluläre Cofaktorkonzentrationen bei der kontinuierlichen Umsetzung von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat;  
 100 g<sub>BFM</sub>/L in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,9, 0,01 M (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat und 0,4 M Isopropanol im Zulauf, Verweilzeit von 2 h, Reaktionsvolumen 200 mL, Reaktionstemperatur 25 °C, Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentration aus 5 mL Probe nach Probenaufarbeitung mittels LC-MS/MS.

Auf Grund der kontinuierlichen Reduktion von oxidiertem Cofaktor durch die *Lb*ADH-katalysierte Umsetzung von Isopropanol kann es während der Reaktion zu einer Kompensation des Verlustes an reduziertem Cofaktor zu Lasten des oxidierten Cofaktorpools kommen. So erklärt sich auch die schnellere Abnahme des oxidierten Cofaktorpools. Die Ergebnisse zeigen, dass das Ganzzellsystem nicht stabil ist und die Cofaktoren aus dem System ausgewaschen werden. Hierfür kann nach den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Vorarbeiten mit dem ADH/ADH-System nicht allein das Isopropanol verantwortlich sein. Dies lässt vermuten, dass entweder das Substrat (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat oder das Produkt desintegrierend auf die Zellen wirkt.

Um die Zellintegrität über den Verlauf der Reaktion näher ermitteln zu können, erfolgte eine Fluoreszenzfärbung der Zellen mit SYTO 9 und Propidiumiodid. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.27 dargestellt.



**Abbildung 3.27:** Beeinflussung der Zellintegrität innerhalb der kontinuierlichen Umsetzung von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat; 100  $g_{BFM}/L$  in 50 mM Phosphatpuffer mit pH 6,9, 0,01 M (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat und 0,4 M Isopropanol im Zulauf, Verweilzeit von 2 h, Reaktionsvolumen 200 mL, Reaktionstemperatur 25 °C, Färben der Zellen mit SYTO 9 und Propidiumiodid zu den einzelnen Zeitpunkten, Visualisierung der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm im Fluoreszenzmikroskop bei einer 1000fachen Gesamtvergrößerung.

In Abbildung 3.27 ist eine deutliche Beeinflussung der Zellintegrität über einen Zeitraum von 23 h zu erkennen. Ausgehend von nahezu 100 % intakten Zellen zu Beginn des Versuchs, waren nach 10 h Reaktionszeit bereits ca. 50 % der Zellen permeabilisiert. Nach 23 h Reaktionszeit betrug der Anteil an intakten Zellen nur noch ca. 10 %. Es wird deutlich, dass die Beeinflussung der Zellen dabei nicht nur von der

Quantität der organischen Komponenten im System abhängt, sondern auch von deren Qualität. So waren die Konzentrationen an organischen Substanzen bei der kontinuierlichen Umsetzung mit dem ADH/ADH-System um einen Faktor von 1,9-2,4 höher und die Abnahme der intrazellulären Cofaktoren erfolgte mit einer Halbwertszeit von ca. 2,5 Tagen deutlich langsamer. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das Substrat oder das Produkt im ER/*Lb*ADH-System stark zellschädigend wirkt.

Wie aus den Versuchen hervorgeht, werden die Zellen in diesem System sehr stark permeabilisiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss auf die Verfügbarkeit der Cofaktoren durch Permeabilisierung bei diesem System überwiegt und die Aktivität des enzymatischen Hintergrundes der Zellen nur zu einem geringen Anteil an der Abnahme der Cofaktoren beteiligt ist.

Da die Cofaktorregenerierung Enzym-gekoppelt erfolgte, hat der Verlust an intrazellulärem Cofaktor einen direkten Einfluss auf die Effektivität der Cofaktorregenerierung. So kann der Cofaktor nicht, wie bei der Substrat-gekoppelten Regenerierung, direkt am Arbeitsenzym regeneriert werden. Für eine Enzym-gekoppelte Regenerierung muss der Cofaktor vom Enzym weg diffundieren, um am Regenerierungsenzym reduziert werden zu können. Bei einer Abnahme der Konzentration verringert sich somit auch die Transferrate zwischen dem Arbeitsenzym und dem Regenerierungsenzym. Das hat gleichzeitig zur Folge, dass sich die Effizienz der Cofaktorregenerierung verringert und somit der erhaltene Umsatz sinkt.

Bei Schroer *et al.* (2007a) konnte eine analoge Entwicklung innerhalb einer kontinuierlichen Ganzzellbiotransformation mit Enzym-gekoppelter Cofaktorregenerierung festgestellt werden. Es erfolgte hier die Regenerierung des Cofaktors bei einer *Lb*ADH-katalysierten Reaktion mit einer Glukosedehydrogenase. Innerhalb dieser Reaktion konnte eine Abnahme des Umsatzes bereits nach einem Tag festgestellt werden, wobei die verwendete Menge an organischem Substrat mit 0,04 M Methyla-

cetoacetat vergleichsweise gering war. Wie gezeigt werden konnte, besitzen die intrazellulären Cofaktoren bei der Verwendung von ruhenden Zellen je nach Reaktionsbedingungen eine Halbwertszeit von 1-3 Tagen. Somit kann bei der beschriebenen Reaktion davon ausgegangen werden, dass es zu einer gewissen Abnahme der intrazellulären Cofaktoren kam. Im Vergleich dazu konnte die kontinuierliche Reaktion mit einer Substrat-gekoppelten Regenerierung ohne Umsatzeinbußen über einen deutlich längeren Zeitraum betrieben werden. Demzufolge ist der Verlust an intrazellulären Cofaktoren bei einer Enzym-gekoppelten Regenerierung wesentlich folgenreicher für das Gesamtsystem als dies bei einer Substrat-gekoppelten Cofaktoregenerierung der Fall ist.

### 3.6.5 Zusammenfassung

Durch die erzielten Umsätze innerhalb der Ganzzellbiotransformation von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat im Satzverfahren konnte die Etablierung der ER-katalysierten Reaktion in Verbindung mit der *LbADH* für die Cofaktoregenerierung als erfolgreich angesehen werden. Wobei es durch die Zellmembranen nicht zu einer Diffusionsbehinderung der Substrate kam, da die Reaktionszeit und die erreichten Umsätze vergleichbar waren zur Reaktion mit den isolierten Enzymen.

Innerhalb der Reaktion im Satzverfahren konnte über 8 h ein Verlust an intrazellulärem NADP(H) von ca. 30 % beobachtet werden. Dabei nahm die intrazelluläre Cofaktorkonzentration nicht wie bei den deutlich höheren Substratkonzentrationen im ADH/ADH-System als initialer Effekt nach Zugabe der Substrate (insbesondere des Isopropanols) ab, sondern kontinuierlich über den gesamten Verlauf der Reaktion. Eine Limitierung auf Grund des Cofaktors konnte innerhalb der Reaktion nicht festgestellt werden. Da es auch nicht zu einer vergleichsweise höheren Abnahme des reduzierten Cofaktors kam, konnte davon ausgegangen werden, dass die Cofaktoregenerierung durch *LbADH* effektiv erfolgte.

Bei der kontinuierlichen Ganzzellbiotransformation wurde nach 5 Verweilzeiten ein Umsatz von 100 % ermittelt. Über die Reaktionszeit (2 Tage) fiel der Umsatz jedoch soweit ab, dass die Reaktion fast vollständig zum Erliegen kam. Gleichzeitig konnte während der Reaktion eine fast vollständige Abnahme der intrazellulären NADP(H)-Konzentration ermittelt werden. Für die Enzym-gekoppelte Cofaktorre-generierung in Ganzzellbiotransformationen hat die Verfügbarkeit der intrazellulären Cofaktoren einen deutlich höheren Einfluss auf die Reaktion, als bei Substrat-gekoppelten Biotransformationen. Dies kann durch die Ergebnisse bei Schroer *et al.* (2007a) bestätigt werden. Die Ursache für den vergleichsweise schnellen Verlust der Cofaktoren kann dabei hauptsächlich in der Permeabilisierung der Zellen gesehen werden, die trotz vergleichsweise geringer Konzentrationen an organischen Substraten nach 23 h Reaktionszeit fast vollständig permeabilisiert waren.

Wie auch für das ADH/ADH-System konnte die Ganzzellbiotransformation im Satzverfahren als die geeignetere Methode für die Umsetzung von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat hinsichtlich der Verfügbarkeit der intrazellulären Cofaktoren identifiziert werden.

## 4 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die intrazellulären Nicotinamid-Cofaktoren hinsichtlich ihrer Verfügbarkeit und Stabilität bei Ganzzellbiotransformationen näher zu charakterisieren und die eventuell dadurch begründeten Limitationen von Biotransformationen mit ruhenden Zellen zu identifizieren. Dafür wurden zwei Reaktionssysteme mit einer Substrat-gekoppelten und mit einer Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierung näher betrachtet. Bei der Ganzzellbiotransformation mit der Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung handelte es sich um ein bereits reaktionstechnisch bekanntes System mit einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*. Das zweite Reaktionssystem mit einer Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierung musste hingegen als Ganzzellbiotransformation erst etabliert werden. Innerhalb dieses Systems sollte eine Enreduktase-katalysierte Reaktion in Verbindung mit der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* zur Cofaktorregenerierung eingesetzt werden. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind im Folgenden zusammengefasst:

### Cofaktoranalytik

- Mit der LC-MS/MS-Methode aus der Arbeitsgruppe Bioprozesse und Bioanalytik des IBG-1: Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH konnten die Cofaktoren in Verbindung mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Cofaktoren innerhalb der Ganzzellbiotransformation routinemäßig erfasst werden, ohne dass die Cofaktoren innerhalb der Probenaufarbeitung beeinträchtigt wurden und Matrixeffekte näher betrachtet werden mussten. So können alle entscheidenden Parameter bei

Ganzzellbiotransformationen analytisch erfasst werden.

## Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung

- Innerhalb der kontinuierlichen Ganzzellbiotransformation konnte gezeigt werden, dass trotz einer stetigen Abnahme der intrazellulären Cofaktoren hohe Umsätze von > 80 % bis zu einem Level von 15-20 % der ursprünglichen Cofaktorkonzentration möglich sind.
- Im Satzverfahren konnte die Beeinflussung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen durch die Anpassung der verwendeten Cosubstratkonzentrationen aufgehoben werden. Es konnte durch die Visualisierung der Zellintegrität mittels Fluoreszenzfärbung auch deutlich gemacht werden, in wie weit die Zellintegrität durch das für die Cofaktorregenerierung verwendete Isopropanol beeinflusst wurde.
- Kürzere Reaktionszeiten erwiesen sich als vorteilhaft, um die Degradation der intrazellulären Cofaktoren, bedingt durch den enzymatischen Hintergrund der Zellen, zu umgehen.
- Auf Grund der effektiven Cofaktorregenerierung, die auch bei einem geringen Cofaktorlevel abläuft, können gewisse Verluste an intrazellulärem Cofaktor bei diesem System akzeptiert werden, um mit höheren Substratkonzentrationen höhere Umsätze erzielen zu können.

## Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung

- Die Etablierung der Enreduktase-katalysierten Ganzzellbiotransformation konnte erfolgreich durchgeführt werden, mit einem vergleichbaren Umsatz und

einer vergleichbaren Reaktionsgeschwindigkeit in Bezug auf die Reaktion mit isolierten Enzymen.

- Bei der Ganzzellbiotransformation im Satzverfahren konnte keine Limitierung der Reaktion durch die intrazellulären Cofaktoren festgestellt werden.
- Durch die vergleichsweise schnelle Abnahme der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen bei der kontinuierlichen Umsetzung und die damit verbundenen Umsatzeinbußen konnte gezeigt werden, dass diese Reaktionsführung für die Enreduktase-katalysierte Ganzzellbiotransformation nur bedingt geeignet war.
- Mit Hilfe der Visualisierung der Zellintegrität durch Fluoreszenzfärbung konnte innerhalb der kontinuierlichen Reaktion gezeigt werden, dass die Zellintegrität nicht nur von der Quantität sondern auch ganz entscheidend von der Qualität der verwendeten organischen Substrate bzw. Produkte abhängt.
- Die Ergebnisse zeigten, dass die Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung deutlich stärker bezüglich ihrer Effektivität auf den Verlust von intrazellulären Cofaktoren reagiert, als dies bei der Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung der Fall ist. Darum sollte die Cofaktorregenerierung wenn möglich Substrat-gekoppelt erfolgen bzw. statt kontinuierlicher Reaktionen die Umsetzungen im Satzverfahren durchgeführt werden.

## 5 Ausblick

Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, in wie weit die intrazellulären Cofaktorkonzentrationen durch den enzymatischen Hintergrund der Ganzzellbiokatalysatoren und die organischen Komponenten in der Reaktion beeinflusst werden. Dabei wäre es im Weiteren notwendig, die Verfügbarkeit der Cofaktoren vor allem bei längere Prozesszeiten zu erhöhen.

Bei Biotransformationen mit ruhenden Zellen können die regenerativen Eigenschaften von Mikroorganismen nicht ausgenutzt werden. Eine Erhöhung der Verfügbarkeit der Cofaktoren für die Biokatalyse wäre somit nur durch die Erhöhung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen oder durch höhere Biokatalysatorkonzentrationen möglich. Beides würde eine Abnahme der Cofaktorkonzentrationen über längere Zeiträume jedoch nicht verhindern. Alternativ dazu können bei Biotransformationen mit wachsenden Zellen die regenerativen Eigenschaften der Zellen ausgenutzt werden, so dass längere Prozesszeiten ermöglicht werden könnten. Die Verluste an intrazellulären Cofaktoren könnten so durch die Stoffwechselaktivitäten der Zellen ausgeglichen werden.

Im Gegensatz zur Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung kommt es bei der Enzym-gekoppelten Regenerierung zu einer Beeinflussung der Transferraten der Cofaktoren zwischen den Enzymen bei abnehmenden Cofaktorkonzentrationen. Um diesem Einfluss vorzubeugen, würde sich eine räumliche Fixierung beider Enzyme durch einen Linker anbieten, so dass bei geringeren Cofaktorkonzentrationen die Ef-

fektivität der Regenerierung und somit der mögliche Umsatz erhöht werden kann.

Wie gezeigt werden konnte, ist die Effektivität bei der Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung deutlich höher als bei der Enzym-gekoppelten Regenerierung, da der Cofaktor direkt am Enzym regeneriert werden kann. Durch eine Erhöhung der Affinität des Enzyms bezüglich der Cofaktoren mit Hilfe eines gezielten Protein Engineering könnte das Abdiffundieren des Cofaktors vom Enzym bei Substrat-gekoppelten Systemen herabgesetzt werden. So könnte die Effektivität der Cofaktorregenerierung auch noch bei sehr geringen Cofaktorkonzentrationen aufrecht erhalten werden.

Wie in dieser Arbeit festgestellt werden konnte, haben organische Substanzen einen sehr unterschiedlichen Einfluss auf die Zellintegrität. Mit der verwendeten Fluoreszenzfärbung könnte ohne einen großen Einsatz von Substraten bzw. Zellen bereits in einem sehr frühen Stadium der Prozessentwicklung entschieden werden, ob sich der Einsatz von ruhenden Zellen als Katalysator für eine mögliche Biotransformation lohnt. So können unnötige Kosten bei geplanten großtechnischen Anwendungen von Anfang an vermieden werden.

# 6 Materialien und Methoden

## 6.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von der Firma Sigma-Aldrich Co. (Deutschland) oder Carl Roth GmbH & Co. KG (Deutschland) erworben.

## 6.2 Verwendete Geräte

<b>Hersteller</b>	<b>Gerät</b>
Agilent Technologies Deutschland GmbH, Deutschland	Gaschromatograph, 6890 Series
Amicon GmbH, Deutschland Applied Biosystems, USA	Ultrafiltrationszelle, Amicon 8200 API 4000 Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer
Beckmann Coulter, USA	Zentrifugen: Allegra 64R, Avnati J20 XP Rotoren: C0650, JA10, JA14
Bioengineering AG, Schweiz Biometra GmbH, Deutschland	Laborfermentersystem Typ L 1523 PCR-Cycler TProfessional Thermocycler
Branson Ultrasonics Corporation, USA	Ultraschallauschluss Digital Sonifier
Broadley James Corporation, USA	pH-Elektrode
Bruker BioSpin GmbH, Deutschland	NMR-Spektrometer ARX 300

<b>Hersteller</b>	<b>Gerät</b>
Büchi, Schweiz	Rotationsverdampfer Rotavapour R-114 Vakuumpumpe Vac V-513
Consort nv, Belgien CTC Analytics AG, Schweiz DASGIP AG, Deutschland	Spannungsquelle E831 Autosampler CombiPal Parallel Bioreactor System (4 x 0,3 L) Agatations- und Temperierungsmodul FB04TCSC Monitoringsystem FB04PH4PO4L Gasmischsystem FB08MX44 Dosierpumpensystem FB08MP8
Dionex Corporation, USA	Autosampler Gina50 Pumpe P680 Detektor UVD170U
Eppendorf AG, Deutschland	Zentrifuge 5415 D Thermomixer comfort
Fedegari Autoclavi SPA, Italien GE-Healthcare BioSciences, AB Europe GmbH, Deutschland Heraeus, Deutschland	Autoklav 4507 E Chromatographiesystem Äktapurifier 10 Trockenschrank T6030 Sterilwerkbank HERASafe 1540V10
Heidolph GmbH & Co. KG, Deutschland Infors HT , Schweiz Jasco GmbH, Deutschland	Überkopfschüttler REAX 2 Schüttler Multitron Standard Autosampler AS X-LC Säulenofen CO-2067 Pumpe X-LC 3185 PU
Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Deutschland Martin Christ GmbH, Deutsch- land Metrohm GmbH, Deutschland Mettler Toledo, Deutschland New Brunswick Scientific, USA PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland Nikon Instruments Europe B.V., Deutschland Peter Huber Kältemaschinen- bau GmbH, Deutschland Pharmacia, Schweden	Thermostat RC6CS Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 pH Meter 632 pH Elektroden Tiefkühltruhe C660 Geldokumentationssystem E-Box Nikon inverted microscope Eclipse Ti Thermostat CC 505
Sartorius AG, Deutschland Schleicher & Schuell GmbH, Deutschland	Wechselkolbenpumpe P500 Fraktionssammler SuperFrac Waagen CPA225D, BP2100S Filtrationsmodul ULTRAN-Lab (10 kD)

**Hersteller**

**Gerät**

Schärfe System GmbH,  
Deutschland

Scientific Industries Inc., USA  
Shimadzu, Deutschland

Systech GmbH, Deutschland  
Vacuubrand, Deutschland  
Varian Inc., USA

Watson-Marlow Inc., USA

Zellzählgerät Casy1

Vortex Genie 2  
Photometer PharmaSpec UV 1700  
Thermostat CPS 240 A

Autoklav  
Membranpumpe MZ 2C  
Gaschromatograph CPS 3860  
Massenspektrometer Saturn 2000  
Peristaltikpumpen 501U, 504U, 505U

## 6.3 Verwendete Materialien

Hersteller	Material
Beckmann Coulter, USA	Zentrifugenbecher: 250 mL, 500 mL
Brand GmbH & Co. KG, Deutschland	Küvetten, PMMA Semi Mikroküvetten
Diacel Chemical Industries LTD, Frankreich	Chromatographiesäule ChiralPak IC
GE-Healthcare BioSciences, AB Europe GmbH, Deutschland	Chromatographiesäulen XK 50 HiPrep 16/10 QFF
Glaswerkstatt FZ-Jülich, Deutschland	Chromatographiesäulen Doppelmantelkolben 25 - 1000 mL
Greiner Bio-One GmbH, Deutschland	Zentrifugenröhrchen 15 - 50 mL
Invitrogen, USA	Elektrophoresekammer Novex Mini-Cell
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland	Chromatographiesäulen Carbowax 6 Permabond 20M-Säule
Millipore, USA	Ultrafiltrationsmembran (30 kDa cut-off) 500 mL Amicon <sup>®</sup> -Zelle
Pall GmbH, Deutschland	Sterilfilter (0,2 $\mu$ m) Crossflow Ultrafiltrationsmodul
Phenomenex Inc., Deutschland	Synergie Fusion RP 150 mm x 2 mm, 4 Å 80 $\mu$ m Polar Embedded C18 4 x 2.0 mm
Schleicher & Schuell GmbH, Deutschland	Filtrationsmodul ULTRAN-Lab (10 kD)
Thermo Fisher Scientific, Dänemark	Cryogefäße 2 mL
Varian Inc., USA	GC-Säule SIL 8 MP5 30 m, 0,32 mm ID
VWR International GmbH, Deutschland	Gelkammer

## 6.4 Biologische Materialien

### 6.4.1 Verwendete Plasmide

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmide verwendet:

pBTac-*Lbadh*, (pBtac Derivat, *lbadh*, *Amp<sup>R</sup>*, *P<sub>tac</sub>*, *lacI*), Dr. S. Lütz, Arbeitsgruppe Biokatalyse, Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich GmbH

pCDF-Duet1, (*lacI*, *Sm<sup>R</sup>*, *2xP<sub>T7</sub>*), erworben bei Merck Chemicals Ltd., UK

pCDF-Duet-OYE-*Lbadh*, (pCDF-Duet1 Derivat, *oye*, *lbadh*), eigene Arbeit

pET3b-OYE, (pET3b Derivat, *oye*, *Amp<sup>R</sup>*, *P<sub>T7</sub>*, *lacI*), Prof. Dr. J. D. Stewart, Departments of Chemistry and Biomedical Engineering, University of Florida, USA

Die vollständigen Sequenzen des *lbadh*- und *oye*-Gens sind im Anhang unter 7.1 aufgeführt.

### 6.4.2 Verwendete Stämme

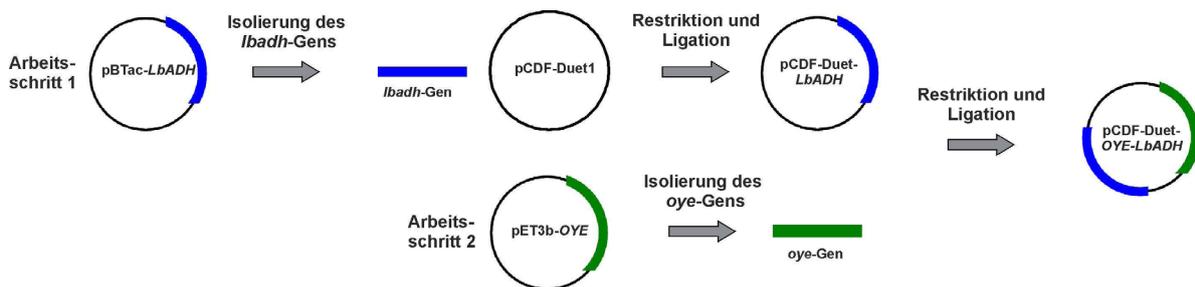
Für die Ganzzellbiotransformationen und die Produktion der ER wurde folgender *Escherichia coli* - Stamm genutzt:

*E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (*F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm rne131 (DE3)* (Invitrogen, USA)

Für die Ganzzelltransformationen wurde *E. coli* BL21\* (DE3) mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert, für das ADH/ADH-System mit pBTac-*LbADH* (*E. coli* *LbADH*) und für das ER/ADH-System mit pCDF-Duet-*OYE-LbADH* (*E. coli* ER-*LbADH*). Für die Charakterisierung der ER wurde diese mit durch pET3b-*OYE* transformierte *E. coli* BL21\* (DE3) (*E. coli* ER) produziert.

### 6.4.3 Klonierung des pCDF-Duet-*OYE-LbADH*-Plasmids

Die Klonierung des pCDF-Duet-*OYE-LbADH*-Plasmids wurde ausgehend vom pBTac-*LbADH*-Plasmid und dem pET3b-*OYE*-Plasmid in zwei Arbeitsschritten durchgeführt. Dabei erfolgte erst die Klonierung des *lbadh*-Gens in den Vektor gefolgt vom *oye*-Gen im zweiten Arbeitsschritt. Die schematische Übersicht über die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 6.1 dargestellt.



**Abbildung 6.1:** Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des pCDF-Duet-*OYE-LbADH*-Plasmids.

#### 6.4.3.1 Klonierung des *lbadh*-Gens und des *oye*-Gens

Für die Isolierung des pBTac-*LbADH*-Plasmides und des pET3b-*OYE*-Plasmids wurden jeweils zweimal 50 mL LB-Medium (Tabelle 6.1, pH 7) mit 50  $\mu$ L Kryokultur des entsprechenden rekombinanten *E. coli* angeimpft. Die Kultivierung erfolgte in einem 250 mL Erlenmeyerkolben bei 37 °C über 16 h.

**Tabelle 6.1:** Zusammensetzung des LB-Mediums (Luria Bertani) bzw. LB-Agars bei Zusatz von Agar-Agar zum Medium.

Komponente	Konzentration [g/L]
Pepton	10,0
Hefeextrakt	5,0
Natriumchlorid	10,0
Agar-Agar	5

Die Isolierung der Plasmide erfolgte nach Herstellerangaben mit einem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Deutschland).

Für die Isolierung des *lbadh*-Gens aus dem pBTac-*LbADH*-Plasmid und des *oye*-Gens aus dem pET3b-*OYE*-Plasmid mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) wurden folgende Primer (Eurofins MWG Operon, Deutschland) verwendet:

NcoI\_LbADH 5'-ATA CCA TGG ATG TCT AAC GCT TTG GAT GGT-3'

EcoRI\_LbADH 3'-CCG ATG TGA CGA GTT ATC ATT CTT AAG ATA-5'

NdeI\_OYE 5'-ATA CAT ATG ATG TCA TTT GTA AAA GAT TTT-3'

BglII\_OYE 3'-AAT CCG ACC CTG TTT TTC ATT TCT AGA ATA-5'

Die Schmelztemperaturen und der GC-Gehalt der Primer sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst.

**Tabelle 6.2:** Schmelztemperatur und GC-Gehalt der verwendeten Primer.

<b>Primer</b>	<b>Schmelztemperatur [°C]</b>	<b>GC-Gehalt [%]</b>
NcoI_LbADH	65,4	43,3
EcoRI_LbADH	62,7	36,7
NdeI_OYE	55,8	20,0
BglIII_OYE	61,3	33,3

Die anschließenden PCR's wurden mit der in Tabelle 6.3 angegebenen Zusammensetzung durchgeführt.

**Tabelle 6.3:** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Isolierung des *lbadh*- und *oye*-Gens.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>L]</b>	
	<b><i>lbadh</i>-Gen</b>	<b><i>oye</i>-Gen</b>
Steriles bidest. Wasser	29,5	29,5
dNTP-Mix 10 mM	1,0	1,0
NcoI Primer / NdeI Primer	2,5	2,5
EcoRI Primer / BglIII primer	2,5	2,5
DNA (206 ng/ $\mu$ L pbTAC- <i>LbADH</i> ) (124,5 ng/ $\mu$ L pET3b- <i>OYE</i> )	2,5	2,5
DMSO	1,5	1,5
Phusion <sup>TM</sup> DNA Polymerase (Phusion <sup>TM</sup> -Polymerase, Finnzymes OY, Finnland)	0,5	0,5

Die PCR's wurden mit den in Tabelle 6.4 zusammengefassten Temperaturen und Zeiten durchgeführt, wobei die Schritte 2-4 dreißigmal wiederholt wurden.

**Tabelle 6.4:** Schritte und Bedingungen der PCR für die Amplifikation des *lbadh*- und *oye*-Gens.

Schritt	Temperatur [°C]		Zeit [sec]
	<i>lbadh</i> -Gen	<i>oye</i> -Gen	
1 Initiale Denaturierung	98	98	30,0
2 Denaturierung	98	98	10,0
3 Anlagerung	60	52	30,0
4 Kettenverlängerung	72	72	15,0
5 Finale Kettenverlängerung	72	72	300,0

Die Produkte der PCR's wurden über ein präperatives Agarosegel (1 % Agarose) aufgereinigt (Abschnitt 6.4.3.2), aus dem Gel isoliert und nach der Restriktion (Enzyme und Puffer von Fermentas GmbH, Deutschland) für die Ligation mit dem pCDF-Duet-Vektor verwendet. Die Zusammensetzungen für den Verdau der PCR-Produkte und des pCDF-Duet-Vektors innerhalb des ersten Arbeitsschrittes sind in Tabelle 6.5 ersichtlich, der Verdau erfolgte bei 37 °C für 20 min. Die Zusammensetzungen für den Verdau der PCR-Produkte und des pCDF-Duet-*LbADH*-Vektors innerhalb des zweiten Arbeitsschrittes sind in Tabelle 6.6 ersichtlich, der Verdau erfolgte bei 37 °C für 20 min.

**Tabelle 6.5:** Zusammensetzung der Restriktionsverdau des PCR-Produkts aus der Amplifikation des *lbadh*-Gens und des Vektors.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen <i>lbadh</i> [<math>\mu</math>L]</b>	<b>Volumen pCDF-Duet [<math>\mu</math>L]</b>
Steriles bidest. Wasser	22,0	10,5
10 x FD Puffer	2	2
DNA (45 ng/ $\mu$ L <i>lbadh</i> ) (177 ng/ $\mu$ L pCDF- Duet-1)	4	5,5
FD NcoI	1	1
FD EcoRI (Fermentas GmbH, Deutschland)	1	1

**Tabelle 6.6:** Zusammensetzung des Restriktionsverbaus des PCR-Produkts aus der Amplifikation des *oye*-Gens und des pCDF-Duet-*LbADH* Plasmids.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen <i>oye</i> [<math>\mu</math>L]</b>	<b>Volumen Plasmid [<math>\mu</math>L]</b>
Steriles bidest. Wasser	19,5	12,55
10 x FD Puffer	2	2
DNA (6,2 ng/ $\mu$ L <i>oye</i> ) (288 ng/ $\mu$ L pCDF- Duet- <i>LbAH</i> )	6,5	3,45
FD NcoI	1	1
FD EcoRI (Fermentas GmbH, Deutschland)	1	1

Nach dem Restriktionsverdau erfolgte die Aufreinigung der Produkte nach Herstellerangaben mit einem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Deutschland).

Die Ligationen mit dem pCDF-Duet-Vektor erfolgten mit einem Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Deutschland) und wurden bei 25 °C für 30 min durchgeführt.

Für die Transformationen wurden 2  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Ligaseansatzes zu 40  $\mu\text{L}$  chemisch kompetenten *E. coli* BL21\* (DE3) (Invitrogen, Carlsberg, USA) gegeben, die Zellen wurden anschließend nach dem Schema in Tabelle 6.7 behandelt.

**Tabelle 6.7:** Transformation von *E. coli* BL21\* (DE3) mit dem pCDF-Duet-*LbADH*-Plasmid bzw. mit dem pCDF-Duet-*LbADH-OYE*-Plasmid.

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Reaktionsbedingungen</b>
Plasmidaufnahme	50 min bei 4 °C
Nuklease Inaktivierung	90 sec bei 42 °C
Plasmidaufnahme	5 min bei 4 °C
Revitalisierung der Zellen	Zusatz von 500 $\mu\text{L}$ LB-Medium (Antibiotika frei) Inkubation für 1 h bei 37 °C unter Schütteln bei 300 rpm

Für die Isolierung der positiven Klone wurden 100  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension auf LB-Agar (Tabelle 6.1) mit 50 mg/L Streptomycin ausplattiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert.

Die positiven Klone aus den Transformationen wurden mit einer sterilen 200  $\mu\text{L}$  Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen und in 50 mL LB-Medium (Tabelle 6.1, pH 7) im 250 mL Erlenmeyerkolben für 18 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Inkubieren wurden die 50 mL Kulturen mit 50 mL sterilem Glycerin versetzt und als 1,6 mL Aliquots in Kryovials bei -80 °C gelagert.

### 6.4.3.2 Präperative Agarosegele

Die Isolierung der PCR-Produkte aus den Reaktionsansätzen erfolgte über präperative Agarosegele, mit einer Agarosekonzentration von 1 % (w/w). Dabei erfolgten das Ansetzen der Agarose und die Elektrophorese mit TAE-Puffer (Tabelle 6.8, pH 8,0). Die Elektrophorese wurde bei 90 mA durchgeführt, wobei die vollständige Auftragung des jeweiligen PCR-Ansatzes erfolgte. Nach der Trennung wurde die DNA aus dem Gel ausgeschnitten und mit einem Fertigkit isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen GmbH, Deutschland)

**Tabelle 6.8:** Zusammensetzung des TAE-Puffers pH 8,0.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
Tris-Base	4,84 g/L
Essigsäure	1,14 mL/L
0,5 M EDTA-Lösung	2 mL/L

## 6.5 Expressionsoptimierung für das ER/ADH-System

Die Expression für das ER/ADH-Ganzzellsystem erfolgte in TB-Medium (Tabelle 6.9, pH 7) und wurde hinsichtlich des Induktionszeitpunktes, der Kultivierungstemperatur und der Induktorkonzentration (IPTG) optimiert.

**Tabelle 6.9:** Zusammensetzung des TB-Mediums (Terrific Broth).

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration [g/L]</b>
Pepton	12,0
Hefeextrakt	24,0
Kaliumdihydrogenphosphat	2,1
Dikaliumhydrogenphosphat	12,5
Glycerin	4,0

Die Kultivierungen erfolgten in einem Maßstab von 200 mL mit einer Parallelfertigungsanlage der Firma DASGIP AG, Deutschland, welche in Abbildung 6.2 dargestellt ist.



**Abbildung 6.2:** Parallelfertigungsanlage der Firma DASGIP AG.

Vor der Inokulierung der Vorkultur erfolgte die sterile Zugabe von Glycerin und Streptomycin ( $50 \text{ mg/L}_{\text{Medium}}$ ) zum Medium. Für die Vorkulturen wurden 50 mL des Mediums mit  $100 \mu\text{L}$  Kryokultur inokuliert und die Kulturen in 250 mL Erlenmeyerkolben bei  $37^\circ\text{C}$  und 150 rpm über 16 h kultiviert.

Für die Hauptkulturen erfolgte vor der Sterilisation der Reaktoren die Kalibration der pH-Sonden bei pH 7 und pH 4. Im Anschluss wurden die Reaktoren im leeren Zustand sterilisiert. Nach dem Abkühlen der Reaktoren erfolgte das Befüllen dieser mit 190 mL Medium, welches zuvor mit Glycerin und Streptomycin ( $50 \text{ mg/L}_{\text{Medium}}$ ) und  $100 \mu\text{L}$  Antischaum versetzt wurde. Nach dem Befüllen wurden die Reaktoren mit der Peripherie der Anlage verbunden und die  $\text{pO}_2$ -Sonde für mindestens 6 h polarisiert. Danach erfolgte die Kalibrierung der  $\text{pO}_2$ -Sonde bei 0 % und 100 % Gelöstsauerstoff. Nach der Kalibration wurden die Reaktoren mit 10 mL Vorkultur inokuliert. Bis zur Induktion der Enzymexpression wurden die Kultivierungen mit den in Tabelle 6.10 zusammengefassten Prozessparametern durchgeführt.

**Tabelle 6.10:** Zusammenfassung der Prozessparameter bei der Kultivierung im Reaktor vor der Induktion.

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Temperatur	37 °C
pH-Wert	7
pO <sub>2</sub> -Wert	≥ 40 %
Rührerdrehzahl	400 - 1200 rpm
Begasungsrate	6 - 18 NL/h
Sauerstoffanteil in der Zuluft	21 - 50 %

Der pH-Wert wurde bei der Kultivierung durch 25 % Phosphorsäure und 6 M Natriumlauge auf pH 7 reguliert. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde während der Fermentation auf einen Wert  $\geq 40\%$  durch eine automatische Regelkaskade geregelt, bestehend aus Rührerdrehzahl, Begasungsrate und Sauerstoffanteil in der Zuluft.

Für die Optimierung wurden die in Tabelle 6.11 angegebenen Parameter eingestellt und die Kultivierung über eine Gesamtdauer von 24 h fortgeführt.

**Tabelle 6.11:** Parameter für die Expressionsoptimierung des ER/ADH-Systems während der Expression.

<b>Temperatur nach Induktion [°C]</b>	<b>Induktor- konzentration [mM]</b>	<b>Optische Dichte bei Induktion [-]</b>
32	0,2	20
32	0,5	20
32	0,2	3
32	0,4	3
27	0,2	3
27	0,4	20

Die Quantifizierung der intrazellulären Enzymaktivität erfolgte wie unter 6.12.2.6 beschrieben.

## 6.6 Herstellung der Ganzzellbiokatalysatoren

Die Herstellung der Ganzzellbiokatalysatoren erfolgte mit TB-Medium (Tabelle 6.9, pH 7,0). Das Medium wurde vor dem Inokulieren steril mit Antibiotika versetzt (ADH/ADH-System: Carbenicillin, ER/ADH-System: Streptomycin), so dass die Antibiotikakonzentration im Medium 50 mg/L betrug. Des Weiteren wurde das Glycerin vor dem Animpfen separat zum Medium ergänzt.

Die Vorkultur von 2 x 250 mL wurde mit jeweils 100  $\mu$ L der entsprechenden Krokultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte in zwei 1000 mL Erlenmeyerkolben bei 150 rpm und 37 °C über 18 h.

Die Hauptkultur erfolgte in einem Bioreaktor mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 7,5 L (Laborbioreaktorsystem Typ L1523, Bioengineering AG, Schweiz), welcher in Abbildung 6.3 dargestellt ist. Vor der Sterilisation des Bioreaktors erfolgte die Kalibration der pH-Sonde bei pH 7 und pH 4. Im Anschluss wurde der Reaktor mit 5 L Leitungswasser gefüllt und bei 122 °C und 1,2 bar Überdruck für 30 min sterilisiert.



**Abbildung 6.3:** Laborfermenter L1523 der Firma Bioengineering AG.

Das Medium wurde so konzentriert, dass das fehlende Volumen zu 5 L Kultivierungsvolumen durch die Zugabe von Antibiotika, Glycerin und die Vorkultur ergänzt wurde. Die Sterilisation des Mediums und des Glycerins (500 mL) erfolgte separat. Direkt vor der Kultivierung wurde der Reaktor mit dem Medium, der Glycerinlösung, der Antibiotikumlösung und 300  $\mu\text{L}$  Antischaum (Antifoam 204, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland) gefüllt. Danach erfolgte die Kalibrierung der  $\text{pO}_2$ -Sonde bei 0 % und 100 % Gelöstsauerstoffkonzentration. Die Inokulation der Hauptkultur wurde mit 500 mL Vorkultur durchgeführt. Der erste Teil der Kultivierung wurde mit den in Tabelle 6.12 aufgeführten Prozessparametern durchgeführt.

**Tabelle 6.12:** Prozessparameter für die Kultivierung der Ganzzellbiokatalysatoren vor der Induktion.

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Temperatur	37 °C
pH-Wert	7
$\text{pO}_2$ -Wert	$\geq 40$ %
Rührerdrehzahl	350 - 1600 rpm
Begasungsrate	2,5 - 10 NL/min

Die pH-Regelung auf pH 7 wurde mit 25 % Ammoniak und 25 % Phosphorsäure durchgeführt. Nachdem die Kultur eine optische Dichte (OD) von 3 ( $\lambda=600$  nm) erreicht hatten, wurde die Temperatur auf 32 °C reduziert und die intrazelluläre Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Hiefür wurde eine IPTG-Konzentration von 0,2 mM im Kulturmedium eingestellt. Die Gesamtdauer der Kultivierung betrug 24 h. Die Prozessanalytik wurde wie unter 6.12.1 beschrieben durchgeführt.

Anschließend wurden die Zellen vom Medium durch Zentrifugation (Avanti J20 XP, Beckmann Coulter, USA) getrennt und im entsprechenden Puffer resuspendiert. Die Biomassekonzentration wurde dabei auf 100  $\text{g}_{\text{BFM}}/\text{L}$  eingestellt. Der gesamte

Ablauf der Kultivierung bis hin zur in Puffer resuspendierten Biomasse ist in Abbildung 6.4 noch einmal schematisch dargestellt.

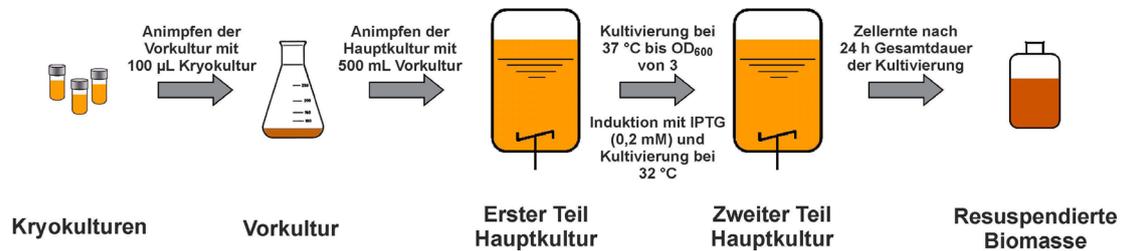


Abbildung 6.4: Schematische Darstellung der Herstellung der Zellen für die Biokatalyse.

## 6.7 Ganzzellbiotransformationen

Alle Ganzzellbiotransformationen wurden mit einer Biomassekonzentration von  $100\text{g}_{BEM}/\text{L}$  in 50 mM Phosphatpuffer durchgeführt.

### 6.7.1 Ermittlung der Cofaktorstabilität ohne den Einfluss von Substraten

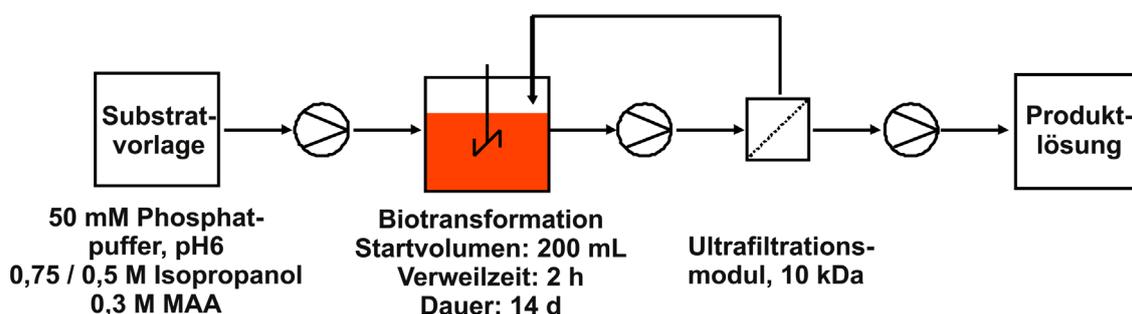
Für die Ermittlung der Cofaktorstabilität wurden Zellen nach der Kultivierung unter sterilen Bedingungen in 50 mL Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6 und 7 resuspendiert und bei 30 °C sowie 4 °C über 10 Tage inkubiert. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Probenahme für die Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen. Die Proben wurden wie unter 6.12.6.2 aufgeschlossen und wie unter 6.12.6.3 vermessen.

## 6.7.2 Ganzzellbiotransformationen mit dem ADH/ADH-System

Die Ganzzellbiotransformationen mit dem ADH/ADH-System erfolgte mit *E. coli*-LbADH. Der pH-Wert während der Reaktion betrug 6,0. Als Substrat wurde Methylacetoacetat eingesetzt, die Cofaktorregenerierung erfolgt Substrat-gekoppelt mit Isopropanol.

### 6.7.2.1 Kontinuierliche Reaktionsführung

Die kontinuierliche Reaktion wurde mit einer Methylacetoacetat-Konzentration von 0,3 M und einer Isopropanolkonzentration von 0,75 M und 0,5 M durchgeführt. Die Reaktionstemperatur betrug 30 °C und die Verweilzeit 2 h, wobei die Reaktion über eine Gesamtzeit von 14 Tagen durchgeführt wurde. Der Reaktionsaufbau ist in Abbildung 6.5 schematisch dargestellt.



**Abbildung 6.5:** Schematische Darstellung des Aufbaus der kontinuierlichen Ganzzellbiotransformation, MAA=Methylacetoacetat.

Der Zellrückhalt wurde mit einem Filtrationsmodul (Ultran-Lab, Schleicher & Schuell) durchgeführt, welches einen molekularen Cut-off von 10 kDa hatte. Die Reaktionslösung wurde mit einer Schlauchpumpe (505 U, Watson-Marlow Inc., USA) über das Filtrationsmodul gepumpt.

Für die Bestimmung des Umsatzes wurde zu verschiedenen Zeiten jeweils 1 mL Reaktionsansatz entnommen und bei 13000 rpm für 3 min zentrifugiert, um die Bio-

masse abzutrennen. Um eine weitere Reaktion durch freies Enzym zu verhindern, wurde der Überstand in einem weiteren Eppendorfreaktionsgefäß bei 98 °C für 1 min inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gekühlt und per Gaschromatographie analysiert.

Für die Ermittlung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen wurde jeweils 5 mL Proben genommen, welche umgehend mit 15 mL -50 °C kaltem Methanol (60 % v/v) vermischt wurden, um die katalytische Aktivität der Zellen abzustoppen. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Für die Bestimmung der extrazellulären Cofaktorkonzentrationen im Reaktionsüberstand wurde 1 mL Probe abzentrifugiert und bei -20 °C gelagert. Durch den Volumenverlust in der Reaktion, der durch die Probennahme bedingt ist, wurde der Volumenstrom der Substratzugabe und der Produktabführung jeweils nach Probennahme angepasst, um eine konstante Verweilzeit zu gewährleisten.

### 6.7.2.2 Ganzzellbiotransformationen im Satzverfahren

Die Reaktionen im Satzreaktor erfolgten mit einer Methylacetoacetat-Konzentration von 0,3 M und einer Isopropanolkonzentration im Bereich von 3-0,3 M. Die Reaktionen wurden in einem Maßstab von 200 mL in einem temperierten Doppelmantelkolben bei 30 °C über 2 h durchgeführt. Die Probennahme für die Bestimmung des Umsatzes zu unterschiedlichen Zeitpunkten und die intrazellulären Cofaktorkonzentration erfolgten wie unter 6.7.2.1 beschrieben.

### 6.7.3 Ganzzellbiotransformation mit dem ER/ADH-System

Die Ganzzellbiotransformationen mit dem ER/ADH-System erfolgten mit dem rekombinanten *E. coli* ER-LbADH. Die Reaktionen wurden bei einem pH-Wert von 6,9 durchgeführt. Als Substrat für die Reaktionen wurde (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat

eingesetzt, die Cofaktorregenerierung erfolgte Enzym-gekoppelt mit Isopropanol.

### 6.7.3.1 Kontinuierliche Reaktionsführung

Die Ganzzellbiotransformationen wurden analog zur kontinuierlichen Biotransformation mit dem ADH/ADH-System durchgeführt. Die Substratkonzentration lag dabei bei 10-25 mM. Für die Cofaktorregenerierung wurde eine Isopropanolkonzentrationen von 50-400 mM eingesetzt. Die Bestimmung des Umsatzes erfolgte ausgehend von 1 mL Probe, welcher mit 300  $\mu$ L Ethylacetat extrahiert wurde. Das Extrakt wurde anschließend mittels Gaschromatographie analysiert. Die Reaktionen erfolgten über einen Zeitraum von bis zu zwei Tagen und wurden spätestens nach vollständigem Umsatzverlust abgebrochen. Die Probennahme für die Bestimmung der intrazellulären Cofaktoren erfolgte wie unter 6.7.2.1 beschrieben.

### 6.7.3.2 Ganzzellbiotransformationen im Satzverfahren

Die Reaktionen im Satzreaktor erfolgten mit einer Substratkonzentration von 25-100 mM und einer Isopropanolkonzentration von 400 mM. Die Reaktionen wurden in einem Maßstab von 200 mL bei 25 °C durchgeführt. Die Bestimmung des Umsatzes erfolgte ausgehend von einem Milliliter Probe, welcher mit 300  $\mu$ L Ethylacetat extrahiert wurde. Das Extrakt wurde anschließend mittels Gaschromatographie analysiert, wobei die Reaktionen bis zum Stillstand der Reaktion durchgeführt wurden. Die Ermittlung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen erfolgte wie unter 6.7.2.1 beschrieben.

## Die folgenden Arbeiten:

- Optimierung der ER-Produktion,
- Isolierung und Aufreinigung der ER,
- Charakterisierung des Einflusses der Temperatur und des pH-Werts auf die Aktivität und die Stabilität der ER und
- die Bestimmung der kinetischen Parameter der ER bezüglich Cyclohexanon, Cyclohexanon, NADP(H) und NADP<sup>+</sup>

wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt (Scheeren, 2010).

## 6.8 Produktion und Aufreinigung der ER

Die Expressionsoptimierung und die Produktion der ER wurde mit dem rekombinanten *E. coli* ER durchgeführt.

### 6.8.1 Expressionsoptimierung der ER

Die Optimierung der Enzymproduktion wurde hinsichtlich des Mediums mit LB-Medium (Tabelle 6.1, pH 7) mit einem Zusatz von  $4 \text{ g}_{\text{Glukose}}/\text{L}_{\text{Medium}}$ , TB-Medium (Tabelle 6.9, pH 7) und FB-Medium (Tabelle 6.13, pH 7), der Expressionstemperatur (27, 32, 37 °C), der Induktorkonzentration (0,1-1 mM IPTG) und des Induktionszeitpunkts innerhalb der Kultivierung durchgeführt. Die Versuche wurden in einer Parallelfermentationsanlage der Firma DASGIP AG, Deutschland durchgeführt.

**Tabelle 6.13:** Zusammensetzung des FB-Mediums

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration [g/L]</b>
Peptone	10
Hefeextrakt	5
Natriumchlorid	5
Dikaliumhydrogenphosphat	8,28
Kaliumdihydrogenphosphat	1,8
Natriumcitrat	0,45
Magnesiumsulfat	0,9
Glycerin	55,44

### 6.8.2 Produktion der ER im 5 L Maßstab

Die Produktion der ER erfolgte im 5 L Maßstab in einem Laborfermenter (Laborfermenter Typ L1523, Bioengineering AG, Schweiz) mit TB-Medium (Tabelle 6.9, pH 7). Die Expression der ER erfolgte bei einer  $OD_{600}$  von 3 mit 0,6 mM IPTG und einer Expressionstemperatur von 27 °C.

### 6.8.3 Isolierung und Aufreinigung der ER

Für die Isolierung der ER wurde die Biomasse mit Ultraschall (Digital Sonifier, Branson Ultrasonics Corporation, USA) aufgeschlossen und der geklärte Rohextrakt nach einer Filtration über einen Filter mit einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  für die Ionenaustauschchromatographie verwendet. Die Chromatographie wurde mit einem Bettvolumen von 300 mL und Q-Sepharose Fast Flow (GE-Healthcare Bio-Sciences AB Europe GmbH, Deutschland) in Verbindung mit einem Äktapurifier 10 (GE-Healthcare Bio-Sciences AB Europe GmbH, Deutschland) durchgeführt. Die isolierte ER wurde nach der Aufreinigung lyophilisiert.

#### 6.8.4 Charakterisierung der ER

Die Charakterisierung der ER bezüglich des Einflusses der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität erfolgte in einem Temperaturbereich von 20-60 °C. Der Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität und Stabilität wurde in einem pH-Bereich von 6-8 mit Phosphatpuffer bestimmt. Die Aktivitätsbestimmung der ER innerhalb der Messungen erfolgte mit dem unter 6.12.2.3 beschriebenen Enzymtest. Die Bestimmung der Lagerstabilität der ER wurde bei -20 °C als entsalzte Lösung mit und ohne den Zusatz von Glycerin (50 % (v/v)) und als Lyophilisat durchgeführt.

Die kinetischen Parameter der ER bezüglich Cyclohexenon und Cyclohexanon wurden in einem Konzentrationsbereich von 0-100 mM und für NADPH und NADP<sup>+</sup> in einem Konzentrationsbereich von 0-10 mM ermittelt. Die Messungen wurden photometrisch (Photometer PharmaSpec UV 1700, Shimadzu GmbH, Deutschland) bei einer Wellenlänge von  $\lambda=340$  nm und einer Enzymkonzentration von 0,1 mg<sub>ER</sub>/mL durchgeführt. Die Auswertung der Daten und die Bestimmung der kinetischen Parameter durch nicht-lineare Regression erfolgte mit der Software Origin<sup>®</sup> 7G SR1 der Firma OriginLab Corporation.

#### 6.8.5 Bestimmung der kinetischen Parameter der ER bezüglich (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat

Die Bestimmung der kinetischen Parameter für (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat erfolgte in 2 mL Ansätzen mit einer NADPH-Konzentration von 10 mM. Nach dem Erreichen eines Umsatzes von ca. 10 % wurde die Reaktion durch Extraktion mit 600  $\mu$ L Ethylacetat abgestoppt. Die Analytik erfolgte wie unter 6.12.3 angegeben.

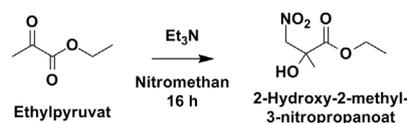
Die Auswertung der Daten und die Bestimmung der kinetischen Parameter durch nicht-lineare Regression erfolgte mit der Software Origin<sup>®</sup> 7G SR1 der Firma Origin-

Lab Corporation.

## 6.9 Synthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat

Da das Substrat, (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat, für die asymmetrische Reduktion mit der ER nicht kommerziell erhältlich war, wurde dieses in einem Maßstab von  $\leq 0,5$  M synthetisiert.

Die Synthese erfolgte in zwei Stufen, die erste Stufe ist Abbildung 6.6, die zweite in Abbildung 6.7 dargestellt.



**Abbildung 6.6:** Erste Stufe der Substratsynthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat, *Henry*-Reaktion

Die erste Reaktion (*Henry*-Reaktion) erfolgte mit Ethylpyruvat als Edukt und mit Nitromethan als Lösungsmittel, welches gleichzeitig als Reagenz fungierte. Beide Stoffe wurden in einem molaren Verhältnis von 1:8 (Ethylpyruvat : Nitromethan) eingesetzt. Triethylamin als Base wurde bezogen auf Ethylpyruvat in einem molaren Verhältnis von 2,5:1 (Ethylpyruvat : Triethylamin) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte über 18 h beginnend bei 4 °C, wobei im Laufe der Reaktion auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Nach der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt direkt für die zweite Stufe eingesetzt. Die Identifikation des Produkts erfolgte über <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR (Kapitel 6.12.5), die Spektren sind im Anhang unter 7.2 gezeigt.

Die Ergebnisse des <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR für das Produkt der ersten Stufe entsprechen den Referenzdaten in der Literatur (Martin *et al.*, 2008; Swiderska und Ste-

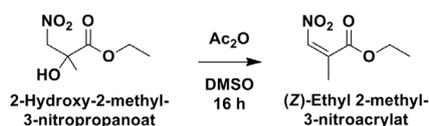
wart, 2006) und sind im Folgenden zusammengefaßt:

**2-Hydroxy-2-methyl-3-nitropropanoat:**

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  4,84(d,  $J=13,7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{NO}_2$ ,  $H^1$ ), 4,55 (d,  $J=13,8$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{NO}_2$ ,  $H^2$ ), 4,39-4,28 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3,75(s, 1H, OH), 1,45 (s, 3H,  $\text{CCH}_3$ ), 1,32 (t,  $J=7,1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ )ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  173,4; 81,0; 72,4; 63,0; 23,8; 14,0 ppm

Die Dehydratation erfolgte mit dem Rohprodukt der ersten Stufe in Dimethylsulfoxid. Für die Dehydratation wurden drei Äquivalente Essigsäureanhydrid bezogen auf den Nitroalkohol eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur über 18 h.



**Abbildung 6.7:** Zweite Stufe der Substratsynthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat, Dehydratation des Nitroalkohols

Nachdem die Reaktion beendet war, wurde mit Wasser extrahiert und die beiden Phasen voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde 3x mit Dichlormethan extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die anschließende Trocknung der organischen Phase erfolgte über Natriumsulfat. Nach dem Trocknen wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Die Reinigung des Produktes erfolgte mittels einer Chromatographie über Kieselgel ( $50\text{g}_{\text{Kieselgel}}/\text{g}_{\text{Produkt}}$ ) und einem Lösungsmittelgemisch von Petrolether und Ethylacetat (5:1 v/v) als Laufmittel. Die Produkt-haltigen Fraktionen wurden vereint und im Vakuum eingengt. Das verbliebene Lösungsmittel wurden im Hochvakuum vollständig entfernt. Die Identifikation des Produkts erfolgte mittels  $^1\text{H-NMR}$  und

$^{13}\text{C}$ -NMR (Kapitel 6.12.5), die Spektren sind im Anhang unter 7.2 gezeigt.

Die Ergebnisse des  $^1\text{H}$ -NMR und  $^{13}\text{C}$ -NMR für das Produkt (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat sind im Folgenden zusammengefasst und entsprechen den Referenzdaten in der Literatur (Martin *et al.*, 2008; Swiderska und Stewart, 2006):

**(Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat:**

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  6,87 (m, 1H,  $\text{CHNO}_2$ ), 4,35 (q,  $J=7,1$  Hz 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2,10 (d,  $J=1,7$  Hz, 3H,  $\text{CCCH}_3$ ), 1,34 (t,  $J=7,1$  Hz, 3H  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ )ppm

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  166,1; 140,9; 135,7; 62,4; 17,6; 13,8 ppm

## 6.10 Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat mit Natriumborhydrid

Für die Reduktion wurden 25 mM (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat und 37,5 mM Natriumborhydrid eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in Ethanol (abs.) bei 0 °C. Die Zugabe von Natriumborhydrid zur Reaktion erfolgte portionsweise über einen Zeitraum von 60 min. Die Reaktion wurde nach 90 min mit Ammoniumchlorid gequencht und mit Diethylether 3 x extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt mittels Chromatographie über Kieselgel gereinigt. Für die Chromatographie wurde das Kieselgel in einem Verhältnis von 50:1 (Kieselgel:Substanz, w/w) eingesetzt. Die Chromatographie erfolgte mit einem Lösungsmittelgemisch von Petrolether und Ethylacetat in einem Verhältnis von 9:1 (v/v). Die Identifikation des Produktes erfolgte mittels  $^1\text{H}$ -NMR und  $^{13}\text{C}$ -NMR (Kapitel 6.12.5), die Spektren sind im Anhang unter 7.2 gezeigt.

Die Ergebnisse des  $^1\text{H}$ -NMR und des  $^{13}\text{C}$ -NMR sind im Folgenden zusammengefasst und entsprechen den in der Literatur gegebenen Referenzdaten (Martin *et al.*, 2008; Wakabayashi *et al.*, 2008).

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  4,72 (dd,  $J=14,0$  Hz, 8 Hz,  $\text{CH}_2\text{NO}_2$ ,  $H^1$ ), 4,4 (dd,  $J=14,0$  Hz, 5,6 Hz,  $\text{CH}_2\text{NO}_2$ ,  $H^2$ ), 4,2 (q  $J=7,1$  Hz 2H  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3,28-3,21 (m, 1H,  $\text{CHCO}$ ), 1,3-1,25 (m, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ) ppm

$^{13}\text{C}$ -NMR: 172,4; 76,4; 61,5; 37,6; 14,3; 14,0 ppm

## 6.11 Biokatalyse mit isolierter ER

Die Reaktionen mit isolierter ER wurden in Maßstäben von 25 bis 500 mL in 50 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,9 durchgeführt. Die Konzentration der ER betrug bei allen Reaktionen  $0,2 \text{ mg}_{\text{Enzym}}/\text{mL}$ , die *LbADH* wurde mit einer Konzentration von  $0,1 \text{ mg}_{\text{Enzym}}/\text{mL}$  eingesetzt. Die Substratkonzentration ((*Z*)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat) variierte von 15 bis 100 mM. Für die Ermittlung des Umsatzes wurden Proben mit einem Volumen von 1 mL genommen und mit  $300 \mu\text{L}$  Ethylacetat extrahiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Gaschromatographie (Kapitel 6.12.3).

## 6.12 Analytik

### 6.12.1 Biomassespezifische Analytik

#### 6.12.1.1 Bestimmung der optischen Dichte

Um den Wachstumsverlauf während der Kultivierung zu verfolgen, wurde die OD bei einer Wellenlänge von  $\lambda=600$  nm (PharmaSpec UV 1700, Shimadzu, Deutschland) mit einem Probenvolumen von 1 mL bestimmt. Als Nullwert und zur Verdünnung

(Messbereich OD = 0,2 bis 0,6) der Proben wurde zellfreies Medium vom Zeitpunkt der Probennahme verwendet.

### 6.12.1.2 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgte ausgehend von 1 mL Kultivierungsansatz oder Ganzzellbiotransformationsansatz. Die Proben wurden in tarierten Eppendorfreaktionsgefäßen (1,5 mL) bei 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert (Zentrifuge 5415, Eppendorf AG, Deutschland) und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte das Trocknen des Zellpellets bei 70 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz. Nach dem Auswiegen der Reaktionsgefäße konnte aus der Differenz zwischen dem Leergewicht und dem Gewicht mit Pellet die Biotrockenmasse bestimmt werden.

### 6.12.1.3 Bestimmung des Zellvolumens

Damit die intrazellulären Cofaktorkonzentrationen der Zellen angegeben werden konnten, war es notwendig deren Volumen zu bestimmen. Hierfür erfolgte die Bestimmung der Zellzahl am Ende der Kultivierung mit einem Zellzählgerät (Casy1, Schärfe System GmbH, Deutschland), welches gleichzeitig das Volumen der Zellen aufnimmt. Die Zellsuspension wurde vor der Messung mit isotonischer Salzlösung verdünnt. Die Verdünnung wurde in Abhängigkeit von der optischen Dichte durchgeführt und betrug 1:200000 bis 1:250000. Mit Hilfe der Formeln 1-3 konnten aus den Messwerten die Volumina der Zellen berechnet werden.

**Formel 01:**

$$\frac{V_t}{V_p} = V$$

$V_t$ : Zellvolumen in der Probe [fL]

$V_p$ : Volumen Probe [mL]

$V$ : Zellvolumen/mL Probe [fl/mL]

**Formel 02:**

$$V * F_{vd} = V_f$$

$F_{vd}$ : Verdünnungsfaktor

Zellsuspension aus Kultivierung [-]

$V_f$ : Zellvolumen/mL<sub>Zellsuspension</sub>  
aus Kultivierung [fl/mL]

**Formel 03:**

$$\frac{V_f}{BTM} / 10^9 = V_{BTM}$$

BTM: Biotrockenmasse [mg/mL]

$V_{BTM}$ : Volumen/Biotrockenmasse [ $\mu$ L/mg<sub>BTM</sub>]

#### 6.12.1.4 Visualisierung der Zellintegrität

Für die Visualisierung der Zellintegrität wurde eine Fluoreszenzfärbung mit einem Färbekit (LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability and Counting Kit (L34856), Molecular PROBES Inc., USA) durchgeführt. Für die Färbung wurden Zellen aus den entsprechenden Proben entnommen und nach Herstellerangaben gefärbt. Dafür wurden den Zellsuspensionen mit 100 g<sub>BFM</sub>/L 10  $\mu$ L Probe entnommen. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden vor der Färbung 1:10 mit DMSO verdünnt, um eine zu intensive Färbung zu vermeiden und die Zellen mit 1,5  $\mu$ L 0,33 mM SYTO 9 und 1,5  $\mu$ L 3 mM Propidiumiodid gefärbt. Die Auswertung wurde an einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon inverted mikroskope Eclipse Ti, Nikon Instruments Europe B.V., Deutschland) bei einer 1000fachen Gesamtvergrößerung durchgeführt.

## 6.12.2 Proteinanalytik

### 6.12.2.1 SDS-PAGE

Die Bestimmung der Reinheit der isolierten ER und die Kontrolle der intrazellulären Proteinexpression wurden mit SDS-PAGE durchgeführt. Die Verdünnung der Proben erfolgte so, dass in etwa gleiche Proteinkonzentrationen auf das Gel (NuPAGE Bis-Tris Gele 4-12 %, Invitrogen, USA) aufgetragen wurden. Ein definiertes Probenvolu-

men (13  $\mu\text{L}$ ) wurde zunächst mit Probenpuffer (5  $\mu\text{L}$ , NuPAGE LDS Sample Buffer, Invitrogen, USA) versetzt. Als Laufpuffer wurde NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen, USA) verwendet. Bei Gelen mit 12 Taschen wurden 17  $\mu\text{L}$  des Probengemisches aufgetragen und bei Gelen mit 17 Taschen erfolgte der Auftrag von 10  $\mu\text{L}$ . Die Trennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 V über 90 min. Die Größe der einzelnen Proteinbanden konnten durch das zusätzliche Auftragen eines Größenstandards (SeeBlue Plus2 Prestained Proteinstandard, Invitrogen, USA oder PageRuler<sup>TM</sup> Plus Protein Ladder, Fermentas GmbH, Deutschland) zugeordnet werden. Nach der Auftrennung wurden die einzelnen Proteinbanden durch Silberfärbung visualisiert. Die Silberfärbung wurde mit einem Fertigkit (SilverQuest<sup>TM</sup>, SilverStainingKit, Invitrogen, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 6.12.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinmenge innerhalb einer Probe erfolgte durch die Bestimmung nach Bradford (1976). Dafür wurden 900  $\mu\text{L}$  Bradford-Reagenz mit 100  $\mu\text{L}$  Enzymlösung versetzt. Nach 20 min wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda=595$  nm photometrisch (PharmaSpec UV 1700, Shimadzu, Deutschland) ermittelt. Als Standard wurde Albumin in den entsprechenden Konzentrationen verwendet.

### 6.12.2.3 Aktivitätstest für die ER

Die Ermittlung der ER-Aktivität erfolgte über den Verbrauch an NADPH während der Reduktion von Cyclohexanon zu Cyclohexanon photometrisch (PharmaSpec UV 1700, Shimadzu, Deutschland) bei  $\lambda=340$  nm. Die Ansätze hatten ein Volumen von 1 mL mit den in Tabelle 6.14 aufgeführten Komponenten und Konzentrationen.

Tabelle 6.14: Zusammensetzung des Aktivitätstests der ER

Komponente	Eingesetzte Menge/ Konzentration
Enzym-haltige Lösung	10 $\mu$ L
Cyclohexenon	1 $\mu$ mol
NADPH	0,15 $\mu$ mol
50 mM Phosphatpuffer pH 7,0	894 $\mu$ L

#### 6.12.2.4 Ermittlung der Cofaktorabhängigkeit der ER

Die Ermittlung der Cofaktorabhängigkeit der ER erfolgte unter Reduktion von Cyclohexenon (1 mM) in 50 mM Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6,9. Dabei wurden 0,15 mM NADH bzw. 0,15 mM NADPH für die Reaktion eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in 1 mL Reaktionsvolumen bei 25 °C über 2 min. Dabei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda=340$  nm photometrisch (Photometer PharmaSpec UV 1700, Shimadzu, Deutschland) erfasst.

#### 6.12.2.5 Aktivitätstest für den Ganzzellbiokatalysator des ADH/ADH-System

Die Bestimmung der biokatalytischen Aktivität der Biomasse erfolgte jeweils vor der Biotransformation mit 2 x 1 mL der in Puffer resuspendierten Zellen. Hierfür wurde die Zellsuspension mit 600 mM Isopropanol und 300 mM Methylacetoacetat versetzt. Die Reaktionszeit betrug 1 min bei 30 °C. Die Zellen wurden danach durch Zentrifugation (Zentrifuge 5415, Eppendorf AG, Deutschland) entfernt und der Überstand bei 98 °C für 1 min inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde der Reaktionsüberstand mit internem Standard (50 mM *n*-Butanol) versetzt (1:1) und mittels Gaschromatographie (Kapitel 6.12.3) analysiert.

#### 6.12.2.6 Aktivitätstest für den Ganzzellbiokatalysator des ER/ADH-System

Der Aktivitätstest bezüglich der biokatalytischen Aktivität der Biomasse erfolgte über die Bestimmung der *Lb*ADH-Aktivität. 2 x 1 mL der resuspendierten Zellen wurden mit 300 mM Methylacetoacetat und 600 mM Isopropanol versetzt. Die Reaktion erfolgte über 3 min bei Raumtemperatur, die Abweichung von der Reaktionszeit, im Vergleich zum ADH/ADH-System, ergab sich durch die geringen Enzymaktivitäten vor der Expressionsoptimierung. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (Zentrifuge 5415, Eppendorf AG, Deutschland) entfernt und der Überstand bei 98 °C für 1 min inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde der Überstand mit internem Standard (50 mM *n*-Butanol) versetzt (1:1) und mittels Gaschromatographie (Kapitel 6.12.3) analysiert.

#### 6.12.3 Gaschromatographie

Die Quantifizierung der Substrate und Produkte der Biotransformationen erfolgte mit einem Agilent Gaschromatographen 6890-Series (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Deutschland) mit einer Carbowax Permabond 20M-Säule (Länge von 50 m, Innendurchmesser 0,32 mm, Macherey und Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland). In Tabelle 6.15 sind die Betriebsparameter des Gaschromatographen aufgelistet. Die Temperaturprofile wurden den entsprechenden Substraten und Produkten angepasst und sind in Tabelle 6.17 mit den einzelnen Retentionszeiten der entsprechenden Analyten zusammengefasst. Um Injektionsfehler, bedingt durch den Autosampler, zu eliminieren, wurde für alle Messungen *n*-Butanol als interner Standard verwendet. Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) mit einer 50 mM *n*-Butanol-Lösung versetzt. Für die Analytik des ADH/ADH-Systems wurde das *n*-Butanol in Wasser gelöst und für das ER/ADH-System erfolgte das Lösen des *n*-Butanols in Ethylacetat, da die Proben innerhalb der ER/ADH-Systems mit Ethylacetat extrahiert wurden.

Tabelle 6.15: Betriebsparameter des Gaschromatographen

Parameter	Einstellung
Trägergas	Wasserstoff
Detektor	Flammenionisationsdetektor
Säulenvordruck	1 bar
Injektionsvolumen	1 $\mu$ L

Tabelle 6.16: Temperaturprofile für die verwendeten achiralen GC-Methoden und die einzelnen Retentionszeiten der Analyten

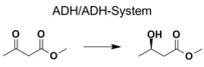
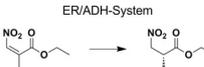
Reaktions-system	Temperatur-profil	Analyt	Retentions-zeiten [min]
ADH/ADH-System 	70 °C, 6 min, 25 °C/min $\rightarrow$ 160 °C 160 °C, 3 min	Aceton	1,7
		Isopropanol	2,2
		<i>n</i> -Butanol	5,4
		Methylacetoacetat	9,9
		Methylhydroxybutyrat	10,5
ER/ADH-System 	70 °C, 3 min, 10 °C/min $\rightarrow$ 120 °C 5 °C/min $\rightarrow$ 180 °C 180 °C 15 min	Aceton	1,7
		Isopropanol	2,2
		<i>n</i> -Butanol	5
		( <i>R</i> )-Ethyl-2-methyl-3-nitropropanoat	7
		( <i>Z</i> )-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat	19,2

#### 6.12.4 Enantiomerenanalytik

Die Enantiomerenanalytik wurde für beide Ganzzellsysteme (ADH/ADH und ER/ADH) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Dionex Corporation, USA) durchgeführt. Die Trennung der Analyten erfolgte mit einer Chiralpak-IC-Säule (Daicel Chemical Industries LTD, Frankreich). Die Trennung der Enantiomere des

ADH/ADH-Systems erfolgte mit einem konstanten Laufmittelgemisch von 15 % Isopropanol und 85 % Heptan (v/v) und einer Flussrate von 0,5 mL/min. Die Enantiomerenanalytik bezüglich des ER/ADH-Systems wurde mit einem konstanten Laufmittelgemisch von 20 % Isopropanol und 80 % Heptan (v/v) durchgeführt.

**Tabelle 6.17:** Retentionszeiten der einzelnen Enantiomere für das ADH/ADH-System und das ER/ADH-System

Reaktionssystem	Analyt	Retentionszeit [min]
 ADH/ADH-System	(R)-Methylhydroxybutyrat	16,3
	(S)-Methylhydroxybutyrat	16,8
 ER/ADH-System	(R)-Ethyl-2-methyl-3-nitropropanoat	14,4
	(S)-Ethyl-2-methyl-3-nitropropanoat	16,7

Die Chromatogramme der racemischen Gemische ist im Anhang unter 7.3 aufgeführt.

Die Zuordnung der Enantiomere erfolgte beim ADH/ADH-System durch kommerziell erworbenen Enantiomeren reine Standards. Die Zuordnung der Enantiomere beim ER/ADH-System erfolgte über die optische Aktivität bei 25 °C bei einer optischen Weglänge von 10 cm, einer Wellenlänge von  $\lambda=589,3$  nm und einer Konzentration von 0,175 mg/ml (Produkt der enzymatischen Umsetzung des (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat) in Trichlormethan. Der ermittelte spezifische Drehwinkel hatte einen Wert von  $[\alpha]_D^{25} = + 4,75$ . Der bei Wakabayashi *et al.* (2008) angegebene Drehwert für das (S)-Ethyl-2-methyl-3-nitropropanoat beträgt  $[\alpha]_D^{25} = - 8,96$  (c=0,35 in  $\text{CHCl}_3$ ).

### 6.12.5 Kernresonanzspektroskopie

Die Aufnahme der Kernresonanzspektren ( $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ ) erfolgte an einem Bruker ARX 300 (Bruker BioSpin GmbH, Deutschland) bei Raumtemperatur. Die Messung der  $^1\text{H}$ -Spektren erfolgte bei 300 MHz und der  $^{13}\text{C}$ -Spektren bei 76 MHz. Die verwendeten deuterierten Lösungsmittel wurden direkt mit Tetramethylsilan als internem Standard käuflich erworben. Die Bestimmung der chemischen Verschiebung ( $\delta$  [ppm]) erfolgte relativ zum Tetramethylsilan ( $\delta=0,00$  ppm).

### 6.12.6 Cofaktoranalytik

#### 6.12.6.1 Herstellung der $^{13}\text{C}$ -markierten Cofaktorstandards

Um eine vollständige Markierung der intrazellulären Cofaktoren zu erreichen, wurde die Kultivierung mit Minimalmedium durchgeführt und  $^{13}\text{C}$ -markierte Glukose als einzige Kohlenstoffquelle zugeführt.

Die Inkubation der Vorkulturen für die Fermentation fand in 250 mL Erlenmeyerkolben mit einem Volumen von 50 mL Medium (Tabelle 6.18, pH 7) statt. Das Medium wurde vor dem Sterilisieren mit 15 mL/ $L_{\text{Medium}}$  Eisencitrat-Lösung (Tabelle 6.18) und 1 mL/ $L_{\text{Medium}}$  Spurenelementelösung (Tabelle 6.18) versetzt. Nach dem Sterilisieren des Mediums erfolgte eine sterile Zugabe von Glukose (5 g/ $L_{\text{Medium}}$ ) und Carbenicillin (0,05 g/ $L_{\text{Medium}}$ ). Das Animpfen der Vorkulturen geschah durch die Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Kryokultur des *E. coli*-LbADH. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 150 rpm über 18 h.

Die Kultivierung der Hauptkultur wurde im Maßstab von 200 mL in einer Parallelfermentationsanlage (DASGIP AG, Deutschland) durchgeführt. Die Kalibration der pH-Sonde bei pH 7 und pH 4 fand vor der Sterilisation der Reaktoren statt. Diese wurden nach der Sterilisation mit Medium (Tabelle 6.18) gefüllt, welches vor der Ste-

rilisation mit  $15 \text{ ml/L}_{\text{Medium}}$  Eisencitrat-Lösung (Tabelle 6.18) versetzt wurde. Die Zugabe der Glukose erfolgte steril, so dass eine Konzentration von  $30 \text{ g/L}_{\text{Medium}}$  vorlag. Des Weiteren wurde dem Medium  $1 \text{ mL/L}_{\text{Medium}}$  Spurenelementelösung (Tabelle 6.18),  $0,05 \text{ g/L}_{\text{Medium}}$  Carbenecillin und  $0,0075 \text{ g/L}_{\text{Medium}}$  Thiamin über einen Sterilfilter zugeführt. Um Schaumbildung während der Kultivierung zu vermeiden wurden dem Medium weiterhin  $100 \mu\text{L}$  Antischaum (Antifoam 204, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland) zugesetzt. Anschliessend wurde die Kultivierung bis zur Induktion wie unter 6.2 durchgeführt.

**Tabelle 6.18:** Zusammensetzung des Minimalmediums der Vorkultur und Hauptkultur, der Eisencitratlösung (150fach) und der Spurenelementelösung (1000fach).

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration [g/L]</b>
<b>Minimalmedium VK:</b>	
Kaliumdihydrogenphosphat	3,0
DiKaliumhydrogenphosphat	12,0
Ammoniumsulfat	5,0
Magnesiumsulfat	0,6
Natriumchlorid	1,0
Calciumchlorid	0,015
Thiamin	0,0075
<b>Minimalmedium HK:</b>	
Kaliumdihydrogenphosphat	3,0
Ammoniumsulfat	5,0
Magnesiumsulfat	2,0
Natriumchlorid	1,0
Calciumchlorid	0,015
<b>Eisencitratlösung (150fach):</b>	
Eisensulfat-heptahydrat	7,5
Natriumcitrat-dihydrat	100,0
<b>Spurenelementelösung (1000fach):</b>	
Aluminiumchlorid-hexahydrat	0,75
Cobaltchlorid-hexahydrat	0,6
Kupfersulfat-pentahydrat	2,5
Borsäure	0,5
Mangansulfat-monohydrat	17,1
Natriummolybdat-dihydrat	3,0
Nickelchlorid-hexahydrat	1,7
Zinksulfat-heptahydrat	15,0

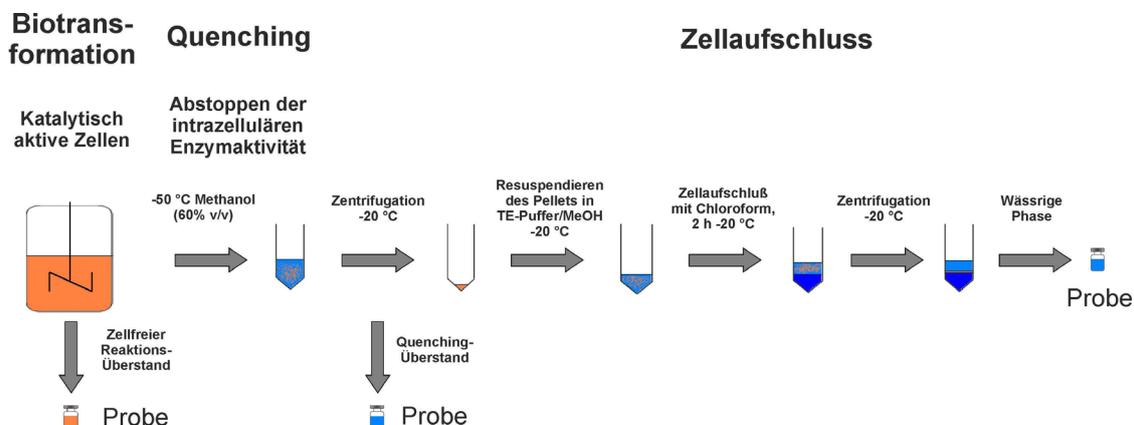
Nachdem die Kulturen eine  $OD_{600}$  von 3 erreicht hatten, wurde die intrazelluläre *LbADH*-Expression mit 0,2 mM IPTG im Medium induziert. Nach der Induktion erfolgte eine Absenkung der Kultivierungstemperatur auf 32 °C. Die Kultivierung-

dauer betrug insgesamt 24 h.

Nach der eigentlichen Kultivierung wurden die Kulturen mit 300 mM Isopropanol versetzt, um die Konzentration an reduzierten Cofaktoren zu erhöhen. Die Zellern- te erfolgte nach 10 min Reaktionszeit durch Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C. Anschließend wurden die Zellen in Phosphatpuffer resuspendiert, so dass eine Zell- konzentration von 100 g<sub>BFM</sub>/L vorlag. Die Aufarbeitung der Biomasse fand wie unter 6.12.6.2 beschrieben statt. Die Quenchingüberstände und die wässrigen Phasen nach dem Zellaufschluss wurden vereinigt und die <sup>13</sup>C-Cofaktor-haltige Lösung bei -20 °C gelagert, um die Stabilität der Cofaktoren für spätere Messungen zu gewährleisten.

### 6.12.6.2 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung für die Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentra- tionen ist schematisch in Abbildung 6.8 dargestellt.



**Abbildung 6.8:** Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für die Quantifizierung der intrazellulären Cofaktoren.

Ausgehend von katalytisch aktiven Zellen wurde die intrazelluläre Zellaktivität durch Vermischen der Probe (5 mL Zellsuspension) mit -50 °C kaltem Methanol (60 % v/v) abgestoppt.

Für die weitere Aufarbeitung der Proben wurden diese zwischen den einzelnen Arbeitsschritten im Kühlbad bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und alle verwendeten Lösungen auf diese Temperatur vortemperiert. Die Separierung der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (Allegra 64R, Beckmann Coulter Inc., USA) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 10000 rpm über 10 min. Für die spätere Quantifizierung der intrazellulären Cofaktoren wurden von jedem Quenchingüberstand nach der Zentrifugation 1 mL Probe genommen. Für den Zellaufschluss fand eine Resuspendierung der Zellen in 2 mL TE-Puffer-Methanol (Tabelle 6.19, pH 7) statt. Nach Zugabe von 2 mL Chloroform erfolgte der Zellaufschluss im Überkopfschüttler (REAX 2, Heidoplh, Deutschland) für 2 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die organische Phase wurde nach dem Zellaufschluss durch Zentrifugation (Allegra 64R, Beckmann Coulter) von der wässrigen Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde für den Rückhalt von verbliebenen unlöslichen Partikeln über einen Filter mit  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  Porengröße filtriert, um anschließend wie unter 6.12.6.3 vermessen zu werden.

**Tabelle 6.19:** Zusammensetzung der TE-Puffer-Methanol-Lösung.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration [g/L]</b>
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	1,21
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	0,29
Methanol	395

### 6.12.6.3 Messung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen

Für die Quantifizierung der intrazellulären Cofaktoren (NAD(H) und NADP(H)) wurden die Proben ( $75\text{ }\mu\text{L}$ ) mit  $^{13}\text{C}$ -Standard ( $75\text{ }\mu\text{L}$ ) versetzt. Die chromatographische Trennung wurde mittels HPLC (Jasco GmbH, Deutschland) durchgeführt. Als Vorsäule für die Chromatographie wurde eine Security Guard Cardrige, Polar Embedded C18  $4 \times 2.0\text{ mm}$  Säule (Phenomenex Inc., USA), als Hauptsäule eine Synergie Fusion RP  $150\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ ,  $4\text{ }\text{Å}$   $80\text{ }\mu\text{m}$  (Phenomenex Inc., USA) verwendet. Als Laufmittel

wurde TBA-Puffer (Tributylamin 10 mM, Essigsäure 15 mM, pH 6,9) in Verbindung mit Methanol verwendet. Die Zusammensetzung des Laufmittels über den Zeitraum der Chromatographie ist in Tabelle 6.20 ersichtlich.

**Tabelle 6.20:** Zusammensetzung des Laufmittels für die Auftrennung der Cofaktoren über die HPLC

<b>Zeit [min]</b>	<b>TBA-Puffer [%]</b>	<b>Methanol [%]</b>
3	70	30
5	65	35
7	65	35
10	40	60
13	10	90
14	0	100
16	0	100
18	70	30
20	70	30

Die Detektion der Cofaktoren erfolgte über ein Massenspektrometer (API 4000, Applied Biosystems, USA). Die Ionisation wurde mit Elektrospray Ionisation durchgeführt, wobei die in Tabelle 6.21 aufgeführten Ionenpaare für die Detektion der einzelnen Cofaktoren genutzt wurden. Die Auswertung erfolgte mit der Software Analyst<sup>®</sup> 1.5 (Applied Biosystems, USA).

**Tabelle 6.21:** Ionenpaare die nach der Elektrospray-Ionisation der einzelnen Cofaktoren für deren Detektion im Massenspektrometer genutzt wurden.

Analyt	Mutterion (Q <sub>1</sub> )	Tochterion (Q <sub>3</sub> )
NAD <sup>+</sup>	662,274	540,100
NADP <sup>+</sup>	742,246	620,100
NADH	664,300	79,100
NADPH	744,272	79,100
<sup>13</sup> C-NAD <sup>+</sup>	683,274	555,10
<sup>13</sup> C-NADP <sup>+</sup>	763,246	635,100
<sup>13</sup> C-NADH	685,300	79,000
<sup>13</sup> C-NADPH	765,272	79,000

Mit den erhaltenen Messwerten aus dem zellfreien Reaktionsüberstand, dem zellfreien Quenchingüberstand und der wässrigen Phase nach dem Zellaufschluss wurden mit Hilfe der Formeln 4-7 die Konzentrationen der intrazellulären Cofaktoren errechnet.

**Formel 04:**

$$\frac{V_{Pr} + V_Q}{V_{Pr} * V_{BTM} * BTM} = F_Q$$

$V_{BTM}$ : Zellvolumen/Biotrockenmasse [ $\mu\text{L}/\text{mg}_{BTM}$ ]

$V_{Pr}$ : Volumen Probe [ $\mu\text{L}$ ]

$BTM$ : Biotrockenmasse Konzentration [ $\text{mg}/\mu\text{L}$ ]

**Formel 05:**

$$\frac{V_Z + (V_{Pr} * V_{BTM} * BTM)}{V_{Pr} * V_{BTM} * BTM} = F_{Ex}$$

$V_Q$ : Volumen Quenchinglösung [ $\mu\text{L}$ ]

$V_Z$ : Puffervolumen bei Zellaufschluss [ $\mu\text{L}$ ]

$F_Q$ : Verdünnungsfaktor bei Quenching [-]

$F_{Ex}$ : Verdünnungsfaktor beim Extrahieren [-]

**Formel 06:**

$$C_Q - (0,25 * C_R) * F_Q = C_L$$

$C_R$ : Cofaktorkonzentration

im Reaktionsüberstand [ $\mu\text{M}$ ]

$C_Q$ : Cofaktorkonzentration im

Quenchingüberstand [ $\mu\text{M}$ ]

**Formel 07:**

$$C_A * F_{Ex} + C_L = C_i$$

$C_L$ : nach Quenching ausgetretene

Cofaktorkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]

$C_A$ : Cofaktorkonzentration im Zellextrakt [ $\mu\text{M}$ ]

$C_i$ : intrazelluläre Cofaktorkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]

#### 6.12.6.4 Bestimmung der Stabilität der Cofaktoren während der Probenaufarbeitung

Um die Stabilität der Cofaktoren (NAD(H) und NADP(H)) über den Prozess des Zellaufschlusses, wie in 6.12.6.2 beschrieben, zu ermitteln, wurden reine Cofaktoren den Bedingungen des Zellaufschlusses ausgesetzt. Die Cofaktoren wurden innerhalb der Messungen in einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  und 4  $\mu\text{M}$  eingesetzt und die Proben, wie unter 6.12.6.3 angegeben, vermessen.

Die Bestimmung der Stabilität beim Quenching erfolgte über eine Zeitspanne von 2 h. Hierbei wurde  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltes Methanol (60 %, v/v) mit den Cofaktoren versetzt und 2 h inkubiert. Die Bestimmung der Stabilität erfolgte durch den Vergleich mit unbehandelten Proben gleicher Konzentration.

Um die Stabilität der Cofaktoren während des Zellaufschlusses zu ermitteln, wurden die Cofaktoren zunächst in 2 mL einer TE-Puffer-Methanol-Lösung (Tabelle 6.19 pH 7) gelöst und anschließend wurden weitere 2 mL Chloroform zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  über 2 h unter Schütteln. Nach der Separation der wässrigen Phase wurde diese vermessen und mit einer nicht prozessierten Probe gleicher Konzentration in TE-Puffer-Methanol-Lösung (Tabelle 6.19 pH 7) verglichen.

Die Lagerstabilität der Cofaktoren im Autosampler der LC-MS/MS wurde über einen Zeitraum von 48 h bestimmt. Hierfür erfolgte die Messung der Cofaktoren in TE-Puffer-Methanol (Tabelle 6.19 pH 7), wobei für die Bestimmung der Stabilität mit der Probe zum Zeitpunkt  $t_0$  verglichen wurde.

# Literaturverzeichnis

- Adolph, H. W., Maurer, P., Schneiderbernlohr, H., Sartorius, C., and Zeppezauer, M. (1991). Substrate-Specificity and Stereoselectivity of Horse Liver Alcohol-Dehydrogenase - Kinetic Evaluation of Binding and Activation Parameters Controlling the Catalytic Cycles of Unbranched, Acyclic Secondary Alcohols and Ketones as Substrates of the Native and Active-Site-Specific Co(II)-Substituted Enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 201(3):615–625.
- Allen, S. J. and Holbrook, J. J. (1995). NADH Recycling by Formate Dehydrogenase. *Protein Engineering*, 8:57–57.
- Andersen, K. B. and Meyenburg, K. V. (1977). Charges of Nicotinamide Adenine Nucleotides and Adenylate Energy Charge as Regulatory Parameters of the Metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 252(12):4151–4156.
- Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S. J., and Rabinowitz, J. D. (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, 5(8):593–599.
- Bernofsky, C. and Swan, M. (1973). Improved Cycling Assay for Nicotinamide Adenine-Dinucleotide. *Analytical biochemistry*, 53(2):452–458.
- Blank, L. M., Ebert, B. E., Buehler, K., and Bühler, B. (2010). Redox Biocatalysis and Metabolism: Molecular Mechanisms and Metabolic Network Analysis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(3):349–394.

- Blaser, H. U., Malan, C., Pugin, B., Spindler, F., Steiner, H., and Studer, M. (2003). Selective hydrogenation for fine chemicals: Recent trends and new developments. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 345(1-2):103–151.
- Bommarius, A. S., Schwarm, M., Stingl, K., Kottenhahn, M., Huthmacher, K., and Drauz, K. (1995). Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine. *Tetrahedron-Asymmetry*, 6(12):2851–2888.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248–254.
- Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Kessler, M., Stürmer, R., and Zelinski, T. (2004). Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angewandte Chemie-International Edition*, 43(7):788–824.
- Bright, J. R., Byrom, D., Danson, M. J., Hough, D. W., and Towner, P. (1993). Cloning, Sequencing and Expression of the Gene Encoding Glucose-Dehydrogenase from the Thermophilic Archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *European Journal of Biochemistry*, 211(3):549–554.
- Brown, B. J., Deng, Z., Karplus, P. A., and Massey, V. (1998). On the Active Site of Old Yellow Enzyme - Role of histidine 191 and asparagine 194 . *Journal of Biological Chemistry*, 273(49):32753–32762.
- Brown, B. J., Hyun, J. W., Duvvuri, S., Karplus, P. A., and Massey, V. (2002). The role of glutamine 114 in Old Yellow Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3):2138–2145.
- Buchholz, A., Takors, R., and Wandrey, C. (2001). Quantification of Intracellular Metabolites in *Escherichia coli* K12 Using Liquid Chromatographic-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Techniques. *Analytical Biochemistry*, 295(2):129–137.

- Chenault, H. K. and Whitesides, G. M. (1987). Regeneration of Nicotinamide Cofactors for Use in Organic-Synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 14(2):147–197.
- Chmiel, H. (2006). *Bioprozesstechnik*, volume 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Corey, E. J., Bakshi, R. K., Shibata, S., Chen, C. P., and Singh, V. K. (1987). A Stable and Easily Prepared Catalyst for the Enantioselective Reduction of Ketones - Applications to Multistep Syntheses. *Journal of the American Chemical Society*, 109(25):7925–7926.
- Corey, E. J. and Helal, C. J. (1998). Aminoacrylic compounds. part 31 - Reduction of carbonyl compounds with chiral oxazaborolidine catalysts: A new paradigm for enantioselective catalysis and a powerful new synthetic method. *Angewandte Chemie-International Edition*, 37(15):1987–2012.
- DECHEMA and VCI (2006). F&E -Strategie Chemie und Biotechnologie für gesellschaftliche Bedürfnisfelder.
- Drauz, K., Eils, S., and Schwarm, M. (2002). Synthesis and production of enantiomerically pure amino acids. *Chimica Oggi-Chemistry Today*, 20(1-2):15–21.
- Drewke, C. and Ciriacy, M. (1988). Overexpression, Purification and Properties of Alcohol Dehydrogenase-IV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 950(1):54–60.
- Ferro, A. M. and Olivera, B. M. (1987). Intracellular Pyridine Nucleotide Degradation and Turnover. In Dolphin, D., Avramovic, O., and Poulson, R., editors, *Pyridine nucleotide coenzymes: chemical, biochemical, and medical aspects. vol B, COENZYMES AND COFACTORS*. John Wiley & Sons, New York.
- Fischer, T. and Pietruszka, J. (2010). Key building blocks via enzyme-mediated syn-

- thesis. In Piel, J., editor, *Natural Products Via Enzymatic Reactions*, volume 297 of *Topics in Current Chemistry*, pages 1–43. Springer-Verlag Berlin, Berlin.
- Floris, T., Kluson, P., Bartek, L., and Pelantova, H. (2009). Quaternary ammonium salts ionic liquids for immobilization of chiral Ru-BINAP complexes in asymmetric hydrogenation of beta-ketoesters. *Applied Catalysis a-General*, 366(1):160–165.
- Foster, J. W. and Moat, A. G. (1980). Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis and Pyridine Nucleotide Cycle Metabolism in Microbial Systems. *Microbiological Reviews*, 44(1):83–105.
- Fox, K. M. and Karplus, P. A. (1994). Old Yellow Enzyme at 2-Angstrom Resolution: overall structure, ligand binding, and comparison with related flavoproteins. *Structure*, 2(11):1089–1105.
- Fujio, T. (2001). Glutathione Fermentation. In Association, J. B., editor, *Hakko-Handbook*, pages 139–140. Kyoritsu Shuppan.
- Goldberg, K., Edegger, K., Kroutil, W., and Liese, A. (2006). Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(1):192–198.
- Goldberg, K., Schroer, K., Lütz, S., and Liese, A. (2007). Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part I: processes with isolated enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(2):237–248.
- Gul-Karaguler, N., Sessions, R. B., Clarke, A. R., and Holbrook, J. J. (2001). A single mutation in the NAD-specific formate dehydrogenase from *Candida methylca* allows the enzyme to use NADP. *Biotechnology Letters*, 23(4):283–287.
- Günther, H., Walter, K., Kohler, P., and Simon, H. (2000). On a new artificial mediator accepting NADP(H) oxidoreductase from *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Biotechnology*, 83(3):253–267.

- Hall, M., Hauer, B., Stuermer, R., Kroutil, W., and Faber, K. (2006). Asymmetric whole-cell bioreduction of an  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde (citral): competing prim-alcohol dehydrogenase and C-C lyase activities. *Tetrahedron-Asymmetry*, 17(21):3058–3062.
- Hall, M., Stueckler, C., Hauer, B., Stuermer, R., Friedrich, T., Breuer, M., Kroutil, W., and Faber, K. (2008). Asymmetric bioreduction of activated C = C bonds using *Zymomonas mobilis* NCR enoate reductase and old yellow enzymes OYE 1-3 from yeasts. *European Journal of Organic Chemistry*, (9):1511–1516.
- Hall, M., Stueckler, C., Kroutil, W., Macheroux, P., and Faber, K. (2007). Asymmetric bioreduction of activated alkenes using cloned 12-oxophytodienoate reductase isoenzymes OPR-1 and OPR-3 from *Lycopersicon esculentum* (Tomato): A striking change of stereoselectivity. *Angewandte Chemie-International Edition*, 46(21):3934–3937.
- Heuser, F., Schroer, K., Lütz, S., Bringer-Meyer, S., and Sahm, H. (2007). Enhancement of the NAD(P)(H) Pool in *Escherichia coli* for Biotransformation. *Engineering in Life Sciences*, 7(4):1–12.
- Hilz, H. (1997). ADP-RIBOSE - A historical overview. In Haag, F. and Koch-Nolte, F., editors, *ADP-Ribosylation in Animal Tissues - Structure, Function, and Biology of Mono (ADP-Ribosyl) Transferases and related Enzymes*, volume 419 of *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pages 15–24. Plenum Press Div Plenum Publishing Corp, New York.
- Honda, K., Ishige, T., Kataoka, M., and Schmid, A. (2006). Microbial and enzymatic processes for the production of chiral compounds. In Patel, R. N., editor, *Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries*, pages 529 – 546. Taylor & Francis, New York.
- Hummel, W. (1997). New Alcohol Dehydrogenases for the Synthesis of Chiral Compounds. *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*, 58:145–184.

- Hummel, W. and Kula, M. R. (1989). Dehydrogenases for the Synthesis of Chiral Compounds. *European Journal of Biochemistry*, 184(1):1–13.
- Ishige, T., Honda, K., and Shimizu, S. (2005). Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(2):174–180.
- Izumi, Y., Kanzaki, H., Morita, S., Futazuka, H., and Yamada, H. (1989). Characterization of Crystalline Formate Dehydrogenase from *Candida methanolica*. *European Journal of Biochemistry*, 182(2):333–341.
- Kataoka, M., Kotaka, A., Thiwthong, R., Wada, M., Nakamori, S., and Shimizu, S. (2004). Cloning and overexpression of the old yellow enzyme gene of *Candida macedoniensis*, and its application to the production of a chiral compound. *Journal of Biotechnology*, 114(1-2):1–9.
- Kataoka, M., Yamamoto, K., Kawabata, H., Wada, M., Kita, K., Yanase, H., and Shimizu, S. (1999). Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the aldehyde reductase and glucose dehydrogenase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(4):486–490.
- Kaup, B. (2005). D-mannitol formation from D-glucose in a whole-cell biotransformation with recombinant *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(4):397–403.
- Keinan, E., Hafeli, E. K., Seth, K. K., and Lamed, R. (1986). Thermostable Enzymes in Organic-Synthesis. 2. Asymmetric Reduction of Ketones with Alcohol-Dehydrogenase from *Thermoanaerobium brockii*. *Journal of the American Chemical Society*, 108(1):162–169.
- Kita, K., Matsuzaki, K., Hashimoto, T., Yanase, H., Kato, N., Chung, M. C. M., Kataoka, M., and Shimizu, S. (1996). Cloning of the aldehyde reductase gene from a red yeast, *sporobolomyces salmonicolor*, and characterization of the gene and its product. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7):2303–2310.

- Kornberg, A. (1950). Reversible enzymatic synthesis of diphosphopyridine nucleotide and inorganic pyrophosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 182(2):779–793.
- Kosaric, N. (1996). Ethanol - potential source of energy and chemical products. In Roehr, M., editor, *Products of Primary Metabolism*, volume 6 of *Biotechnology*, pages 123–200. VCH, Weinheim.
- Lee, H. C., Kim, J. S., Jang, W., and Kim, S. Y. (2010). High NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio improves thymidine production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Journal of Biotechnology*, 149(1-2):24–32.
- Leuenberger, H. G. W., Boguth, W., Widmer, E., and Zell, R. (1976). Synthesis of Optically-Active Natural Carotenoids and Structurally Related Compounds. 1. Synthesis of Chiral Key Compound (4r,6r)-4-Hydroxy-2,2,6-Trimethylcyclohexanone. *Helvetica Chimica Acta*, 59(5):1832–1849.
- Liese, A., Zelinski, T., Kula, M. R., Kierkels, H., Karutz, M., Kragl, U., and Wandrey, C. (1998). A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 4(1-2):91–99.
- Lilius, E. M., Multanen, V. M., and Toivonen, V. (1979). Quantitative Extraction and Estimation of Intracellular Nicotinamide Nucleotides of *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, 99(1):22–27.
- Luo, B., Grönke, K., Takors, R., Wandrey, C., and Oldiges, M. (2007). Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1147(2):153–164.
- Lutz, J., Mozhaev, V. V., Khmelnitsky, Y. L., Witholt, B., and Schmid, A. (2002). Preparative application of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase with enzymatic cofactor regeneration in organic-aqueous reaction media. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 19:177–187.

- Lye, G. J. and Woodley, J. M. (1999). Application of *in situ* product-removal techniques to biocatalytic processes. *Trends in Biotechnology*, 17(10):395–402.
- Mailinger, W., Baumeister, A., Reuss, M., and Rizzi, M. (1998). Rapid and highly automated determination of adenine and pyridine nucleotides in extracts of *Saccharomyces cerevisiae* using a micro robotic sample preparation HPLC system. *Journal of Biotechnology*, 63(2):155–166.
- Manlapaz, P. and Olivera, B. M. (1973). Pyridine-Nucleotide Metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 248(14):5150–5155.
- Martin, N. J. A., Cheng, X., and List, B. (2008). Organocatalytic asymmetric transferhydrogenation of beta-nitroacrylates: Accessing  $\beta(2)$ -amino acids. *Journal of the American Chemical Society*, 130(42):13862–13863.
- Müller, A., Hauer, B., and Rosche, B. (2006). Enzymatic reduction of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbon bond in citral. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 38(3-6):126–130.
- Müller, N. J., Stueckler, C., Hauer, B., Baudendistel, N., Housden, H., Bruce, N. C., and Faber, K. (2010). The Substrate Spectra of Pentaerythritol Tetranitrate Reductase, Morphinone Reductase, N-Ethylmaleimide Reductase and Estrogen-Binding Protein in the Asymmetric Bioreduction of Activated Alkenes. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 352(2-3):387–394.
- Nakamura, K. and Yamanaka, R. (2002). Light mediated cofactor recycling system in biocatalytic asymmetric reduction of ketone. *Chemical Communications*, (16):1782–1783.
- Narasaka, K. and Pai, F. C. (1984). Stereoselective Reduction of Beta-Hydroxyketones to 1,3-Diols - Highly Selective 1,3-Asymmetric Induction via Boron Chelates. *Tetrahedron*, 40(12):2233–2238.

- Narasaka, K. and Pai, H. C. (1980). Stereoselective Synthesis of Meso(or Erythro) 1,3-Diols from  $\beta$ -Hydroxyketones. *Chemistry Letters*, (11):1415–1418.
- Naylor, C. E., Gover, S., Basak, A. K., Cosgrove, M. S., Levy, H. R., and Adams, M. J. (2001). NADP<sup>+</sup> and NAD<sup>+</sup> binding to the dual coenzyme specific enzyme *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: different interdomain hinge angles are seen in different binary and ternary complexes. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 57:635–648.
- Noyori, R. (2002). Asymmetric catalysis: Science and opportunities (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition*, 41(12):2008–2022.
- Ogawa, J. and Shimizu, S. (2002). Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in japan. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4):367–375.
- Oldiges, M., Lütz, S., Pflug, S., Schroer, K., Stein, N., and Wiendahl, C. (2007). Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3):495–511.
- O’Sullivan, J. (1986).  $\beta$ -lactam antibiotics. In Pape, H. and Rehm, H. J., editors, *Microbial Products II*, volume 4 of *Biotechnology*, pages 247–281. VCH, Weinheim.
- Pasta, P., Carrea, G., Gaggero, N., Grogan, G., and Willetts, A. (1996). Enantioselective oxidations catalyzed by diketocamphane monooxygenase from *Pseudomonas putida* with macromolecular NAD in a membrane reactor. *Biotechnology Letters*, 18(10):1123–1128.
- Pietruszka, J. and Fischer, T. (2007). Efficient synthesis of either enantiomer of ethyl 5-hydroxyhept-6-enoate. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9):1533–1536.
- Pramanik, J. and Keasling, J. D. (1997). Stoichiometric model of *Escherichia coli* metabolism: Incorporation of growth-rate dependent biomass composition and mechanistic energy requirements. *Biotechnology and Bioengineering*, 56(4):398–421.

- Richter, N., Neumann, M., Liese, A., Wohlgemuth, R., Weckbecker, A., Eggert, T., and Hummel, W. (2010). Characterization of a Whole-Cell Catalyst Co-Expressing Glycerol Dehydrogenase and Glucose Dehydrogenase and Its Application in the Synthesis of L-Glyceraldehyde. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(4):541–552.
- Rissom, S., Schwarz-Linek, U., Vogel, M., Tishkov, V. I., and Kragl, U. (1997). Synthesis of chiral epsilon-lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone mono-oxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration. *Tetrahedron-Asymmetry*, 8(15):2523–2526.
- Roehr, M. (1996). *Products of Primary Metabolism*, volume 6 of *Biotechnology*. VCH, Weinheim.
- Ruppert, R., Herrmann, S., and Steckhan, E. (1988). Very Efficient Reduction of NAD(P)<sup>+</sup> with Formate Catalyzed by Cationic Rhodium Complexes. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, (17):1150–1151.
- Saito, K., Thiele, D. J., Davio, M., Lockridge, O., and Massey, V. (1991). The Cloning and Expression of a Gene Encoding Old Yellow Enzyme from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(31):20720–20724.
- Scheeren, C. (2010). Herstellung und Charakterisierung einer Enreduktase aus *Saccharomyces carlsbergensis*, Bachelorarbeit, Fachhochschule Aachen, Standort Jülich.
- Schenkels, P., De Vries, S., and Straathof, A. J. J. (2001). Scope and limitations of the use of nicotinoprotein alcohol dehydrogenase for the coenzyme-free production of enantiopure fine-chemicals. *Biocatalysis and Biotransformation*, 19(3):191–212.
- Schlieben, N. H., Niefind, K., Müller, J., Riebel, B., Hummel, W., and Schomburg, D. (2005). Atomic resolution structures of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* provide the structural bases of its substrate and cosubstrate specificity. *Journal of Molecular Biology*, 349(4):801–813.

- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., and Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409(6817):258–268.
- Schroer, K., Tacha, E., Bringer-Meyer, S., Hummel, W., Dausmann, T., Pfaller, R., and Lütz, S. (2007a). Continuous asymmetric ketone reduction processes with tailor-made microorganisms. *Journal of Biotechnology*, 131(2):95–96.
- Schroer, K., Tacha, E., and Lütz, S. (2007b). Process intensification for substrate-coupled whole cell ketone reduction by in situ acetone removal. *Organic Process Research & Development*, 11(5):836–841.
- Schroer, K., Zelic, B., Oldiges, M., and Lütz, S. (2009). Metabolomics for Biotransformations: Intracellular Redox Cofactor Analysis and Enzyme Kinetics Offer Insight Into Whole Cell Processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(2):251–260.
- Schulz, M., Leichmann, H., Gunther, H., and Simon, H. (1995). Electromicrobial regeneration of pyridine-nucleotides and other preparative redox transformations with *Clostridium thermoaceticum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42(6):916–922.
- Siedler, S. (2011). Intracellular cofactor concentrations of rekombinant *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) expressing *LbADH*, persönliche Mitteilung.
- Singleton, M. R., Hakansson, K., Timson, D. J., and Wigley, D. B. (1999). Structure of the adenylation domain of an NAD(+)-dependent DNA ligase. *Structure*, 7(1):35–42.
- Stark, D., v. S. U. (2003). *In Situ* Product Removal (ISPR) in Whole Cell Biotechnology During the Last Twenty Years. *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*, 80:150–175.
- Stueckler, C., Hall, M., Ehammer, H., Pointner, E., Kroutil, W., Macheroux, P., and Faber, K. (2007). Stereocomplementary Bioreduction of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Dicarboxylic Acids and Dimethyl Esters using Enoate Reductases: Enzyme- and Substrate-Based Stereocontrol. *Organic Letters*, 9(26):5409–5411.

- Stueckler, C., Mueller, N. J., Winkler, C. K., Glueck, S. M., Gruber, K., Steinkellner, G., and Faber, K. (2010). Bioreduction of alpha-methylcinnamaldehyde derivatives: chemo-enzymatic asymmetric synthesis of Lilial<sup>(TM)</sup> and Helional<sup>(TM)</sup>. *Dalton Transactions*, 39(36):8472–8476.
- Stuermer, R., Hauer, B., Hall, M., and Faber, K. (2007). Asymmetric bioreduction of activated c=c bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(2):203–213.
- Swiderska, M. A. and Stewart, J. D. (2006). Asymmetric bioreductions of  $\beta$ -nitro acrylates as a route to chiral  $\beta$ (2)-Amino acids. *Organic Letters*, 8(26):6131–6133.
- Takaya, H., Ohta, T., Sayo, N., Kumobayashi, H., Akutagawa, S., Inoue, S., Kasahara, I., and Noyori, R. (1987). Enantioselective Hydrogenation of Allylic and Homoallylic Alcohols. *Journal of the American Chemical Society*, 109(5):1596–1597.
- Takors, R. (2004). Whole cell ISPR process development: Chances and pitfalls. *Chemie-Ingenieur-Technik*, 76(12):1807–1814.
- Toogood, H. S., Gardiner, J. M., and Scrutton, N. S. (2010). Biocatalytic Reductions and Chemical Versatility of the Old Yellow Enzyme Family of Flavoprotein Oxidoreductases. *Chemcatchem*, 2(8):892–914.
- van Dam, J. C., Eman, M. R., Frank, J., Lange, H. C., van Dedem, G. W. K., and Heijnen, S. J. (2002). Analysis of glycolytic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae* using anion exchange chromatography and electrospray ionization with tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 460(2):209–218.
- Villela, M., Stillger, T., Müller, M., Liese, A., and Wandrey, C. (2003). Is log P a convenient criterion to guide the choice of solvents for biphasic enzymatic reactions? *Angewandte Chemie-International Edition*, 42(26):2993–2996.
- Voet, D., Voet, J. G., and Peratt, C. W. (2002). *Lehrbuch der Biochemie*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

- Wada, M., Kataoka, M., Kawabata, H., Yasohara, Y., Kizaki, N., Hasegawa, J., and Shimizu, S. (1998). Purification and characterization of nadph-dependent carbonyl reductase, involved in stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate, from *candida magnoliae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62(2):280–285.
- Wagenknecht, P. S., Penney, J. M., and Hembre, R. T. (2003). Transition-metal-catalyzed regeneration of nicotinamide coenzymes with hydrogen. *Organometallics*, 22(6):1180–1182.
- Wakabayashi, K., Aikawa, K., Kawauchi, S., and Mikami, K. (2008). Catalyst self-adaptation in conjugate addition to nitroalkenes and nitroacrylates: Instant chirality control in diphenylmethane-based phosphoramidite ligands. *Journal of the American Chemical Society*, 130(15):5012–5013.
- Warburg, O. and Christian, W. (1933). The yellow oxidation enzyme. *Biochemische Zeitschrift*, 263:228–229.
- Weckbecker, A., Gröger, H., and Hummel, W. (2010). Regeneration of Nicotinamide Coenzymes: Principles and Applications for the Synthesis of Chiral Compounds. *Biosystems Engineering I: Creating Superior Biocatalysts*, 120:195–242.
- Wichmann, R. and Vasic-Racki, D. (2005). Cofactor Regeneration at the Lab Scale. *Technology Transfer in Biotechnology: From Lab to Industry to Production*, 92:225–260.
- Wolberg, M., Villela, M., Bode, S., Geilenkirchen, P., Feldmann, R., Liese, A., Hummel, W., and Müller, M. (2008). Chemoenzymatic synthesis of the chiral side-chain of statins: application of an alcohol dehydrogenase catalysed ketone reduction on a large scale. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(3):183–191.
- Wu, L., Mashego, M. R., van Dam, J. C., Proell, A. M., Vinke, J. L., Ras, C., van Winden, W. A., van Gulik, W. M., and Heijnen, J. J. (2005). Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly c-13-labeled cell extracts as internal standards. *Analytical Biochemistry*, 336(2):164–171.

- Xiao, Z. J., Lv, C. J., Gao, C., Qin, J. Y., Ma, C. Q., Liu, Z., Liu, P. H., Li, L. X., and Xu, P. (2010). A Novel Whole-Cell Biocatalyst with NAD<sup>+</sup> Regeneration for Production of Chiral Chemicals. *Plos One*, 5(1):1–6.
- Yamada, H. and Shimizu, S. (1988). Microbial and enzymatic processes for the production of biologically and chemically useful compounds. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 27(5):622–642.
- Yamada, K., Hara, N., Shibata, T., Osago, H., and Tsuchiya, M. (2006). The simultaneous measurement of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 352(2):282–285.
- Zatman, L. J., Kaplan, N. O., and Colowick, S. P. (1953). Inhibition of spleen diphosphopyridine nucleotidase by nicotinamide, an exchange reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 200(1):197–212.
- Zehentgruber, D., Hannemann, F., Bleif, S., Bernhardt, R., and Lütz, S. (2010). Towards Preparative Scale Steroid Hydroxylation with Cytochrome P450 Monooxygenase CYP106A2. *ChemBioChem*, 11(5):713–721.
- Zhang, J., Witholt, B., and Li, Z. (2006). Coupling of permeabilized microorganisms for efficient enantioselective reduction of ketone with cofactor recycling. *Chemical Communications*, (4):398–400.

# 7 Anhang

## 7.1 Sequenzen der verwendeten Gene

### 7.1.1 Sequenz des *adh*-Gens

```
ATGTCTAACC GTTTGGATGG TAAGGTAGCA ATCATTACAG GTGGTACGTT
GGGTATCGGT TTAGCTATCG CCACGAAGTT CGTTGAAGAA GGGGCTAAGG
TCATGATTAC CGGCCGGCAC AGCGATGTTG GTGAAAAAGC AGCTAAGAGT
GTCGGCACTC CTGATCAGAT TCAATTTTTT CAACATGATT CTTCCGATGA
AGACGGCTGG ACGAAATTAT TCGATGCAAC GGAAAAAGCC TTTGGCCCAG
TTTCTACATT AGTTAATAAC GCTGGGATCG CGGTTAACAA GAGTGTGCGAA
GAAACCACGA CTGCTGAATG GCGTAAATTA TTAGCCGTCA ACCTTGATGG
TGTCTTCTTC GGTACCCGAT TAGGGATTCA ACGGATGAAG AACAAAGGCT
TAGGGGCTTC CATCATCAAC ATGTCTTCGA TCGAAGGCTT TGTGGGTGAT
CCTAGCTTAG GGGCTTACAA CGCATCTAAA GGGGCCGTAC GGATTATGTC
CAAGTCAGCT GCCTTAGATT GTGCCCTAAA GGACTACGAT GTTCGGGTAA
ACACTGTTCA CCCTGGCTAC ATCAAGACAC CATTGGTTGA TGACCTACCA
GGGGCCGAAG AAGCGATGTC ACAACGGACC AAGACGCCAA TGGGCCATAT
CGGTGAACCT AACGATATTG CCTACATCTG TGTTTACTTG GCTTCTAACG
AATCTAAATT TGCAACGGGT TCTGAATTTG TAGTTGACGG TGGCTACACT
GCTCAAT
```

## 7.1.2 Sequenz des *oye*-Gens

```
ATGATGTCAT TTGTAAAAGA TTTTAAGCCA CAAGCTTTAG GTGACACCAA
CCTATTCAAA CCAATCAAGA TCGGGAACAA TGAACTTTTG CACCGTGCTG
TCATTCCCTCC ATTGACCAGA ATGAGAGCTC TTCACCCTGG TAATATCCCA
AACAGGGACT GGGCAGTCGA ATACTACACC CAACGTGCTC AAAGACCTGG
TACCATGATT ATCACTGAAG GTGCCTTCAT ATCCCCACAA GCCGGCGGTT
ACGATAACGC TCCAGGTGTT TGGTCGGAAG AACAAATGGT GGAATGGACC
AAAATCTTCA ACGCTATTCA TGAAAAGAAA TCGTTCGTTT GGGTTCAGTT
ATGGGTTTTG GGTGGGCTG CTTTCCCAGA CAATCTTGCC AGAGATGGTT
TGCGTTACGA TTCAGCTTCT GACAACGTTT TCATGGATGC CGAGCAAGAA
GCTAAGGCCA AGAAGGCCAA CAACCCACAA CACAGCCTAA CCAAGGACGA
AATCAAGCAA TACATTAAGG AATACGTCCA GGCTGCCAAG AACTCTATTG
CTGCTGGTGC CGATGGTGTT GAAATTCACA GTGCTAACGG TTACTTGTTA
AACCAGTTCT TGGACCCTCA TTCCAATACT AGAACCGATG AATATGGTGG
ATCTATTGAA AACAGAGCTC GTTTCACCTT GGAAGTTGTT GATGCTCTTG
TCGAAGCCAT TGGTCATGAA AAAGTTGGTT TGAGATTGTC CCCATACGGT
GTTTTCAACA GTATGTCTGG TGGTGCCGAG ACCGGCATTG TTGCCAATA
TGCTTACGTT GCTGGTGAAT TAGAAAAGAG AGCTAAAGCC GGAAAACGTT
TAGCTTTTGT TCATTTGGTT GAACCTCGTG TAACTAACCC ATTCTTGACT
GAAGGGGAGG GTGAATACGA AGGAGGTAGC AACGATTTTG TTTACTCCAT
CTGGAAGGGC CCAGTCATTA GAGCTGGTAA TTTTGCTCTC CACCCAGAAG
TCGTTAGAGA AGAAGTTAAG GACAAGAGAA CCTTGATCGG TTACGGTAGA
TTCTTCATTT CTAACCCGGA TTTGGTTGAT CGTTTGAAA AAGGTCTACC
TCTGAACAAA TATGACAGAG ATACTTTCTA CCAGATGTCT GCTCATGGTT
ATATTGACTA CCCACCTAT GAAGAAGCTC TCAAATTAGG CTGGGACAAA
AAGTAA
```

## 7.2 NMR-Spektren der Nitro-Verbindungen

Abbildung 7.1:  $^1\text{H}$ -NMR des 2-Hydroxy-2-methyl-3-nitropropanoat

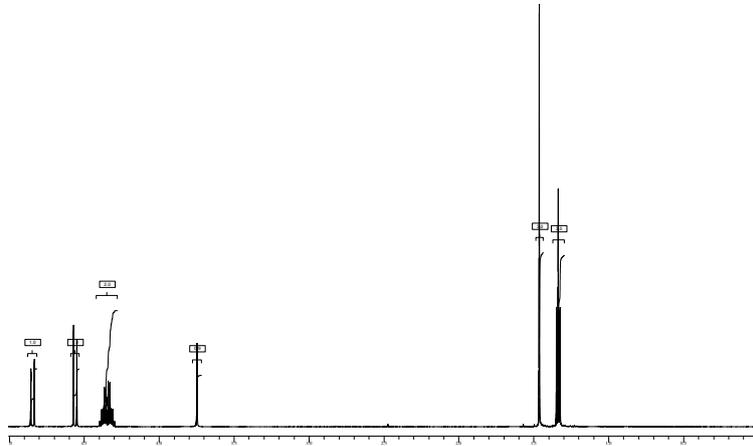
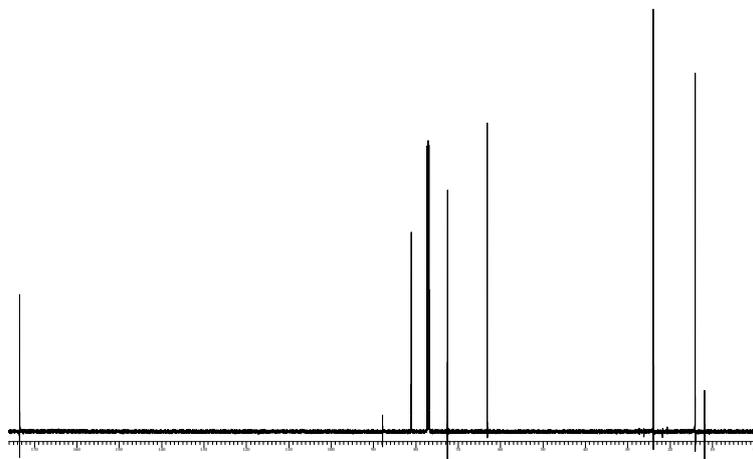
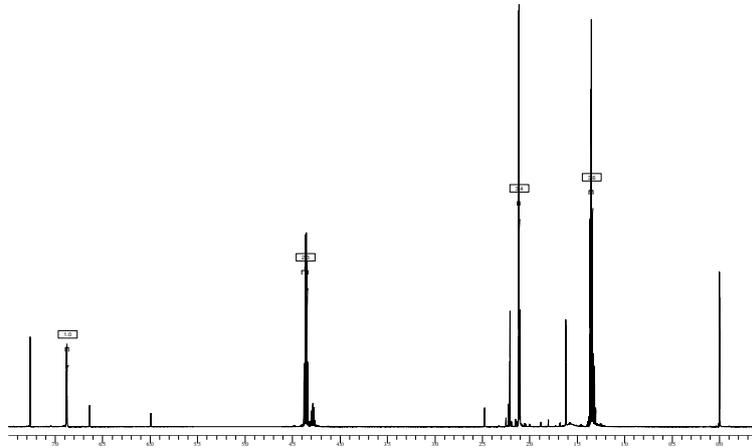
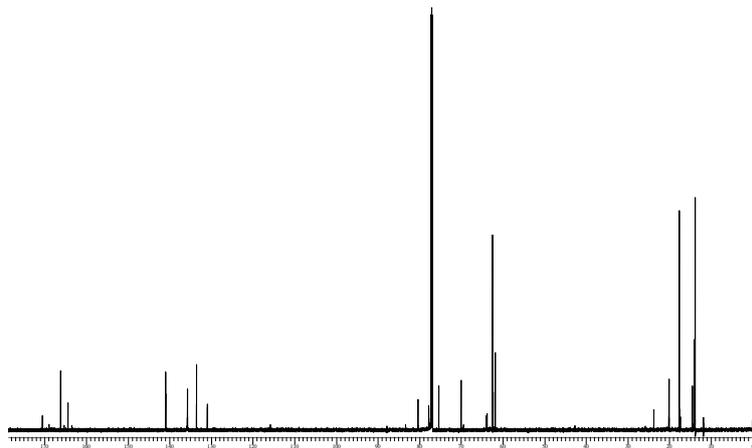
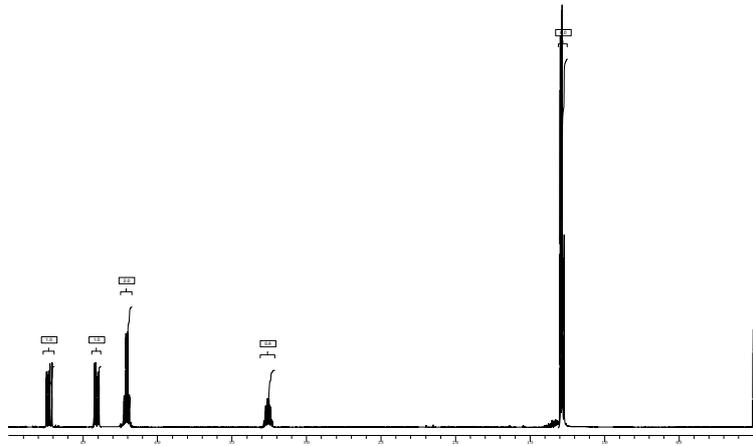
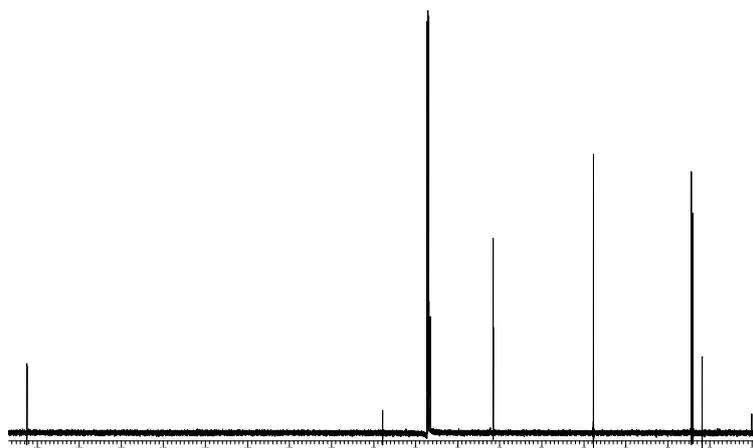


Abbildung 7.2:  $^{13}\text{C}$ -NMR des 2-Hydroxy-2-methyl-3-nitropropanoat



**Abbildung 7.3:**  $^1\text{H}$ -NMR des (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat**Abbildung 7.4:**  $^{13}\text{C}$ -NMR des (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat

**Abbildung 7.5:**  $^1\text{H}$ -NMR des Produktes der ER katalysierten Reaktion**Abbildung 7.6:**  $^{13}\text{C}$ -NMR des Produktes der ER katalysierten Reaktion

## 7.3 Chromatogramme Enantiomerenanalytik

Abbildung 7.7: (*R*)-Methylhydroxybutyrat (16,2 min) und (*S*)-Methylhydroxybutyrat (16,8 min)

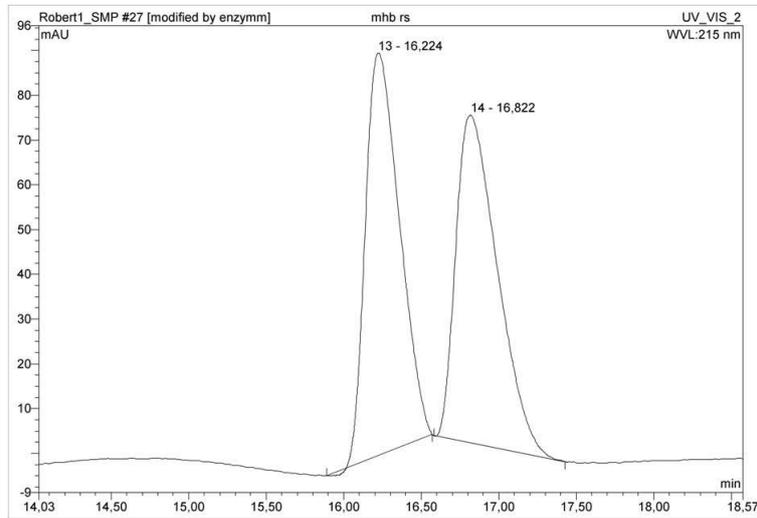
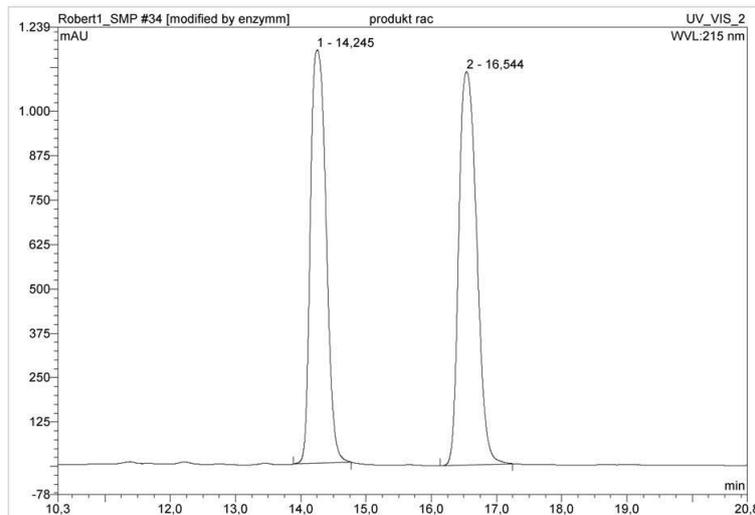


Abbildung 7.8: (*R*)-Ethyl-2-methyl-3-nitropropanoat (14,2 min) und (*S*)-Ethyl-2-methyl-3-nitropropanoat (16,5 min)







## Persönliche Daten:

Geburtstag: 28.10.1978  
Geburtsort: Perleberg

## Ausbildung und Berufstätigkeit

- 08/2011 - Post-Doc-Tätigkeit am Institut für Bio- und Geowissenschaften IBG1: Biotechnologie in der Arbeitsgruppe Biokatalyse & Biosensoren der Forschungszentrum Jülich GmbH
- 02/2008 - 07/2011 Doktorarbeit über den „Einfluss intrazellulärer Nukleotid-Cofaktoren auf Redoxreaktionen in rekombinanten Ganzzellsystemen“ am Institut für Bio- und Geowissenschaften IBG-1: Biotechnologie in der Arbeitsgruppe Biokatalyse & Biosensoren der Forschungszentrum Jülich GmbH
- 09/2003 - 10/2007 Studium der Biotechnologie mit dem Abschluss Diplom-Ingenieur Biotechnologie (FH), Diplomarbeit über die „Fermentative Herstellung von Enterokinase mit rekombinantem *Escherichia coli*“ am Institut für Biotechnologie 2 in der Arbeitsgruppe Biokatalyse der Forschungszentrum Jülich GmbH
- 07/2002 - 09/2003 Angestellt bei der Nutrinova GmbH als Biologiela­borant in der Fermentationsgruppe
- 02/2002 - 06/2002 Angestellt bei der Celanese Ventures GmbH als Biologiela­borant in der Fermentationsgruppe
- 09/1999 - 01/2002 Ausbildung zum Biologiela­boranten bei der Provadis GmbH
- 08/1998 - 08/1999 Zivildienst in der Gemeinde Pröttlin
- 06/1998 Schulabschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife, Gottfried-Arnold-Gymnasium, Perleberg