

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Fachgebiet für Biotechnologie der Naturstoffe

Immobilisierung der Carotinase AtCCD1 zur selektiven
Aromastoffproduktion und *in situ* Produktabtrennung mittels
Pervaporation

Robert Walisko

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab
2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel

Die Dissertation wurde am 29.05.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 24.09.2013 angenommen

*When push comes to shove,
what have we really learned?*

(Steve Lukather)

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Februar 2008 bis Juli 2011 in der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik des Karl-Winnacker-Institutes der DECHEMA e.V. in Frankfurt a.M. angefertigt. Auszüge dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht.

Vorträge

R. Walisko, C. Nacke, M. A. Mirata, M. Etschmann, S. Hüttmann, J. Schrader (2010)
Oxidative cleavage of carotenoids with *Arabidopsis thaliana* dioxygenase AtCCD1 for highly selective production of natural aroma compounds
8th European Symposium on Biochemical Engineering Science 2010, Bologna

Poster

R. Walisko, J. Schrader (2011)
Immobilisierung der carotenoid cleavage dioxygenase AtCCD1 zur Produktion des Aromastoffes β -Ionon und *in situ* Produktabtrennung mittels Pervaporation,
Vortrags- und Diskussionstagung: Bioverfahrenstechnik an Grenzflächen 2011, Potsdam

R. Walisko, M. A. Mirata, M. Etschmann, C. Nacke, J. Schrader (2010)
Immobilization of carotenoid cleavage dioxygenase AtCCD1 for production of volatile aroma compounds,
DECHEMA Jahreskolloquium 2010, Frankfurt a.M.

Nacke, C., Walisko, R., Schilling, M., Schrader, J. (2009)
Oxidative cleavage of carotenoids with the carotenoid cleavage dioxygenase AtCCD1 in a micellar reaction system,
ACHEMA 2009, Frankfurt a.M.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfried Schwab für die Betreuung der Arbeit, seine Hilfestellungen und für die freundliche Aufnahme und Betreuung bei meinem Aufenthalt in seiner Arbeitsgruppe im Juli 2009. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Engel und bei Herrn Prof. Dr. Peter Schieberle für ihre Mitarbeit in der Prüfungskommission.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jens Schrader für die Bereitstellung des Themas meiner Arbeit, für die Betreuung und die Möglichkeit, meinen wissenschaftlichen Horizont im Bereich der Bioverfahrenstechnik zu erweitern.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik des DECHEMA Forschungsinstitutes für eine immer produktive und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Für wissenschaftliche Hilfestellungen und freundschaftliche Diskussionen bedanke ich mich bei Dr. Dirk Holtmann, Dr. Markus Buchhaupt, Dr. Hendrik Schewe und insbesondere bei Dr. Marlene Etschmann. Frau Jia Mi danke ich für ihre vorbildliche Mitarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

Weiterhin gilt mein herzlichster Dank Dr. Martin Schilling, Dr. Marco Mirata, Dr. Christoph Nacke, Dr. Sevil Zengin-Cekic, Isabell Schmidt und Matthias Röhrig für die gemeinsam verbrachte Zeit und viele gute Gespräche sowohl zu wissenschaftlichen als auch privaten Themen.

Dr. Christian Leggewie, Dr. Dominik Behrendt und Prof. Dr. Ulrich Schwaneberg danke ich für produktive Diskussionen im Rahmen unserer regelmäßigen Projekttreffen.

Beim Bundesministerium für Bildung und Forschung bedanke ich mich für die Finanzierung des bearbeiteten Projekts.

Mein besonderer und herzlichster Dank gilt meinen Eltern. Ihr habt mir alle Möglichkeiten eröffnet, es weit zu bringen. Danke!

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Carotinoide und Carotinasen	5
3.1.1	Carotinoid-Biosynthese	5
3.1.2	Carotinoid-Spaltung	9
3.1.3	AtCCD1 und andere regiospezifische Carotinoid-Oxygenasen	13
3.2	Enzymproduktion	16
3.2.1	Hochzelldichtekultivierung von <i>Escherichia coli</i>	17
3.2.2	Rückfaltung von Einschlusskörpern.....	19
3.3	Enzymimmobilisierung	22
3.3.1	Einleitung.....	22
3.3.2	Immobilisierungsmethoden.....	23
3.3.3	Industrielle Relevanz	27
3.4	Pervaporation.....	29
3.4.1	Prinzip	29
3.4.2	Kennzahlen	31
3.4.3	Betriebsparameter	32
4	Aufgabenstellung und Zielsetzung	36
5	Ergebnisse und Diskussion	37
5.1	Produktion der <i>Arabidopsis thaliana</i> Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 (AtCCD1)	37
5.1.1	AtCCD1 Expression mittels <i>Escherichia coli</i> Hochzelldichtekultivierung	37
5.1.2	Partielle AtCCD1-Aufreinigung und Lyophilisierung	42
5.1.3	Rückfaltung von AtCCD1 Einschlusskörpern	47
5.1.4	Zusammenfassung.....	51
5.2	Produkt Detektion mittels Fluoreszenzmessung	53
5.3	Immobilisierung der AtCCD1 in Sol-Gelen	57
5.3.1	Immobilisierung in unterschiedlichen hydrophobisierten Sol-Gelen	57
5.3.2	Protein-Auswaschverhalten unterschiedlicher Sol-Gele	60
5.3.3	Optimierung der Sol-Gel Zusammensetzung	61
5.3.4	Beschichtung einer Pervaporationsmembran mit Sol-Gelen	66
5.3.5	Zusammenfassung.....	67
5.4	Immobilisierung der AtCCD1 mittels Affinitätsanbindung	68
5.4.1	Affinitätsanbindung mittels His ₆ -Tag.....	69

5.4.2	Affinitätsanbindung mittels GST-Tag	71
5.4.3	Vergleich der beiden affinitätsbasierten Methoden	72
5.4.4	Zusammenfassung	74
5.5	Pervaporation als Methode zur <i>in situ</i> β -Ionon Abtrennung	75
5.5.1	Homogener Umsatz	76
5.5.2	Heterogener Umsatz mit affinitätsimmobilisierter GST-AtCCD1	78
5.5.3	Zusammenfassung	80
6	Material und Methoden	83
6.1	Material	83
6.1.1	Chemikalien	83
6.1.2	Medien und Puffer	83
	Kultivierung und Zellaufschluss	83
	SDS-PAGE	84
	Rückfaltung	85
	His ₆ -Tag-Immobilisierung	86
	GST-Tag-Immobilisierung	86
6.1.3	Mikroorganismen	86
6.1.4	Plasmide und Antibiotikakonzentrationen	87
6.1.5	Marker für SDS-Page	87
6.1.6	Enzyme	87
6.1.7	Immobilisierungsmatrices	87
6.1.8	Kommerzielle Kits	87
6.1.9	Geräte	87
	Photometrische Messungen	87
	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	87
	Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS)	88
	Zellkultivierung und Proteinexpression	88
	Pervaporation	88
	Sonstige Geräte	88
6.1.10	Software	89
6.2	Methoden	89
6.2.1	Mikrobiologische Methoden	89
	Plasmid-Transformation	89
	Plasmidisolierung	89
	Glycerolkulturen	90
6.2.2	Proteinexpression und -analyse	90
	Expression im Erlenmeyerkolben	90
	Hochzelldichtekultivierung und Proteinexpression	90
	Proteinaufarbeitung	91

	Rückfaltung	92
	SDS-PAGE.....	92
	Proteinkonzentrationsbestimmung	93
6.2.3	Proteinimmobilisierung	94
	Sol-Gele	94
	Affinitätsimmobilisierung.....	94
6.2.4	Substratvermittlung & Aktivitätsmessungen	95
6.2.5	Pervaporation	96
	Experimentelles.....	96
	Datenauswertung	96
6.2.6	Analytik.....	97
	Photometrische Messungen.....	97
	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)	98
	Festphasenmikroextraktion (<i>solid phase microextraction</i> - SPME)	98
	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	99
	Rasterelektronenmikroskopie.....	99
	Derivatisierung des C17-Dialdehyden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin.	100
7	Literatur.....	101
8	Anhang.....	115
8.1	Plasmidkarten	115
8.1.1	pET-29a.....	115
8.1.2	pGEX-4T	116
9	Lebenslauf	117

Abkürzungsverzeichnis

3-APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
6-APA	<i>6-aminopenicillanic acid</i> (6-Aminopenicillansäure)
7-ACA	<i>7-aminocephalosporanic acid</i> (7-Aminocephalosporinsäure)
λ	Wellenlänge
Abb.	Abbildung
ACO	<i>Apocarotenoid cleavage oxygenase</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AtCCD1	<i>Arabidopsis thaliana carotenoid cleavage dioxygenase 1</i>
AtCCD4	<i>Arabidopsis thaliana carotenoid cleavage dioxygenase 4</i>
AU	<i>Absorption units</i> (Absorptionseinheiten)
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BoLCD	<i>Bixa oranella lycopene cleavage dioxygenase</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CCD(s)	<i>Carotenoid cleavage dioxygenase(s)</i>
CLEA	<i>Cross-linked enzyme aggregate</i>
CLEC	<i>Cross-linked enzyme crystal</i>
CsZCD	<i>Crocus sativus zeaxanthin cleavage dioxygenase</i>
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETMS	Ethyltrimethoxysilan
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GST	Glutathion-S-Transferase
His ₆	Hexahistidin-Tag
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilo-Dalton
Konz.	Konzentration
LB	Luria-Bertani
LOX	Lipoxygenase
M	(Größen-)Marker
Man.	Mannitol
MTMS	Methyltrimethoxysilan
Min	Minute(n)
m/v	Masse/Volumen

NCED	<i>Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase</i>
NGP	Nicht gebundene Proteinfraction
NK	Negativkontrolle
NusA	<i>N-utilizing substance A</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OsCCD1	<i>Oryza sativa carotenoid cleavage dioxygenase 1</i>
P	Pellet
PA	Polyamid
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatpuffer)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen
PEBA	Polyetherblockamid
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POMS	Polyoctylmethylsiloxan
PTFE	Polytetrafluorethylen
PTMS	Propyltrimethoxysilan
PV	Pervaporation(s-)
RdCCD1	<i>Rosa damascena carotenoid cleavage dioxygenase 1</i>
RE	Rohextrakt
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RFU	<i>Relative fluorescence units</i> (Relative Fluoreszenzeinheiten)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC	<i>Super optimal broth</i> (SOB) + Glukose
SPME	<i>Solid phase microextraction</i> (Festphasenmikroextraktion)
S-Tag	N-terminale 20 Aminosäuren der RNase A
Suc.	Sucrose
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TE	Triton-Extrakt
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
TMOS	Tetramethylorthosilicat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	(p-tert-Octylphenoxy) polyethoxyethanol
U	<i>Unit</i> (µmol/Min)
VP14	<i>Viviparous14</i> (9-cis Epoxycarotenoid-spezifische Dioxygenase aus Mais)
v/v	Volumen/Volumen
ZmCCD1	<i>Zea mays carotenoid cleavage dioxygenase 1</i>

Formelverzeichnis

<u>Zeichen</u>	<u>Bedeutung</u>	<u>Einheit</u>
α	Trennfaktor	[-]
β	Anreicherungsfaktor	[-]
ρ	Dichte	$[\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}]$
ΔH	Enthalpie	$[\text{kg}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-2}]$
A	Fläche	$[\text{m}^2]$
c	Konzentration	$[\text{kg}\cdot\text{L}^{-1}]$
m	Masse	[kg]
E_D	Aktivierungsenergie der Diffusion	$[\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}]$
E_P	Aktivierungsenergie der Permeation	$[\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}]$
EtOH	Ethanol	
F	Feed	
g	Erdbeschleunigung (9,81)	$[\text{m}\cdot\text{s}^{-2}]$
ges	Gesamt-	
i	Komponente	
j	Komponente	
J	Flussdichte	$[\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}]$
M	Membran	
MeOH	Methanol	
P	Permeat	
P+MeOH	Permeat nach Methanolzugabe	
P^*	Permeabilitätskoeffizient	$[\text{kmol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$
R	Allgemeine Gaskonstante	$[\text{kg}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-2}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}]$
S	Selektivität	[-]
S^*	Sorption	
t	Zeit	[s]
T	Temperatur	[K]
V	Volumen	[L]
w	Massenanteil	[-]
x	Massen- oder Molanteil	[-]

1 Zusammenfassung

Carotinoide sind natürliche lipophile Farbpigmente, welche in der Natur weit verbreitet sind. Das wohl bekannteste unter ihnen ist das β -Carotin. Während die Carotinoide zum einen selbst eine für den jeweiligen Organismus essentielle Rolle, zum Beispiel als lichtabsorbierende Moleküle bei der Photosynthese in Pflanzen oder als Antioxidationsmittel, spielen können, sind auch ihre Folgeprodukte wichtige Substanzen für die meisten Organismen. Insbesondere die oxidative Spaltung der Carotinoide durch eine relativ neue Enzymklasse, die *carotenoid cleavage dioxygenases (CCDs)*, führt zu wichtigen Molekülen wie Retinal, dem für den Sehvorgang in Säugern verantwortlichen Pigment, der Abszissinsäure, einem Phytohormon, sowie zu vielen volatilen Aromastoffen, wie zum Beispiel dem β -Ionon, die für die pflanzliche Fortpflanzung wichtig sind. Seit 1997 sind die verantwortlichen und zum Teil sehr regiospezifischen CCDs Gegenstand intensiver Forschung. Allerdings handelt es sich hierbei zumeist um molekularbiologische und -genetische Grundlagenforschung, während Arbeiten in Bezug auf den technischen Einsatz eher die Ausnahme darstellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum technischen Einsatz von einer der bisher am besten charakterisierten Dioxygenasen, der AtCCD1, durchgeführt. CCDs sind prinzipiell heterolog exprimierbar. Allerdings sind die Ausbeuten im Vergleich zu anderen technisch etablierten Enzymen nach wie vor unzureichend. Um Fortschritt auf diesem Gebiet zu erzielen, wurden erstmalig Hochzell-dichtekultivierungen von AtCCD1-exprimierenden *E. coli* Zellen in einem Parallelfementer-System durchgeführt. Die AtCCD1 Produktion wurde untersucht und mit bisherigen Expressionsmethoden verglichen. So konnte mithilfe eines Fed-Batch Verfahrens, mit Einsatz von Glucose Minimalmedium und Variation der Expressions-Induktion die volumetrische Aktivität etwa 4-fach gesteigert werden.

Nach optionaler partieller Aufreinigung wurde die Lagerung als Lyophilisat und der Zusatz der Lyoprotektoren Polyethylenglykol, Mannitol und Sucrose untersucht. Es zeigte sich, dass diese eine schützende Wirkung als Kryoprotektoren bei gefrorenen Enzymlösungen zeigen, aber keine Wirkung bei Lyophilisaten aufweisen.

Da ein großer Teil des überexprimierten Enzyms als katalytisch inaktive *inclusion bodies* vorliegt, wurde die Reaktivierung dieser Aggregate mittels *refolding* (Rückfaltung) untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Rückfaltung in eine katalytisch aktive Form mithilfe der *flash dilution* Methode (schnelle Verdünnung) möglich ist. Der Proteinstrang muss hierfür denaturiert, solubilisiert und rückgefaltet werden. Abschließend wird der Cofaktor Fe(II) zur endgültigen Aktivierung zugefügt.

Carotinoide können mithilfe ihres Absorptionsverhaltens quantifiziert und der Reaktionsfortschritt mit dieser Methode teilweise online verfolgt werden. Als Alternative zur

Absorptionsmessung wurde Fluoreszenz als sensitives und unempfindliches Messsignal untersucht. Es konnten spezifische Wellenlängen identifiziert und mit der Produktion des aus der oxidativen Spaltung hervorgehenden Dialdehyden korreliert werden.

Die Enzymimmobilisierung stellt für viele enzymkatalytische Prozesse einen entscheidenden Schritt zur Ökonomisierung des Verfahrens dar. Aus diesem Grund wurde die Immobilisierung von AtCCD1 in unterschiedlichen Sol-Gelen und mittels zweier affinitätsbasierter Methoden (His₆-Tag und GST-Tag) untersucht. Im Fall der Sol-Gele wurde gezeigt, dass eine gezielte Hydrophobisierung der Gele durch geeignete Silan-Monomere förderlich für die Enzymaktivität ist. Die entscheidenden Einflüsse stellen hierbei die Porösität beeinflussende Polymerisationsverhalten der Gele sowie die Interaktion der substrathaltigen Mizellen mit der Geloberfläche dar.

Auch die Affinitätsanbindung von AtCCD1 an entsprechende Matrices resultierte in katalytisch aktiven Immobilisaten. Zu Optimierungszwecken wurde im Fall der His₆-Anbindung der Effekt von Imidazol kombiniert mit einer Mehrfachbeladung der Matrix untersucht. Der Einsatz von Imidazol erlaubt zwar eine spezifischere Beladung durch das Zielenzym, allerdings sind höhere absolute Mengen an immobilisierter AtCCD1 durch eine Mehrfachbeladung ohne Imidazol erzielbar. Im Fall der GST-Anbindung wurden die Zusätze Dithiothreitol und Triton X-100 auf ihren Effekt hinsichtlich der Affinitätsanbindung untersucht. Da es sich beim GST-Tag um ein Polypeptid handelt, wurde auch der Einfluss des Energieeintrags beim Zellaufschluss auf die Immobilisierungseffizienz betrachtet. Beste Ergebnisse wurden durch kombinierten Einsatz von Triton X-100 und maximalem Energieeintrag erzielt.

Der Vergleich beider affinitätsbasierter Methoden zeigte eine deutliche Überlegenheit des GST-Immobilisates. Nach Normalisierung auf gleiches Matrixvolumen wurde etwa 5x mehr GST-AtCCD1 immobilisiert als AtCCD1-His₆. Die Aktivität des GST-Immobilisates lag etwa um den Faktor 24 höher als die des His₆-Immobilisates.

Aufgrund der Volatilität, Hydrophobizität und enzyminhibierenden Wirkung des Zielproduktes β -Ionon wurde die organophile Pervaporation als mögliche selektive *in situ* Produktabtrennungsmethode untersucht. Sowohl im Fall von β -Ionon Modelllösungen als auch von homogen und heterogen enzymatisch hergestelltem β -Ionon konnte die Eignung der gewählten Methode nachgewiesen werden.

Die prinzipielle Eignung von AtCCD1 als immobilisiertes technisches Enzym konnte im Rahmen dieser Arbeit somit gezeigt werden, und die Möglichkeit für weitergehende anwendungsorientierte Forschungsarbeiten wurde auch für andere interessante Carotinasen eröffnet.

2 Summary

Carotenoids are natural lipophilic pigments that are ubiquitous in nature, one of the best-known members being β -carotene. Not only do carotenoids play essential roles in many organisms as light-harvesting molecules during photosynthesis in plants or as antioxidative agents but their secondary products comprise important products for most organisms as well. Notably, the oxidative cleavage of carotenoids by the relatively new class of enzymes called carotenoid cleavage dioxygenases (CCDs) leads to important molecules such as retinal, the pigment responsible for vision in mammals, to the phytohormone abscisic acid and to plenty of volatile aroma compounds, such as β -ionone, important for plant reproduction. The responsible and to some extent very regiospecific CCDs are in focus of intensive research since 1997. Most of the work however deals with fundamental research about the molecular biology and molecular genetics of the enzymes, while approaches towards technical applicability are exceptions.

In the present work the technical application of so far one of the best characterised CCDs, the AtCCD1, was investigated. Carotenoid cleaving oxygenases can in principle be expressed heterologously. Nevertheless, in comparison to other established enzymes of industrial importance the yield is still insufficient. High cell density cultivations of *E. coli* in a parallel fermenter system were performed and AtCCD1 production was determined and compared to current expression methods to overcome this bottleneck. The volumetric enzyme activity was increased 4-fold by using minimal glucose medium in a fed-batch process and variation of the expression induction. Thereafter, lyophilisation and the effect of the lyoprotectants polyethyleneglycol, mannitol and sucrose on the enzyme storage were investigated after an optional partial purification. It appeared that the additives only have effects as cryoprotectant on frozen AtCCD1 preparations but not on lyophilisates.

Since a major part of the expressed protein is present in the form of catalytically inactive inclusion bodies, the reactivation of these aggregates by refolding was investigated. By applying the method of flash dilution refolding was successfully performed. To achieve this the protein has to be denatured, solubilised and refolded. For final activation iron(II) must be added after the refolding procedure. Use of iron(III) does not lead to active protein.

Carotenoid quantities and progress of carotenoid cleavage reactions can be monitored online with the help of carotenoid absorption. Additionally fluorescence measurements were investigated as a sensitive and robust alternative detection method. Specific wavelenghts were identified and correlated to the appearance of a dialdehyde resulting from oxidative carotenoid cleavage.

The immobilisation of enzymes is a crucial step for many catalytic processes to become economically feasible. Therefore, both immobilisation of AtCCD1 in different sol-gels and by two affinity-based immobilization methods (His₆-tag and GST-tag) was investigated.

As to the sol-gels a targeted hydrophobisation of the gels by adequate silane monomers proved to have a beneficial effect on enzymatic activity. Essential parameters include the polymerisation behaviour with the resulting porosity of the gels and the interaction of substrate loaded micelles with the sol-gel surface.

The affinity attachment of AtCCD1 to appropriate matrices led to catalytically active immobilisates as well. For optimization purposes on the His₆ based immobilisation the influence of imidazole addition in combination with repeated loadings of the matrix were tested. Use of imidazole as an additive allows for higher specific loading of the target enzyme, albeit highest absolute amounts of immobilised AtCCD1 are accomplished by repeated loading of the protein solution on the matrix without using imidazole. In case of GST attachment the effect of the additives dithiothreitol and Triton X-100 was tested. As the GST-tag itself is a protein the impact of different applications of energy during cell disruption on immobilisation efficiency was examined. Best results were achieved by combined use of Triton X-100 and maximum application of energy.

Comparison of both affinity based immobilisation methods showed clear superiority of the GST immobilisation. After normalisation to equal matrix volumes 5 times more molar GST-AtCCD1 was immobilised compared to AtCCD1-His₆. The activity of the GST immobilisate was 24-fold higher compared with the His₆ immobilisate.

Based on the volatility and lipophilic properties of the target product β -ionone organophilic pervaporation was explored as a potential method of selective *in situ* product recovery. Eligibility of the chosen method was proven by successful pervaporation of model solutions of β -ionone and homogeneously and heterogeneously produced enzymatic product.

The general applicability of the carotenase AtCCD1 as potential technical immobilised enzyme was demonstrated in this work and the possibility for continuative work in this field including further carotenases was opened up.

3 Einleitung

3.1 Carotinoide und Carotinasen

3.1.1 Carotinoid-Biosynthese

Carotinoide sind natürliche lipophile Pigmente, die in allen Lebewesen essentielle Funktionen ausüben. Bisher wurden über 700 dieser meist gelben, orangenen bis hin zu tief roten Moleküle in der Natur identifiziert. Eines der bekanntesten und am häufigsten in der Natur anzutreffenden Carotinoide ist das β -Carotin (Britton 1995; Meyer 2002). Obwohl sie in allen Lebewesen vorzufinden und lebenswichtig sind, können sie nur von Algen, photosynthetisch aktiven Bakterien, Pilzen und Pflanzen synthetisiert werden. Menschen und Tiere sind auf die Aufnahme über die Nahrung angewiesen (Jucker 2011). Formal setzt sich ein Carotinoid aus acht Isopreneinheiten zusammen und bildet somit ein Grundgerüst aus vierzig Kohlenstoffatomen – ein Tetraterpen. Untergruppen der Carotinoide sind die oxyfunktionalisierten Xanthophylle und die durch oxidative Spaltung entstehenden Apocarotinoide (Abb. 3-1).

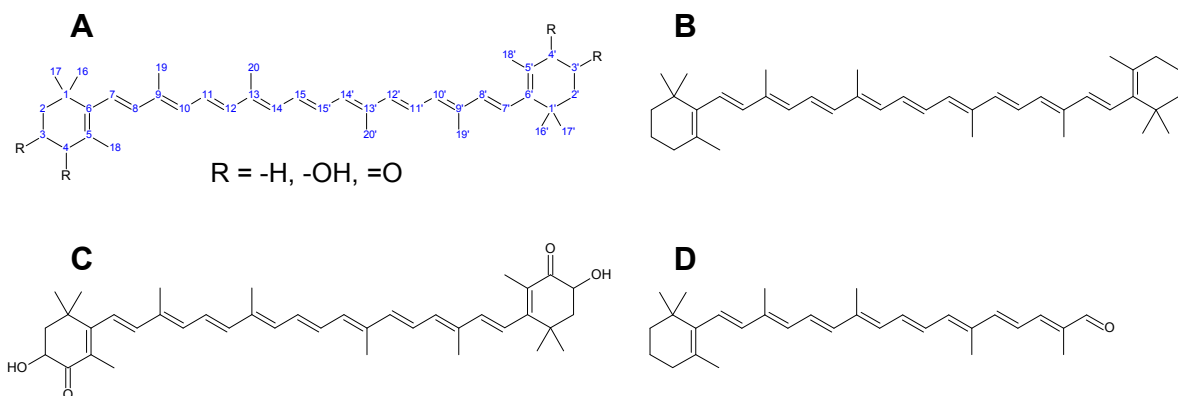


Abb. 3-1 Grundformen der Carotinoide

- A:** C-40 Basisstruktur mit IUPAC Nummerierung
- B:** β -Carotin
- C:** Astaxanthin (Beispiel für Xanthophylle)
- D:** β -Apo-8'-Carotenal (Beispiel für Apocarotinoide)

Die natürliche Funktion dieser Moleküle umfasst die Lichtabsorption bei der Photosynthese, eine antioxidative Wirkung sowie das Vorkommen als Vorläufer für bestimmte Spaltprodukte. Beispielhaft seien hier das Phytohormon Abszisionsinsäure, welche wachstumsregulierende Funktion in Pflanzen hat, und das Vitamin A (Retinal), welches für die Sehfunktion in Säugetieren unabdingbar ist, genannt. Etwa 50 der bekannten Carotinoide können als Provitamin A fungieren (Jucker 2011). Sowohl für die antioxidative Wirkung als auch für die photochemischen Eigenschaften der Caro-

tinoide ist das ausgedehnte π -Elektronensystem von entscheidender Bedeutung (Britton 1995).

In den letzten Jahren haben Carotinoide wegen ihrer antioxidativen Wirkung als potentielle Prophylaxe- und Anti-Aging-Mittel an Interesse gewonnen. Sie sind möglicherweise wirksam gegen Krebs, Herz- und Augenleiden. Ihr industrieller Einsatz beschränkt sich zur Zeit aber als Nahrungsergänzungsmittel und Farbstoff in der Lebensmittel- und Futterindustrie (Meyer 2002). Die Kombination dieser beiden Zweige führte zur Entwicklung von „Goldenem Reis“, welcher einen hohen β -Carotin Gehalt aufweist und in Dritte-Welt-Ländern als Grundnahrungsmittel die Kindersterblichkeit und Augenleiden reduzieren soll (Walter et al. 2009).

Die Biosynthese der Carotinoide findet in Pflanzen in den Plastiden statt und entspringt dem Isoprenoid-Stoffwechsel (Cunningham et al. 1998). Allgemein betrachtet erfolgt die Synthese über die in Abb. 3-2 dargestellten Zwischenstufen.

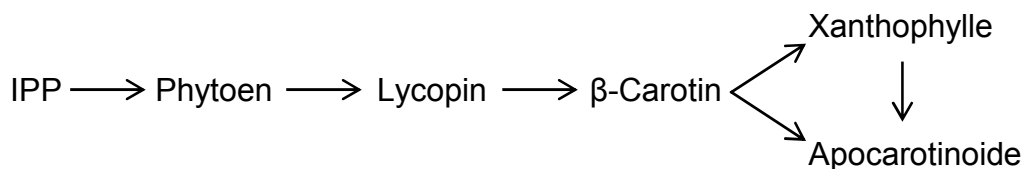


Abb. 3-2 Stufen der Synthese von Carotinoiden aus Isopentenylidiphosphat-Einheiten (IPP)

Ausgehend vom universalen Bildungsblock der Terpenbiosynthese, dem Isopentenylidiphosphat (IPP), werden die längerkettigen Moleküle durch Kopf-Schwanz-Verknüpfung sukzessive aufgebaut (Cunningham et al. 1998). Bei der Syntheseinitiation erzeugt eine Isopentenylidiphosphatisomerase (*IPI*) aus einem IPP ein Molekül Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Eine Geranylgeranyl-diphosphatsynthase (*GGPS*) addiert insgesamt 3 weitere IPP-Einheiten an das DMAPP. Es entstehen Geranyl-diphosphat, Farnesyl-diphosphat und Geranylgeranyl-diphosphat. Der erste Reaktionsschritt beziehungsweise die ersten beiden Reaktionsschritte können alternativ von einer Geranylphosphatsynthase (*GPS*) beziehungsweise einer Farnesylphosphatsynthase (*FPS*) katalysiert werden. Zwei der C₂₀-Körper werden durch die Phytoensynthase (*PSY*) zum Phytoen verknüpft. Das carotinoidtypische C₄₀-Grundgerüst entsteht (Abb. 3-3). Wie einige andere Enzyme des späteren Carotinoide-Anabolismus agiert die *GGPS* als Homodimer während die *IPI* als Monomer vorliegt (Dogbo et al. 1987).

Im Folgenden wird das Phytoen schrittweise zum Lycopin desaturiert und zum β -Carotin zyklisiert (Abb. 3-4). Die Phytoendesaturase (*PDS*) fügt in zwei Schritten mit Phytofluene als Zwischenprodukt zwei neue Doppelbindungen an den C₁₁-C₁₂ und C_{11'}-C_{12'} Atomen ein. Es entsteht ζ -Carotin. Analog dazu folgt die weitere Desaturierung durch die ζ -Carotindesaturase (*ZDS*) an den C₇-C₈ und C_{7'}-C_{8'} Positionen über Neurosporen zu Lycopin. Durch das so sukzessiv ausgedehnte konjugierte π -

Elektronensystem wird das farblose Phytoen zum pinkfarbenen Lycopin (Cunningham et al. 1998).

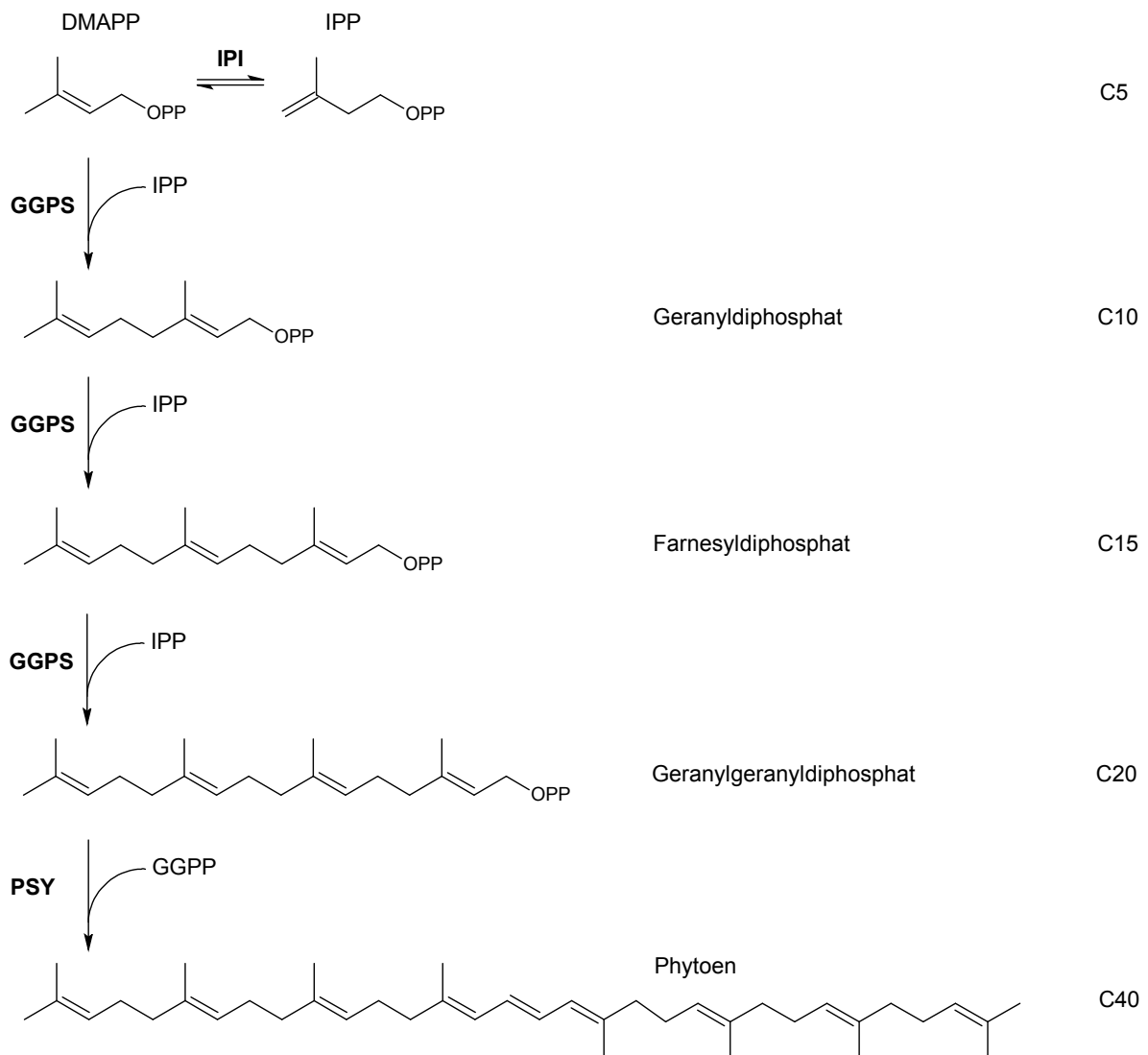


Abb. 3-3 Synthese von Phytoen aus Isopentenylidiphosphat-Einheiten (IPP)

Das C40-Grundgerüst der Carotinoide wird aus C5-Einheiten durch die Enzyme Isopentenylidiphosphatisomerase (*IPI*), Geranylgeranyldiphosphatsynthase (*GGPS*) und Phytoensynthase (*PSY*) erzeugt (Cunningham et al. 1998). OPP steht als Abkürzung für den Diphosphatrest.

Im finalen Biosyntheseschritt zum β -Carotin zyklisiert eine Lycopin β -Cyclase (*LCYB*) die beiden Moleküleenden des Lycopins mit γ -Carotin als Zwischenprodukt. Durch den kombinierten Einsatz mit einer homologen Lycopin ϵ -Cyclase können auch α -Carotin, δ -Carotin und ϵ -Carotin synthetisiert werden.

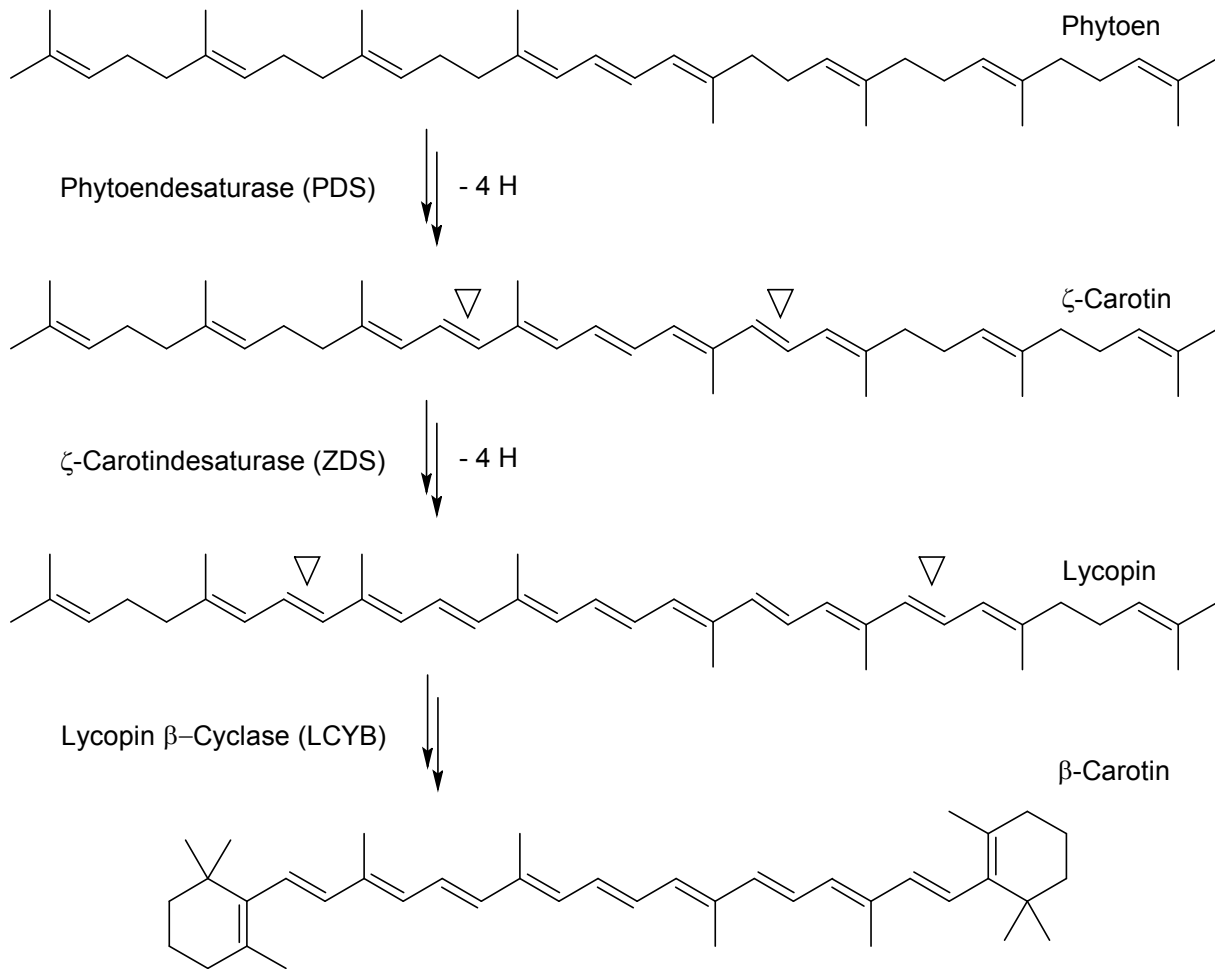


Abb. 3-4 Synthese von β -Carotin aus Phytoen

Das lineare Phytoen wird in 4 Schritten von der Phytoendesaturase (*PDS*) und der ζ -Carotindesaturase (*ZDS*) desaturiert und anschließend durch die Lycopin β -Cyclase (*LCYB*) zum β -Carotin zyklisiert (Cunningham et al. 1998).

Aus α - und β -Carotin können im Weiteren durch Oxyfunktionalisierung der Ringenden die Xanthophylle synthetisiert werden (Abb. 3-5). Wichtige Vertreter dieser Untergruppe der Carotinoide sind zum Beispiel Lutein, Astaxanthin, Canthaxanthin und Zeaxanthin. Einige der ersten Untersuchungen zur Biosynthese von Xanthophyllen beschäftigten sich mit den an der Astaxanthin-Synthese beteiligten Genen in Mikroorganismen und Pflanzen (Kajiwara et al. 1995; Sun et al. 1996; Fraser et al. 1997; Cunningham et al. 1998). Es konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass die kombinierte Aktivität von Hydroxylasen und Ketolasen bei Akzeptanz unterschiedlicher Substrate zur Produktion von Astaxanthin und seinen Vorläufern führt. Eine N-terminale Sequenz von 130 Aminosäuren einer β -Carotin Hydroxylase aus *Arabidopsis thaliana* führte zu der Annahme, dass die Enzyme der Xanthophyll-Biosynthese als Homodimere agieren (Sun et al. 1996). Nachdem diese Sequenz entfernt worden war, blieb die Hydroxylase zwar aktiv, fügte allerdings nur noch an einem der angebotenen β -Ringe die Hydroxylierung an, was zur Bildung von

β -Cryptoxanthin führt. Mit der Signalsequenz war β -Carotin noch beidseitig zu Zeaxanthin umgesetzt worden.

Sequenzuntersuchungen unterschiedlicher Hydroxylasen und Ketolasen, *in vitro* Aktivitätsmessungen und Lokalisierung der Produkte *in vivo* legen nahe, dass es sich bei diesen Enzymen um Transmembranproteine handelt, welche molekularen Sauerstoff als Cofaktor benötigen und mittels mehrerer Histidine koordiniertes Eisen im aktiven Zentrum enthalten (Fraser et al. 1997; Cunningham et al. 1998).

Neuere Untersuchungen in *Xanthophyllomyces dendrorhous* zeigen, dass die Hydroxylase- und Ketolase-Aktivität auch von einem einzelnen Enzym, der Astaxanthin-Synthase (ASY) katalysiert werden kann (Ojima et al. 2006; Schmidt et al. 2011).

Ein weiteres zentrales Enzym der Xanthophyll-Biosynthese stellt die Zeaxanthin-Epoxidase (ZEP) dar, welche die Synthese epoxidierter Carotinoide wie Violaxanthin und Neoxanthin, sowie von Folgeprodukten wie Capsanthin und Capsorubin einleitet (Cunningham et al. 1998; Latowski et al. 2002; Latowski et al. 2004).

3.1.2 Carotinoid-Spaltung

Während Carotinoide zum einen selbst eine essentielle Rolle z.B. bei der Lichtabsorption für die Photosynthese oder als antioxidative Agezien spielen, dienen sie auch als Substrate für Carotinoid spaltende Enzyme und somit als Vorläufer für weitere wichtige natürliche Produkte. Aus der enzymatisch oxidativen Spaltungsreaktion der Carotinoide gehen meistens Apocarotinoide, welche als Farbstoffe dienen können, aber auch volatile Signalmoleküle hervor, die als Duftstoffe von Pflanzen sekretiert werden.

Das wohl bekannteste und am längsten erforschte Spaltprodukt des β -Carotins ist das Vitamin A (Retinal). Es wird in seiner 11-*cis*-Konformation kovalent an ein Polypeptid gebunden und liegt als Sehpigment Rhodopsin in der Retina vor. Bei Absorption eines Lichtquants isomerisiert das Retinal zum *all-trans*-Retinal und induziert so einen elektrischen Impuls, welcher die Grundlage des Sehvorgangs darstellt. Erste Untersuchungen zur Retinal Entstehung wurden bereits in den 1920er Jahren an Vitamin-A defizienten Ratten durchgeführt (Moore 1930). Die Lebensdauer dieser Tiere konnte durch das Füttern mit Karotten signifikant verlängert werden, woraus geschlossen wurde, dass die Vitamin A Insuffizienz durch Abbau der Carotinoide kompensiert werden kann.

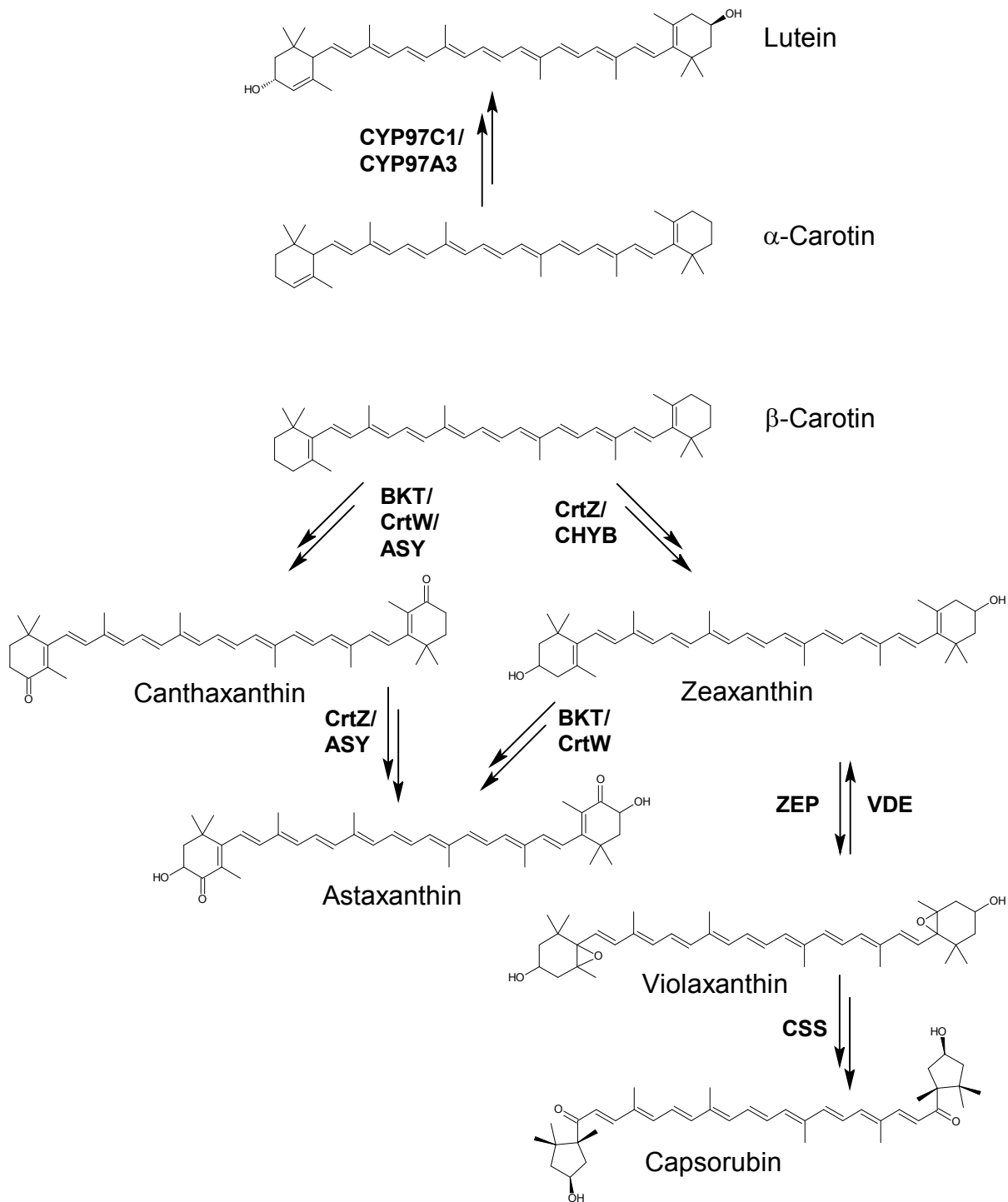


Abb. 3-5 Synthese von einigen bedeutenden Xanthophyllen

Ausgehend von α -Carotin und β -Carotin werden *in vivo* einige wirtschaftlich interessante Xanthophylle synthetisiert. Die hieran beteiligten Enzyme sind die Hydroxylasen *CYP97C1* und *CYP97A3* zur Lutein-Biosynthese, die β -Carotin Hydroxylasen *CrtZ* und *CHYB* zur Synthese von Zeaxanthin und Astaxanthin, die β -Carotin Ketolasen *BKT* und *CrtW* zur Canthaxanthin- und Astaxanthin-Synthese, die Astaxanthin-Synthase *ASY* sowie die Zeaxanthin Epoxidase *ZEP*, die Violaxanthin Deepoxidase *VDE* und die Capsanthin/Capsorubin Synthase *CCS* (Fraser et al. 1998; Sandmann 2001; Fraser et al. 2004; Kim et al. 2006; Ojima et al. 2006).

Nähere Untersuchungen in den 1960er Jahren zielten darauf ab, die Vitamin A Produktion durch β -Carotin-Spaltungsaktivität von Enzymen *in vitro* nachzuweisen (Olson et al. 1965). Hierfür wurden Enzym-Rohextrakte aus Ratten-Leber, -Niere und -Darm hergestellt und mit β -Carotin versetzt. In der zytoplasmatischen Fraktion von Darm und Leber konnte die enzymatische Entstehung von Retinal nachgewiesen werden. Obwohl zu dieser Zeit keine reinen Enzympräparate vorlagen und bestenfalls durch Ammoniumsulfatfällung teilgereinigte Enzymfraktionen verwendet wurden (Goodman et al. 1967), wurde bereits früh die Sauerstoff- und Eisenabhängigkeit der enzymatischen Reaktion vermutet und erkannt. Ebenso wurde frühzeitig ein Dioxygenase-Mechanismus angenommen und Markierungsexperimente zur Verifizierung dieser Annahme durchgeführt (Olson et al. 1965; Goodman et al. 1966).

In den 1970er Jahren wurden photometrische *in vitro* Messmethoden im Zusammenhang mit der cooxidativen unspezifischen Carotinoidspaltung entwickelt. Hierfür wurden eine Lipoxygenase, Cytochrom C und eine Peroxidase eingesetzt (Ben Aziz et al. 1971).

Die finale Lücke der Vitamin A Produktion aus β -Carotin wurde im Jahr 2000 durch die molekulare Identifikation und Klonierung der Dioxygenase β -Diox aus *Drosophila melanogaster* geschlossen (von Lintig et al. 2000). Hierfür wurden *E. coli* Stämme eingesetzt, denen durch Transformation mit β -Carotin Synthesegenen aus *Erwinia herbicola* die Fähigkeit zur β -Carotin Produktion übertragen worden war. Wurde zusätzlich das genetische Material der β -Diox in diese Organismen transformiert, war eine optische Entfärbung der Kolonien erkennbar und analytisch die Entstehung des erwarteten Retinals nachweisbar. Der Einsatz solcher Carotinoid synthetisierender Bakterien und die optisch nachvollziehbare Farbänderung bei bestimmten enzymatischen Reaktionen ist heute weit verbreitet und wird Farbkomplementations-Assay genannt.

Wenig später konnte ein homologes Enzym aus der Maus isoliert und kloniert werden, welches ebenfalls die zentrale Spaltung von β -Carotin zu Retinal katalysiert (Redmond et al. 2001). Während Säugetiere also nicht in der Lage sind, Carotinoide *de novo* herzustellen, können sie Apocarotinoide und andere Spaltprodukte sehr wohl synthetisieren (Auldridge et al. 2006b).

Der Aufklärung des finalen Vitamin-A Biosyntheseschrittes ging die Klonierung der VP14 genannten Dioxygenase aus Mais voraus, deren Sequenzaufklärung der zentrale Durchbruch für die Entdeckung und Charakterisierung vieler weiterer Carotinoid spaltender Oxygenasen war und die Erforschung der Synthesewege von vielen Molekülen ermöglichte (Tan et al. 1997; Schwartz et al. 2001). Das VP14 Enzym gehört zur Untergruppe der *nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenases* (NCEDs, vgl. Abs. 3.1.3), zeigt Sequenzhomologie zur Lignostilben Dioxygenase (LSD) und spaltet Violaxanthin und Neoxanthin regiospezifisch zu Xanthoxin und einem C-25 Apoaldehyd. Xanthoxin ist der Vorläufer des Pflanzenhormons Abszissinsäure, welche stress-

regulatorische Funktionen in Pflanzen ausübt und deren Entstehung aus Carotinoid-Vorläufern lange vermutet und erforscht wurde. Möglicherweise stellt die durch VP14 katalysierte Spaltungsreaktion den zentralen regulatorischen Schritt bei der Abszinsäure Produktion dar (Tan et al. 1997). Ähnlich wie die Enzyme der Carotinoid-Synthese ist auch VP14 von Sauerstoff und Eisen sowie zusätzlich von der 9-*cis*-Konfiguration der gespaltenen Doppelbindung abhängig.

Neben der regiospezifischen Carotinoidspaltung *in vivo* (s. auch Abs. 3.1.3) war bisher der cooxidative *in vitro* Abbau von Carotinoiden insbesondere zu Aromastoffen wie β -Ionon oder Vorläufern von β -Damascenon und Safranal von biotechnologischem Interesse. Die beiden erstgenannten Substanzen weisen für den Menschen mit 0,007 $\mu\text{g/L}$ bzw. 0,009 $\mu\text{g/L}$ Wasser sehr niedrige Riechschwellen auf und sind für die Parfüm-, Aroma- und Lebensmittelindustrie von großem Interesse (Zorn et al. 2003a). Allerdings ist die Extraktion aus natürlichen Quellen schwierig und teuer, was die Entwicklung von biotechnologischen Produktionsmethoden nahelegt (Waché et al. 2001). Da β -Ionon ohne weitere enzymatische Schritte direkt aus der Carotinoid-Spaltung hervorgeht, konnte dessen Synthese auf cooxidativem Weg bereits gezeigt und patentiert werden (Wu et al. 1999; Winterhalter et al. 2001). Bei diesem Verfahren wird z.B. eine Lipoxygenase (LOX) aus Soja zur Spaltung des Cosubstrates Linsäure eingesetzt. Dabei entstehen Sauerstoff-Radikale, welche wiederum das eigentliche Substrat β -Carotin entlang des Polyengerüstes spalten. Da dies unspezifisch passiert, entsteht ein Gemisch an Produkten, was einen entscheidenden Nachteil gegenüber der regiospezifischen Spaltung darstellt, bei der die relativen Ausbeuten deutlich höher liegen.

Als Alternative zur LOX wurde eine Xanthin Oxidase für die biotechnologische cooxidative Produktion von Aromastoffen eingesetzt (Waché et al. 2001). Diese akzeptiert über 100 unterschiedliche Substrate und ermöglicht den Einsatz unterschiedlicher kostengünstiger Aldehyde für die Generierung der reaktiven Sauerstoffspezies. Durch die unterschiedliche Reaktivität dieser Moleküle mit β -Carotin ist trotz des unspezifischen Mechanismus durch geschickte Wahl des Cosubstrates eine gewisse Beeinflussung hin zu den gewünschten Produkten realisierbar. Mögliche Produkte sind Aldehyde wie Geranial oder β -Cyclocitral, Ketone wie β -Ionon, Lactone und Epoxide.

Außerdem konnte Neoxanthin auf diese Weise unter anderem zum Grashopper Keton gespalten werden, welches die Vorstufe vom industriell interessanten β -Damascenon ist.

Ein weiterer Fortschritt in der Aromastoffproduktion durch enzymatische Carotinoidspaltung war die erste molekulare Charakterisierung eines mikrobiellen Enzyms, welches Carotinoide direkt aber ebenfalls regio-unspezifisch abbaut. Hierfür wurden über 50 Pilzstämmen auf β -Carotin haltigem Wachstumsagar auf eine Entfärbungsreaktion gescreent (Zorn et al. 2003a). 10 positive Stämme wurden identifiziert und de-

ren mycelfreie Überstände auf β -Carotin Spaltung *in vitro* getestet. Alle waren hier ebenfalls positiv. Im folgenden konnte eine Peroxidase aus *Lepista irina* identifiziert und charakterisiert werden (Zorn et al. 2003b), welche β -Carotin unter anderem zu β -Ionon, β -Cyclocitral (Vorläufer von Safranal) und β -Apo-10'-Carotenal spaltet. Hierbei konnten sowohl mit Rohextrakt als auch mit aufgereinigtem Enzym deutlich höhere Produktausbeuten im Vergleich zum cooxidativen Mechanismus mit der Xanthin Oxidase erreicht werden.

3.1.3 AtCCD1 und andere regiospezifische Carotinoid-Oxygenasen

Mit der erfolgreichen Klonierung der VP14 und den folgenden Entdeckungen zahlreicher sequenzhomologer carotinoidspaltender Oxygenasen wurde die regiospezifische Spaltung interessant und Gegenstand intensiver Forschung (vgl. Abb. 3-6). Mit Hilfe von degenerierten Primern wurden zahlreiche Enzyme entdeckt, die für die spezifische Bildung von biologisch wichtigen Produkten wie β -Ionon, β -Cyclocitral, Retinal, Abszinsäure, Stringolacton, Mycorradicin oder Blumenin verantwortlich sind (Auldrige et al. 2006b). Aus *A. thaliana* wurden im weiteren Verlauf neun Carotinasen entdeckt, die signifikante Sequenzhomologien zum Vp14-Gen aufweisen. Dabei handelt es sich um 5 zur NCED-Untergruppe und 4 zur CCD-Untergruppe gehörende Oxygenasen (AtNCED2/3/5/6/9 bzw. AtCCD1/4/7/8) (Auldrige et al. 2006a). Das Interesse an den Enzymen dieser Familie besteht, weil sie mögliche technische Biokatalysatoren darstellen, die sehr spezifisch den biotechnologischen Zugang zu begehrten natürlichen Aromastoffen wie z.B. dem β -Ionon erlauben (Winterhalter 1996; Winterhalter et al. 2001). Darüber hinaus ist bei Verwendung von natürlichen Substraten die explizite Deklaration der Produkte als „natürlich“ von aktuellem wirtschaftlichem Interesse (Rodríguez-Bustamante et al. 2007).

Intensiv untersucht und charakterisiert wurde die symmetrisch an den 9-10 und 9'-10' Doppelbindungen von β -Carotin spaltende AtCCD1 (Schwartz et al. 2001). Trotz ihrer Regiospezifität akzeptiert sie eine Reihe unterschiedlicher Substrate wie β -Carotin, Lutein, Zeaxanthin, *trans*-Violaxanthin, 9-*cis*-Violaxanthin, 9-*cis*-Neoxanthin und unterschiedliche Apocarotinoide. Dieses Verhalten resultiert in der Entstehung unterschiedlicher Produkte, was das Enzym aus biotechnologischer Sicht interessant macht. Mit einem technischen Enzym kann auf diese Weise bei Variation der natürlichen Substrate eine Vielfalt an natürlichen Produkten erzielt werden. So wurde die *in vitro* Aktivität systematisch untersucht und die rekombinante Expression in *E. coli* verbessert. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von kurzkettigen aliphatischen Alkoholen die Aktivität im wässrig-mizellaren System steigert, die Fusion an Löslichkeitsvermittelnde Tags die Expression verbessert (Schilling et al. 2007) und der Einsatz von Tensiden bei der Proteinaufarbeitung die Ausbeuten und Aktivitäten erhöht (Schilling et al. 2008).

Wegen uneindeutiger Ergebnisse war lange unklar, ob es sich bei der AtCCD1-Spaltungsreaktion um einen Mono- oder Dioxygenasemechanismus handelt. Es war zwar früh bekannt, dass Eisen(II)-Ionen und molekularer Sauerstoff für die Spaltreaktion vieler Carotinoid-Oxygenasen nötig sind, allerdings nicht die genaue Herkunft der Sauerstoffatome in den Spaltprodukten (Kloer et al. 2006). Mit Hilfe von Markierungsexperimenten ($^{18}\text{O}_2$ und H_2^{18}O) und insbesondere der Sauerstoff-Austauschkinetik des entstehenden Dialdehyden mit Wasser konnte der Dioxygenasemechanismus bestätigt werden (Schmidt et al. 2006).

Ein weiterer wichtiger Schritt für das Verständnis der AtCCD1 und anderer Carotinasen war die Kristallisation und Strukturaufklärung der cyanobakteriellen Apocarotenoid-15,15'-oxygenase (ACO) aus *Synechocystis* (Kloer et al. 2005). Die entscheidenden Erkenntnisse dieser Arbeit waren die bereits vermutete Fixierung von Eisen(II)-Ionen im aktiven Zentrum durch vier hoch konservierte Histidin-Reste, die Existenz eines Substratkanals, der mit hydrophoben Aminosäureresten ausgekleidet ist und so die Aufnahme der stark hydrophoben Substrate ermöglicht sowie die Präsenz eines hydrophoben Bereiches an der Enzymoberfläche, der vermutlich das Eintauchen in eine Membran und somit Zugang zu den hydrophoben Substraten ermöglicht.

Eine auf Sequenzhomologie basierende Modellierung der AtCCD1 legt vergleichbare Charakteristika nahe (Nacke 2011).

Lokalisierungsstudien der *Arabidopsis* Carotinasen zeigten, dass die NCEDs in Chloroplasten importiert werden, während dies mit AtCCD1 nicht passiert. Stattdessen assoziiert diese mit der äußeren Chloroplastenmembran und gewährleistet so die Substrataufnahme (Tan et al. 2003).

Während qualitative Studien im *in vivo* Farbkomplementationsassay gute Ergebnisse bringen, muss für eine quantitative technische Nutzung eher der *in vitro* Ansatz herangezogen werden, da hier höhere Substratkonzentrationen einsetzbar sind als im limitierten *in vivo* System (Fraser et al. 2004).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die *in vitro* Analysen zur biotechnologischen Verwertung der AtCCD1 hauptsächlich in Mizellen oder Liposomen durchgeführt, da diese Arten der Substratvermittlung eine gewisse Anlehnung an die natürliche Enzymumgebung erlauben (Schilling et al. 2007; Schilling et al. 2008; Nacke et al. 2011). Detaillierte Untersuchungen zur genauen Zusammensetzung mizellarer Substratvermittlungssysteme zeigten, dass für die Carotinoidspaltung mit AtCCD1 unterschiedliche Tenside in Abhängigkeit vom jeweiligen Substrat ein optimales Ergebnis liefern (Nacke et al. 2012).

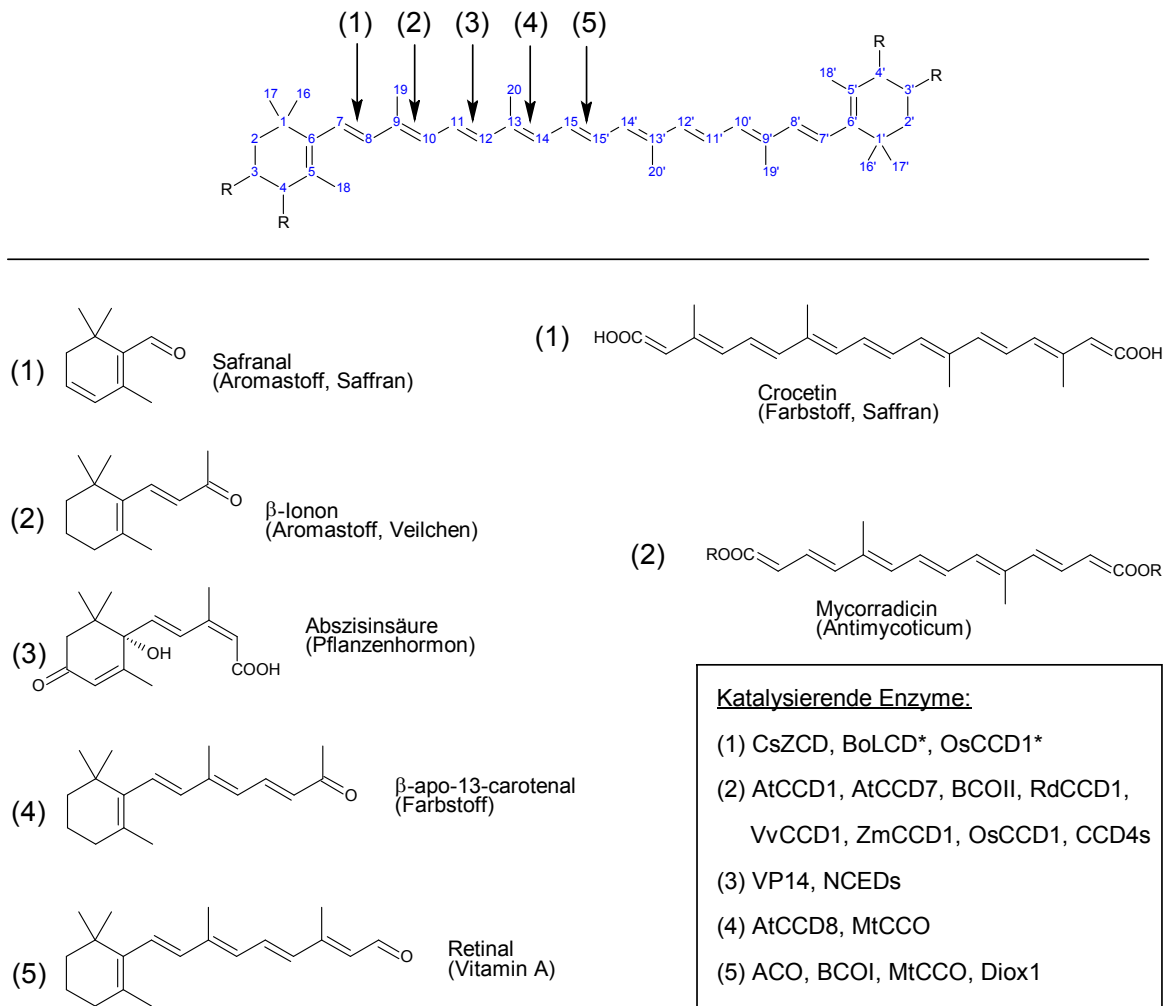


Abb. 3-6 Spezifische Carotinoidspaltung

Beispiele einiger bedeutender Carotinoid-Spaltprodukte; Die Reaktion an den Stellen (1) und (3) führt zu Vorläufern der dargestellten Produkte; * BoLCD und OsCCD1 akzeptieren nur lineares Lycopin als Substrat

AtCCD1 ist bislang eine der am besten untersuchten Carotinasen. Allerdings wird die von ihr gespaltene Doppelbindung auch von vielen anderen Enzymen angegriffen. So spaltet AtCCD7 die 9-10 Doppelbindung asymmetrisch und generiert auf diese Weise mit dem entstehenden β -Apo-10'-carotenal *in vivo* das Substrat für AtCCD8, welches dieses an der 13'-14' Bindung weiter metabolisiert. Die konzertierte Reaktion dieser beiden Enzyme in Plastiden resultiert wahrscheinlich in einem außerhalb der Plastiden mobilen Vorläufer von Stringolacton, welches wiederum zu einem Phytohormon mit regulatorischer Wirkung auf die Sprossenverzweigung umgesetzt wird (Floss et al. 2009). Während AtCCD1 lediglich symmetrisch die 9-10 und 9'-10' Doppelbindung spaltet, schneiden RdCCD1 und ZmCCD1 zusätzlich auch das lineare Carotinoid Lycopin an der 5-6 und 5'-6' Bindung (Vogel et al. 2008; Huang et al. 2009a). Dabei entsteht zusätzlich zum *trans*-Pseudoionon das kürzere 6-Methyl-5-hepten-2-on. Ähnlich wie AtCCD1 akzeptiert RdCCD1 für die Spaltung der 9-10,

9'-10' Bindung eine Vielfalt an *all-trans*-Carotinoiden, 9-*cis*-Carotinoiden, Violaxanthin-Isomeren und Apocarotinoiden.

Eine interessante Sonderstellung nimmt die Zeaxanthin spaltende Oxygenase aus *Crocus* ein. Sie spaltet Zeaxanthin, ein an den Enden cyclisiertes Xanthophyll, symmetrisch an der 7-8, 7'-8' Bindung und ist damit eins der wenigen bekannten Enzyme, welche direkte Vorläufer von Safranal, Crocetinglycosiden und Bixin produzieren können (Bouvier et al. 2003b). Die ersten beiden Substanzen sind zentrale Geschmacks- und Farbstoffe des wertvollen Safrans, Bixin ein Lebensmittel- und Kosmetikfarbstoff. Andere Enzyme wie OsCCD1 oder BoLCD sind zwar ebenfalls in der Lage, diese Bindung zu spalten, allerdings nur unter der Voraussetzung, dass es sich bei den Substraten um lineare Carotinoide handelt (Bouvier et al. 2003a; Ilg et al. 2009). Weiterhin konnte in Cyanobakterien die enzymatische Produktion von β -Cyclocitral und Crocetindial *in vivo* nachgewiesen werden, allerdings ohne die verantwortliche Oxygenase zu identifizieren und zu klonieren (Jüttner et al. 1985; Rodríguez-Bustamante et al. 2007).

Trotz der nahen Verwandtschaft von AtCCD4 mit der AtCCD1 war die Funktion von ersterer sowie ihrer verwandten CCDs aus anderen Organismen lange unklar. In einer umfangreichen Analyse wurden schließlich die Aktivitäten von CCD4s aus *Arabidopsis* (AtCCCD4), *Chrysanthemum* (CmCCD4a), *Malus* (MdCCD4), *Osmanthus* (OfCCD4) und *Rosa* (RdCCD4) verglichen (Huang et al. 2009b). Dabei konnte gezeigt werden, dass die CCD4s zwar an der 9-10, 9'-10' Doppelbindung schneiden, allerdings wesentlich weniger Substrate akzeptieren als AtCCD1. So scheint es, dass RdCCD1 und AtCCD1 *in vivo* eher Apocarotinoide spalten, während CmCCD4a und MdCCD4 eher C-40 Carotinoide akzeptieren. Keines der Enzyme spaltete Xanthophylle.

Nachdem die ersten spezifischen Carotinasen aus Pflanzen isoliert worden waren, konnten sie zunehmend auch in Pilzen und Bakterien identifiziert werden (Ruch et al. 2005; Prado-Cabrero et al. 2007). Eine kürzlich entdeckte Oxygenase aus *Mycobacterium tuberculosis* variiert ihre Regiospezifität anhand der Existenz oder dem Fehlen einer Hydroxylierung am Iononring zwischen der 13-14 und 15-15' Position. Sie akzeptiert Carotinoide, Apocarotinoide und Xanthophylle als Substrat (Scherzinger et al. 2010).

3.2 Enzymproduktion

Die rekombinante Expression von Proteinen ist heute ein fundamentaler Zweig der biotechnologischen Industrie. Unterschiedlichste Proteine werden zum einen selbst als Endprodukt für beispielsweise pharmazeutische Zwecke produziert, zum anderen werden sie als Biokatalysator für die Synthese weiterer Chemikalien eingesetzt. Es werden sowohl prokaryotische Wirtsorganismen wie *Escherichia coli* und *Bacillus*

subtilis als auch eukaryotische wie *Pichia pastoris* oder *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt, wobei *E. coli* historisch bedingt am besten erforscht und charakterisiert ist (Jana et al. 2005; Choi et al. 2006).

3.2.1 Hochzelldichtekultivierung von *Escherichia coli*

Verfahrenstechnisch sind für die Kultivierung von *E. coli* drei Methoden üblich: Batch-, Fed-Batch- und kontinuierlicher Betrieb (Yee et al. 1992). Beim Batch-Verfahren werden alle für die Kultivierung benötigten Komponenten zu Prozessbeginn im Reaktor vorgelegt und das Zellwachstum initiiert. Beim Fed-Batch-Verfahren wird in einem Bruchteil des finalen Kulturvolumens inokuliert und die benötigten Nährstoffe im Laufe des Prozesses kontrolliert zugegeben bis das Endvolumen erreicht ist. Im kontinuierlichen Betrieb wird dem Reaktor Medium als Feedstrom zugeführt sowie das entsprechende Volumen der Biosuspension abgeführt. Auf diese Weise entsteht ein *steady-state* mit konstantem Kulturvolumen im Bioreaktor. Der apparative Aufwand nimmt in der genannten Reihenfolge zu. Hochzelldichten sind im Allgemeinen nur über Fed-Batch oder kontinuierlichen Betrieb mit Zellrückhaltung erreichbar.

Der Batch-Ansatz stellt operativ die einfachste Prozessvariante dar, birgt aber einige Nachteile, die mit den Feedstrategien umgangen werden können. So wirken sich hohe Konzentrationen vieler Substrate und Metabolite wie Acetat, Ethanol, D-Lactat und L-Glutaminsäure wachstumshemmend auf *E. coli* aus. Diese akkumulieren in höheren Konzentrationen, wenn der Kohlenstofffluss in die zentralen metabolischen Stoffströme nicht dem aktuellen biosynthetischen und energetischen Bedarf entspricht (Pan et al. 1987; Riesenberg 1991). Insbesondere die Acetatbildung bei zu hohen Glucosekonzentrationen ist ein gängiges Problem bei der Hochzelldichtekultivierung von *E. coli*. Im Batch-Ansatz müssen allerdings hohe Substratkonzentrationen vorliegen, um die gewünschte Biomasseproduktion überhaupt zu ermöglichen.

Wegen dieser Nachteile werden Hochzelldichtekultivierungen heute zumeist mittels definierten Minimalmedien in Fed-Batch-Verfahren durchgeführt, in welchen die Kohlenstoffquelle nach Bedarf hinzudosiert und der pH-Wert kontrolliert wird. Dieses Vorgehen ermöglicht eine umfassende Überwachung praktisch aller Substrat- und Metabolitkonzentrationen und eine Regulierung dieser Parameter über den Feedstrom. Gleichzeitig ist es auf diese Weise möglich, die Produktion wachstumshemmender Metabolite wie des Acetates durch eine künstlich reduzierte Wachstumsrate, welche durch eine kontrollierte Substratlimitierung erzielbar ist, zu minimieren. So wird das Wachstum zwar verlangsamt, letztendlich aber höhere Biomassedichten erreicht. Weiterhin wurden nach der Aufklärung der metabolischen Wege zur Acetatbildung *E. coli* K12 Stämme konstruiert, bei denen zentrale Gene zur störenden Acetatproduktion deletiert wurden (Riesenberg 1991).

Für die effiziente rekombinante Proteinexpression sind zwei Faktoren maßgebend. Zum einen muss eine möglichst *hohe Zelldichte* realisiert und zum anderen eine *hohe spezifische Produktausbeute* erreicht werden (Yee et al. 1992). Beides wird durch die angewandte Feeding-Strategie beeinflusst. Für das Erreichen hoher Zelldichten wurden verschiedene Arten des Feedings etabliert. Drei häufig eingesetzte Verfahren werden im Folgenden vorgestellt.

Beim *konstanten* Feed wird die Kohlenstoffquelle dem Reaktor mit einem im Voraus festgelegten konstanten Volumenstrom zugeführt. Da der Biomassezuwachs exponentiell verläuft, nimmt die spezifische zugeführte Kohlenstoffmenge über die Prozessdauer ab, obwohl der Kohlenstoffbedarf zunimmt.

Beim *exponentiellen* Feed wird diese Diskrepanz umgangen, indem ebenfalls im Voraus der exponentielle Feeding-Bedarf berechnet und die Kohlenstoffquelle anhand dieses Profils hinzudosiert wird.

Beide zuvor genannten Varianten implizieren eine recht gute Kenntnis des Prozesses, um eine stabile Kultivierung mit einem im Voraus festgelegten Feeding-Profil durchzuführen. Die flexibelste Variante der Kohlenstoff-Zugabe ist über eine *Feed-back-Kontrolle* des Zustroms möglich. Hierbei werden Prozessparameter wie z.B. der gelöste Sauerstoff, die Glucosekonzentration, der pH-Wert oder die optische Dichte der Kultur *on-line* überwacht und der Feedstrom basierend auf diesen Daten hinzudosiert. Dieses Vorgehen ermöglicht eine variable und prozessnahe Steuerung der Kultivierung. Somit sind Zelldichten von bis zu 175 g Zelltrockenmasse pro Liter Kulturvolumen erzielbar (Riesenberg 1991).

Während die Prozessführung zur Erzeugung hoher Biomassedichten von *E. coli* inzwischen gut verstanden wird, ist das Erzielen einer hohen spezifischen Produktausbeute bei der rekombinanten Enzymproduktion aufgrund fehlender allgemeingültiger Erkenntnisse problematischer. Hier muss für jedes rekombinante Protein eine passende Expressionsstrategie entwickelt und getestet werden, um die ebenfalls im Voraus festzulegenden Ziel-Maßstäbe zu erfüllen. Während es in einem Fall nötig ist, große Mengen eines mittelmäßig aufgereinigten Proteins zu produzieren, kann es im anderen Fall erwünscht sein, nur geringe Proteinmengen mit extrem hoher Reinheit, wie es beispielsweise in der Pharmaindustrie verlangt wird, herzustellen. Des Weiteren unterscheiden sich die zu produzierenden Proteine in ihren biochemischen Eigenschaften, so dass allgemeingültige Vorgaben für hohe Produktivitäten bislang schwierig sind. Ebenso kann sich eine gewünschte Biomasseproduktion mit hoher Wachstumsrate nachteilig auf die Plasmidkopienanzahl pro Zelle auswirken, was zwar den Faktor Zelldichte erhöht, gleichzeitig aber den Faktor spezifische Produktausbeute erniedrigt und so die Produktivität reduziert (Yee et al. 1992).

Aufgrund der Heterogenität der zu produzierenden Proteine wurden viele Expressionssysteme entwickelt, die sich in ihrer Regulierung, Expressionsstärke, Induktionsart und weiteren Eigenschaften unterscheiden (Jana et al. 2005). Interessant sind

hierbei Systeme, welche die Lokalisierung des rekombinanten Proteins beeinflussen können. Im Fall von *E. coli* als Expressionswirt kann das Produkt cytosolisch oder periplasmatisch eingelagert sein oder auch ins Medium sekretiert werden. Die einzelnen Varianten sind insbesondere im Hinblick auf das *downstream processing* gegeneinander abzuwiegen.

Obwohl es sich bei *E. coli* um den bestcharakterisierten und am meisten eingesetzten Organismus zur rekombinanten Enzymproduktion handelt, ist anzumerken, dass er auch entscheidende Nachteile wie ein fehlendes System zur posttranslationalen Modifikation eukaryotischer Proteine, den Mangel eines eigenen Proteinexport-Systems und limitierte Fähigkeiten zur Ausbildung von Disulfidbrücken aufweist (Duilio et al. 2004). Eukaryotische Systeme wie *S. cerevisiae* oder *P. pastoris* können solche Probleme umgehen, wie durch die erfolgreiche Produktion wichtiger humantherapeutischer Proteine wie Chitinase und einem Insulin Vorläufer gezeigt werden konnte (Goodrick et al. 2001; Wang et al. 2001).

Auch pflanzliche Produktionssysteme und Pflanzenzellkulturen gewinnen an Bedeutung. Für die Überexpression von Enzymen mit hydrophoben Oberflächen, wie z.B. membranintegralen Proteinen, wird an alternativen Expressionswirten wie z.B. *Rhodobacter capsulatus* geforscht, welche eine hohe intrazelluläre Membranoberfläche ausbilden können (Heck 2009).

3.2.2 Rückfaltung von Einschlusskörpern

Bei der rekombinanten Proteinexpression in *E. coli* kommt es in vielen Fällen zur Bildung von unlöslichen und katalytisch inaktiven Proteinaggregaten - den *inclusion bodies* (Kane et al. 1988; Fahnert et al. 2004; Singh et al. 2005). Dabei handelt es sich um lichtbrechende Partikel mit einem Durchmesser von 0,2 - 0,5 µm. Obwohl der exakte Mechanismus der *inclusion body* Entstehung nicht bekannt ist, wird allgemein angenommen, dass eine zu schnelle rekombinante Expression dazu führt, dass der Proteinstrang nicht die nötige Zeit hat, um sich während der Translation in seine native Konformation zu falten. Dies führt wahrscheinlich dazu, dass hydrophobe Sequenzbereiche an die Proteinoberfläche gelangen und so mit anderen Polypeptiden über hydrophobe Wechselwirkungen interagieren und aggregieren (Burgess 2009).

In den meisten Fällen ist die Bildung solcher Proteinaggregate unerwünscht, da zusätzlicher Aufwand nötig ist, um das aktive Protein zu nutzen. Um die Bildung des Anteils an fehlgefaltetem Protein zu unterbinden, gibt es unterschiedliche Methoden. So können die Expressions- und Induktionsbedingungen optimiert werden (Sorensen et al. 2005). Häufig hilft hier eine Reduktion der Expressionstemperatur, um die Translationsrate zu senken. Andere Möglichkeiten sind der Einsatz von coexprimierten Chaperonen als Faltungshelfer (Lee et al. 2004), die Codonoptimierung oder die

Fusion des Zielproteins an ein Löslichkeitsvermittelndes Hilfsprotein (Esposito et al. 2006).

Allerdings haben *inclusion bodies* in einigen Fällen auch Vorteile wie z.B. die hohe Reinheit des überexprimierten Proteins. Deshalb stellen sie nicht generell verlorenes inaktives Protein dar, sondern können nach einer Aufreinigung durch Rückfaltung in ihren nativen Zustand (*refolding*) wieder in einen katalytisch aktiven Zustand überführt werden. Eine allgemeine Prozedur zu diesem Zweck gliedert sich wie folgt (Burgess 2009):

1. Überexpression des rekombinanten Proteins in *E. coli*
2. Waschen der *inclusion bodies*
3. Denaturieren und Solubilisieren des Proteins in den *inclusion bodies*
4. Rückfaltung des solubilisierten Proteins (*refolding*)
5. Filtern und Aufreinigen des rückgefalteten Proteins
6. Reoxidation zur Bildung korrekter Disulfidbindungen
7. Charakterisierung des rückgefalteten Proteins.

Im Waschschrift werden Proteinverunreinigungen, Membranfragmente und DNA mithilfe eines Detergens wie Triton X-100 oder mittels Harnstoff (1-2 M) entfernt.

Der erste Schritt der eigentlichen Reaktivierung des Enzyms ist das Denaturieren und Solubilisieren. Hierfür gibt es kein pauschales Vorgehen, da die Qualität des aggregierten Proteins von Fall zu Fall unterschiedlich ist. So kann es in einigen Fällen in einem fast-nativen Zustand vorliegen, in denen milde Solubilisierungsbedingungen ausreichen, um das Protein monodispers zu lösen und in den aktiven Zustand zu überführen. In anderen Fällen liegen korrekte Sekundärstrukturen aber keine Tertiärstruktur vor. Die harschesten Denaturierungsbedingungen müssen in denjenigen Fällen geschaffen werden, in denen kaum korrekte Sekundärstrukturen vor der Aggregation ausgebildet werden konnten. Hierfür werden hohe Konzentrationen von chaotropen Agenzien wie Guanidinhydrochlorid (6 M), Harnstoff (8 M) oder anionischen Tensiden wie SDS oder N-Lauroylsarkosin (0,3%) eingesetzt.

Der folgende Rückfaltungsschritt beruht auf dem Entfernen oder Verdünnen dieser Substanzen, so dass die Aminosäurestränge sich geordnet in den energetisch günstigsten Zustand anordnen können. Hierbei wird angenommen, dass dieser mit der nativen Proteinkonfiguration gleichzusetzen ist. Eine gängige Methode ist die Verdünnung des solubilisierten Proteins in einem größeren Volumen des Rückfaltungspuffers. Dies kann auf drei unterschiedliche Arten passieren (Burgess 2009):

1. *Reverse dilution*:

Bei dieser Methode wird der Rückfaltungspuffer schrittweise zum solubilisierten Enzym dazugegeben und zwischendurch gemischt und inkubiert. Unter-

schreitet die Konzentration des Proteins und des Solubilisierungsmittels eine kritische Konzentration, kann sich das Protein spontan in die korrekte Konformation falten. Der Vorteil dieser Methode ist die vergleichsweise hohe Konzentration des aufbereiteten Produktes.

2. *Flash dilution*:

Bei diesem Vorgehen wird die komplette Lösung des denaturierten Enzyms in einem großen Volumen Rückfaltungspuffer auf einmal (z.B. 60-fach) verdünnt. In diesem Fall wird das Produkt stärker verdünnt als bei der *reverse dilution*, allerdings kann das von Vorteil für den Rückfaltungsprozess sein und die Gefahr der erneuten Aggregatbildung reduzieren.

3. *Drip dilution*:

In diesem Fall wird das Protein sehr langsam über einen längeren Zeitraum in ein größeres Volumen gemischten Rückfaltungspuffers getropft und zwischendurch wenige Minuten inkubiert. Theoretisch ist auf diese Weise die größte mögliche Verdünnung sowohl des Proteins als auch des Solubilisierungsmittels realisierbar, wodurch ein effizientes *refolding* möglich sein sollte. Da sich das bereits zugegebene Protein in der richtigen Konformation befinden sollte, kann es bei Zugabe weiterer Proteinmengen nicht zur Aggregation beitragen.

Die generelle Methodik des *refolding* beruht also auf dem Denaturieren und Solubilisieren des gewünschten Proteins und einem folgenden Verdünnen, durch welches zum einen dem Protein die denaturierenden und solubilisierenden Bedingungen entzogen werden und zum zweiten ein erneutes Interagieren der Proteinstränge untereinander erschwert wird.

Basierend auf diesem grundlegenden Prinzip wurden Methoden zur Verbesserung des *refolding* Ergebnisses entwickelt (Rudolph et al. 1999). So können Zusätze zum *refolding* Puffer mit kleiner Molekulargröße wie Tris, L-Arginin, Carbonsäureamide, Cyclodextrine, Polyethylenglycol, Detergenzien oder Mizellen das Rückfaltungsergebnis verbessern. Weiterhin kann die Anbindung der entfaltenen Proteine an Ionenaustauscher- oder Affinitätsmatrices z.B. mittels His-Tag einen förderlichen Einfluss auf das Rückfaltungsergebnis haben (Creighton 1990; Holzinger et al. 1996). Ähnlich wie bei den bereits erwähnten molekularbiologischen Methoden zur generellen Unterdrückung von *inclusion bodies* kann das *refolding* durch die Fusion mit Löslichkeitsvermittelnden Tags oder den Einsatz von Chaperonen *in vitro* verbessert werden (Rudolph et al. 1999).

3.3 Enzymimmobilisierung

3.3.1 Einleitung

Der Einsatz von Enzymen hat in den vergangenen Jahrzehnten kontinuierlich an Bedeutung für viele Industriezweige gewonnen und wird dies aufgrund der aktuellen Umwelt- und Nachhaltigkeitsorientierung weiter tun. Obwohl diese Biokatalysatoren viele Vorteile gegenüber der klassischen chemischen Synthese haben, sind sie primär nicht für den industriellen sondern den natürlichen Einsatz evolviert. Verschiedene Zweige der Biotechnologie beschäftigen sich deshalb mit der mikrobiellen, molekularbiologischen und verfahrenstechnischen Optimierung des industriellen Einsatzes von Enzymen (Guisan 2006b). Eine der wichtigsten Methoden hierfür ist die Enzym-Immobilisierung. Definitionsgemäß handelt es sich dabei um die *Umwandlung des Biokatalysators in eine Form mit künstlich eingeschränkter Mobilität unter Erhalt der biokatalytischen Aktivität*.

Die enzymatische Katalyse bietet prinzipiell Vorteile wie hohe Aktivität, Selektivität und Spezifität unter milden und umweltfreundlichen Reaktionsbedingungen. Sie erlaubt unter einfachen Bedingungen komplexe chemische Reaktionen, die mittels klassischer Chemie nur unter hohem Aufwand und geringen Ausbeuten möglich wären. Demgegenüber stehen Nachteile der Enzymkatalyse wie Inhibierung durch Substrate und Produkte sowie in der Praxis oft auftretende geringe Stabilität, Aktivität und Selektivität. Obwohl das Hauptziel der Immobilisierung die Kostensenkung durch industrielle Wiederverwendbarkeit oder auch durch kontinuierlichen Betrieb ist, werden mit ihrer Hilfe auch die genannten Nachteile teilweise umgangen. Inzwischen wurden unzählige Methoden der Immobilisierung beschrieben, für den industriellen Einsatz ist es allerdings weiterhin nötig einfache, effektive und kosteneffiziente Methoden zu finden (Guisan 2006b).

Die historische Entwicklung der Immobilisierungstechnik kann in drei Stufen unterteilt betrachtet werden (Brena et al. 2006). Der wohl erste biotechnologische Einsatz von Immobilisaten fand, wenn auch unwissentlich, bereits im 19. Jahrhundert statt. Für die Essigproduktion wurden dem verwendeten Wein Buchenspäne oder Reisig zugesetzt (Abb. 3-7). Deren Oberfläche wurde von Essigsäurebakterien (Gattung: *Acetobacter*) zur Besiedlung und dem oxidativen aeroben Abbau von Ethanol zur Essigsäure genutzt (Munk et al. 2001). Die Besiedlungsmöglichkeit einer großen Oberfläche resultierte in einer schnelleren Produktion der Essigsäure und des fertigen Essigs.

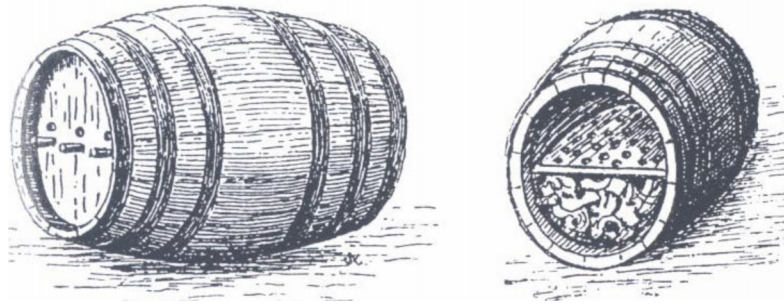


Abb. 3-7 Mit Buchenspänen gefüllte Weinfässer (Essigproduktion im 19. Jhd.)

Die Buchenspäne wurden von Essigsäurebakterien (*Acetobacter*) besiedelt und führten zu einer beschleunigten Essigsäureproduktion aus Ethanol (Bildquelle unbekannt)

Die zweite Phase folgte während der 1960er Jahre, als die Publikationszahl zu einzelnen immobilisierten Enzymen explosionsartig zunahm. Dabei handelte es sich aber um Ein-Enzym-Systeme ohne komplizierte Reaktionsführung.

Ab den 1980er Jahren wurden in der dritten Entwicklungsphase auch Mehr-Enzym-Systeme und Cofaktor-Regenerierung entwickelt, so dass ab hier auch komplexere Reaktionen mit immobilisierten Enzymen durchgeführt werden konnten.

3.3.2 Immobilisierungsmethoden

Bisher wurden unzählige Methoden der Enzymimmobilisierung publiziert und es wurden unterschiedliche Kategorisierungen dieser Methoden vorgenommen. Je nach Lehrbuch unterscheiden sie sich teilweise etwas. Zusammenfassend kann die Kategorisierung in vier Gruppen erfolgen (Abb. 3-8):

Immobilisierung durch

- Nicht kovalente Anbindung
- Kovalente Anbindung
- Einschluss
- Quervernetzung

Die Einteilung ist bewusst allgemein gefasst, um alle bekannten Methoden einzuschließen.

Die nicht kovalente Anbindung an ein Trägermaterial ist die älteste und auch industriell zuerst eingesetzte Immobilisierungsmethode (Schmid 2006). Enzyme können durch simple Adsorption an ein passendes Trägermaterial immobilisiert werden. Wechselwirkungen, die hierbei ausgenutzt werden, umfassen Ionische Bindungen, Wasserstoff-Brückenbindungen, Van-der-Waals Kräfte und Hydrophobe Wechselwirkungen (Hanefeld 2009). Je nach Herkunft des Enzyms und Beschaffenheit seiner

Oberfläche und der gewünschten Betriebsbedingungen eignen sich die unterschiedlichen Wechselwirkungen mehr oder weniger (Kierstan et al. 1991).

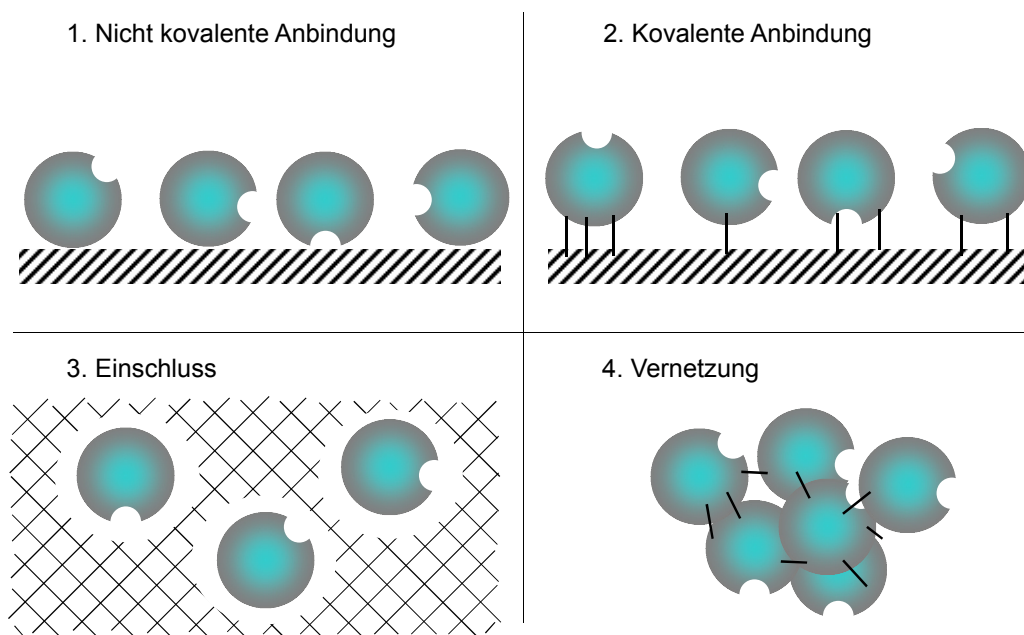


Abb. 3-8 Schematische Darstellung aller Immobilisierungskategorien

Wegen der Vielzahl an bisher entwickelten unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden werden diese in vier Kategorien eingruppiert, die sich in ihrer grundlegenden Immobilisierungsmethodik unterscheiden.

Die Vorteile einer adsorptiven Bindung eines Enzyms an ein Trägermaterial sind die einfache Durchführbarkeit einer solchen Immobilisierung, die Wirtschaftlichkeit, Reversibilität und das größtmögliche Belassen des Enzyms in seiner natürlichen Konformation, weil keine chemischen Modifikationen eingesetzt werden. Demgegenüber stehen einige Nachteile wie die relativ schwache Anbindung, die mangelnde Stabilisierung des Enzyms, auch hier die Reversibilität und Unspezifität der Anbindung sowie mögliche Massentransferprobleme.

Eine andere Art der nicht kovalenten Enzymenbindung ist über spezifische Wechselwirkungen, wie sie teilweise in der Protein-Chromatographie verwendet werden, möglich. Beispielsweise können Enzyme über Metallchelatisierung (Andreescu et al. 2006; Mateo et al. 2006) oder Affinitätsanbindung über Tags (GST, Streptavidin, Avidin) äußerst selektiv und stabil gebunden und wieder eluiert werden (Roy et al. 2006). Diese Methode weist Vorteile auf wie eine hohe Spezifität, Stärke und Stabilität der Bindung, die Möglichkeit Aufreinigung und Immobilisierung in einem Schritt durchzuführen und Wiederverwendbarkeit des Trägermaterials. Demgegenüber steht mit den hohen Kosten einer solchen Methode im Prinzip nur ein Nachteil entgegen. Durch die Vielfalt an funktionellen Gruppen der an der Proteinoberfläche exponierten Aminosäuren bieten sich unterschiedliche chemische Reaktionen an, um ein Protein

kovalent und somit sehr stabil an eine Trägeroberfläche zu binden. Oft verwendete Funktionen sowohl auf der Protein- als auch der Trägerseite sind die Aminogruppe (z.B. Lysin, Arginin), die Carboxylgruppe (z.B. Glutaminsäure, Asparaginsäure), die Hydroxylgruppe (z.B. Tyrosin) und die Thiolgruppe (Cystein). Vielfach wird auf der Trägerseite auch die Epoxygruppe eingesetzt. Die Anbindung kann zum einen direkt zwischen den Enzym- und Trägergruppen erfolgen oder auch über ein Linker- oder Spacermolekül (z.B. Glutardialdehyd) (Cabral et al. 1991; Guisan 2006a; Rao et al. 2006; Hanefeld 2009).

Entscheidender Vorteil dieser Methoden gegenüber den unspezifischen adsorptiven Verfahren ist die große Stabilität der kovalenten Bindung. Es ist möglich, das Protein durch multiple kovalente Anbindung in seiner Konformation relativ starr zu halten. Gelingt dies, ohne die enzymatische Aktivität zu sehr zu schädigen, können Prozesse ohne Denaturierung des Enzyms teilweise bei höheren als den natürlichen Temperaturen geführt werden, was zu höheren Produktausbeuten führt. Weiterhin gibt es inzwischen eine Vielfalt an Trägermaterialien und Linkermolekülen, so dass Optimierungsmöglichkeiten für die jeweilige Anwendung gegeben sind. Es ist möglich, die Beladungsdichte, die Enzymverteilung und die Mikroumgebung des Enzyms zu kontrollieren.

Allerdings ist es möglich, dass der recht harsche Eingriff in die Proteinbeschaffenheit zur (teilweisen) Inaktivierung führt. Ebenso können auch bei dieser prinzipiellen Methode Nachteile wie hohe Kosten, durch den Träger erniedrigte volumetrische Aktivität und Massentransferprobleme auftreten. Nichtsdestotrotz ist die Immobilisierung mittels kovalenter Anbindung an ein Trägermaterial neben der adsorptiven Bindung diejenige, die großen industriellen Einsatz findet.

Die dritte Variante der Immobilisierung von Enzymen oder auch ganzen Zellen ist der Einschluss. Hierbei kann es sich um ein Einbetten des Enzyms oder der Zelle in einer Polymermatrix, um eine Mikroverkapselung oder den Rückhalt durch Membranen oder Hohlfasermodule handeln.

Eine der ersten Immobilisierungen in einer Polymermatrix wurde mit *Saccharomyces cerevisiae* Zellen durchgeführt. Diese wurden in Calciumalginat zur Produktion von Ethanol eingeschlossen und mehrfach wiederverwendet. Die Zellen werden hierbei in einer wässrigen Lösung mit Natrium-Alginat vermischt und anschließend in eine CaCl_2 -Lösung getropft. Die einwertigen Natrium-Ionen werden durch die zweiwertigen Calcium-Ionen ersetzt und so eine Polymerisierung initiiert. Es entstehen kugelförmige Immobilisate (Orive et al. 2006; Rao et al. 2006).

Eine neuere Variante der Matriximmobilisierung stellen die Sol-Gele dar (Reetz 2006). Hierbei werden Silanmonomere in wässriger Lösung in saurem Milieu hydrolysiert und anschließend mit einer leicht alkalisch gepufferten Enzymlösung vermischt. Das Anheben des Gesamt-pH-Wertes initiiert eine Kondensationsreaktion der entstandenen Silanole, was letztendlich in eine Polymerisation der Gesamtmischung

resultiert. Durch geschickte Wahl unterschiedlicher Silanmonomere sind die entstehenden Gele modifizierbar und an das jeweilige Enzym anpassbar (Reetz 1997).

Eine chemisch ähnliche aber auf makromolekularen Monomeren basierende Immobilisierungstechnik stellen die amphiphilen Conetzwerke dar (Bruns et al. 2005; Erdodi et al. 2006). Diese sind besonders interessant für die Verwendung mit in organischen Lösungsmitteln gelösten Substraten, da die Netzwerke durch unterschiedliches Quellverhalten zum einen das Enzym in einer hydrophilen Mikrophase einschließen, gleichzeitig aber die Diffusion des Substrates durch die hydrophobe Mikrophase gewährleisten.

Die Matriximmobilisierung ist in den meisten Fällen sehr einfach durchführbar und sowohl für ganze Zellen, als auch für Proteine effizient (Guisan 2006a). Obwohl makroskopisch ein Phasenwechsel von flüssig zu fest stattfindet, verbleiben die Organismen oder Proteine in ihrer mikroskopischen wässrigen Umgebung und werden chemisch nicht modifiziert, was für die Aktivität vorteilhaft ist. Kritisch zu sehen sind bei dieser Methode die auftretenden Massentransportlimitierungen, welche bei den anderen Immobilisierungsmethoden weniger problematisch sind. Weiterhin findet keine Stabilisierung des immobilisierten Gutes statt.

Bei der Mikroverkapselung werden in wässriger Lösung befindliche Enzyme von einer mikroskopisch kleinen semipermeablen Membran eingeschlossen (Poncelet 2006). Dies wird erreicht, indem die Reaktanden zur Bildung der Membran in zwei ineinander nicht mischbaren Phasen gelöst und zu einer Emulsion gemischt werden. Hierbei muss das zu immobilisierende Enzym in der inneren der beiden Phasen gelöst sein. Da ein Kontakt der Polymerkomponenten nur an der Phasengrenzfläche möglich ist, bildet sich dort die Membran und umschließt das Enzym.

Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass auf diese Weise Multi-Enzym-Immobilisate präparierbar sind und keine chemische Modifikation des Enzyms erfolgt, was im Allgemeinen die katalytische Aktivität bewahrt. Allerdings sind die Partikel fragil und anfällig für Zerstörung durch z.B. osmotische Effekte. Da die Dichte der Partikel derjenigen der Bulk-Phase sehr ähnlich ist, kann die Abtrennung der Teilchen aufwändig sein.

Ähnlich dem Prinzip der Mikroverkapselung ist der Einsatz von Membranmodulen (Rao et al. 2006). Hierbei werden Enzyme z.B. durch kommerzielle Ultrafiltrationsmembranen in einem physikalisch abgetrennten Raum zurückgehalten, während kleine Moleküle wie Substrate und Produkte durch die Membran diffundieren können. Auf diese Weise sind kontinuierliche Prozesse relativ einfach realisierbar. Bei cofaktorabhängigen Reaktionen ist es möglich, den Cofaktor durch Anbinden an ein höhermolekulares Polymer wie Polyethylenglycol (PEG) ebenfalls im Reaktionsraum zurückzuhalten.

Die letzte der vier allgemeinen Immobilisierungsmethoden ist die Quervernetzung. Hierbei werden Enzyme direkt miteinander kovalent verbunden, so dass sie selbst

höhermolekulare Gebilde formen, welche physikalisch vom Rest der Reaktionslösung abtrennbar sind (Rao et al. 2006). Eines der ersten hierfür verwendeten Quervernetzer-Moleküle war Glutardialdehyd, welches kovalente Bindungen mit den Amino-Gruppen des Proteins ausformt und bis heute nicht an Bedeutung für diesen Einsatz verloren hat. Während zu Beginn Glutardialdehyd der enzymatischen wässrigen Lösung einfach zugesetzt wurde (Kierstan et al. 1991; Betancor et al. 2006), findet in moderneren Methoden eine Vorbehandlung der Enzymlösung statt. So wurde erkannt, dass Thermolysin, welches ursprünglich für Kristallstrukturanalysen kristallisiert worden war, nach Behandlung mit Glutardialdehyd seine Aktivität in Form von 1-100 µm großen *cross-linked enzyme crystals* (CLECs) auch unter harschen Reaktionsbedingungen beibehält (Margolin 1996). CLECs unterschiedlicher Enzyme zeigen bessere Resistenz gegen Hitze, organische Lösungsmittel und Proteolyse im Vergleich zu löslichen oder lyophilisierten Enzymvarianten. Durch die geringe Partikelgröße ist eine hohe volumetrische Aktivität der Immobilisate realisierbar. Allerdings ist die Kristallisation des gewünschten Proteins meistens ein schwieriger Schritt. Dieser kann in einem verwandten Ansatz durch ein einfaches, ungeordnetes Ausfällen des Proteins umgangen werden. Wird das Präzipitat wiederum mit Glutardialdehyd versetzt, entstehen sogenannte *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs) (Sheldon 2007a).

Eine neuere Entwicklung im Crosslinking von Enzymen stellen die sogenannten *Spherezymes* dar (Brady et al. 2008). Hierbei wird die wässrige Phase mit Glutardialdehyd und dem gewünschten Protein in einer organischen Phase emulgiert. Dies führt dazu, dass die quervernetzten Proteine die namensgebenden mikroskopisch kleinen Kügelchen ausbilden.

3.3.3 Industrielle Relevanz

Da die Enzymkatalyse von wachsender industrieller Bedeutung ist, werden kontinuierlich neue Immobilisierungsmethoden für neue Enzyme vorgeschlagen. Obwohl viele Arbeiten lediglich im Labormaßstab stattfinden, gibt es für jede der genannten vier Immobilisierungskategorien Beispiele für die industrielle Anwendung. Tatsächlich werden für die größten industriellen enzymkatalytischen Produktionsverfahren (bezogen auf die jährliche Produktionsleistung) fast ausschließlich immobilisierte Enzyme eingesetzt (vgl. Tab. 3-1).

Beispielsweise wird in einem dreistufigen enzymatischen Prozess aus Stärke Maissirup produziert, wobei im letzten Verfahrensschritt eine auf DEAE-Cellulose adsorptiv immobilisierte Glucoseisomerase eingesetzt wird (Drauz et al. 2002). Ein Gramm Biokatalysator produziert auf diese Weise etwa 15 kg Maissirup bei einer Standdauer von 100 Tagen bis zu mehr als einem Jahr und Betriebstemperaturen von 55°C und mehr als 60°C (Buchholz et al. 2005). Bemerkenswert hierbei ist, dass durch die lan-

ge Standzeit die sich auf das Enzym belaufenden Kosten lediglich 1,6% der Gesamtprozesskosten ausmachen, womit dieses Beispiel erfolgreich den Nutzen von Enzymimmobilisierungen unterstreicht.

Tab. 3-1 Beispiele industrieller Enzymprozesse

Bis auf den markierten (*) Prozess werden alle Umsätze mit Immobilisaten durchgeführt (nach (Schmid 2006))

Umsetzung	Enzym	Maßstab [t/a]	Unternehmen (Bsp.)
Hydrolyse von Stärke zu D-Maltose und D-Glucose (*)	A-Amylase, Glucoamylase	100.000	Zahlreiche Unternehmen
Isomerisierung von D-Glucose zu D-Fructose	Glucose-Isomerase in <i>Streptomyces</i> sp.	100.000	Clinton Corn Products
Spaltung von Penicillin G zu 6-Aminopenicillansäure	Penicillin-Amidase aus <i>E. coli</i>	40.000	North China Pharmaceuticals
Synthese von Acrylamid aus Acrylnitril	Nitril-Hydratase in <i>Pseudomonas chloraphis</i>	30.000	Nitto Chemicals, Degussa
Addition von NH ₃ an Fumarsäure zu L-Asparaginsäure	Aspartase in <i>E. coli</i>	10.000	Tanabe Seiyaku
Racematspaltung von Phenethylaminen	Lipase aus <i>Pseudomonas cepacia</i>	10.000	BASF
Racematspaltung von N-Acyl-DL-Aminosäuren zu L-Aminosäuren	Acylase aus <i>Aspergillus</i> sp.	5.000	Tanabe Seiyaku, Degussa, DSM
Umesterung von Palmöl mit Stearinsäuremethylester zu Kakaobutter	Lipase aus <i>Rhizomucor miehei</i>	1.000	Unilever
Dehalogenierung von 1-Chlorpropandiol	Dehalogenase aus Thermophilen	In Entwicklung	Dow Chemicals

In einem weiteren industriellen Enzymprozess von hoher kommerzieller Bedeutung werden unterschiedliche Penicillin-Amidasen kovalent an unterschiedliche Träger wie Eupergit oder poröse Polyacrylnitrilfasern gebunden. Diese Enzyme spalten Penicillin G zu Phenyllessigsäure und einem wichtigen Vorläufer für synthetische Antibiotika - der 6-Aminopenicillansäure (6-APA). Hier werden operationale Stabilitäten des Enzyms von mehr als 60 Tagen erreicht. Die Enzymproduktivität beträgt 1000 kg - 2000 kg 6-APA pro kg Amidase bei Enzymkosten von etwa 2,50 € / kg Produkt (Buchholz et al. 2005). Analog wird auch 7-Aminocephalosporinsäure (7-ACA) für die Synthese von synthetischen Cephalosporinen mit einer immobilisierten Acylase eingesetzt

Die Racematspaltung von N-Acyl-D,L-Aminosäuren zu L-Aminosäuren stellt ein weiteres Beispiel eines industriellen Prozesses von großer ökonomischer Relevanz dar (Wöltinger et al. 2001; Wöltinger et al. 2005). Diese wurde von der Firma Tanabe Seiyaku zunächst im Festbettreaktor mit einer erstmalig immobilisierten Aminoacylase durchgeführt. Degussa führte 1981 einen Enzym-Membran-Reaktor ein, welcher hier beispielhaft für die dritte Kategorie der Immobilisierung - den Einschluss - steht. Aus einer Strecker-Reaktion hervorgehende D,L-Aminosäuren werden in einer Schotten-Baumann-Reaktion acetyliert und ergeben N-Acyl-D,L-Aminosäuren. Eine mittels Ultrafiltrationsmembranen immobilisierte Aminoacylase spaltet spezifisch nur die N-Acyl-L-Aminosäuren, so dass nur L-Aminosäuren entstehen. Die nicht gespaltenen Aminosäurevorläufer werden einem thermischen Racemisierungsschritt zugeführt und letztlich wieder in den Reaktor zurückgeleitet.

Auch die Methode des Crosslinkings wurde für die bereits beschriebene Synthese von 6-Aminopenicillansäure eingesetzt (Sheldon 2007b). Die Penicillin-Amidase wurde hierbei nicht an einen Carrier gebunden, sondern in Form der bereits erwähnten CLEAs mit Glutardialdehyd quervernetzt, was aufgrund des eliminierten katalytisch inaktiven Volumens des Carriers in einer hohen Produktivität resultierte. Besonders vorteilhaft zeigten sich die CLEAs beim Einsatz in organischen Lösungsmitteln, da sie auch unter diesen für Enzyme normalerweise inaktivierenden Bedingungen ihre hohe Aktivität beibehielten.

3.4 Pervaporation

3.4.1 Prinzip

Bei der Pervaporation handelt es sich um ein Membranverfahren zur Abtrennung von flüchtigen Komponenten aus einem flüssigen Stoffgemisch. Je nach Art der abzutrennenden Komponente und damit der verwendeten Membranbeschaffenheit wird zwischen hydrophiler und organophiler Pervaporation unterschieden. Erste qualitative Beobachtungen des Phänomens sowie die Benennung dieser Technik fanden Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts statt (Kahlenberg 1905; Kober 1917).

Das zu trennende flüssige Stoffgemisch wird bei der Pervaporation über eine dichte (= unporöse) Membran geleitet (Abb. 3-9). Da die Komponenten des Stoffgemisches im Allgemeinen unterschiedliche chemische Eigenschaften besitzen, unterscheidet sich die Löslichkeit der Komponenten in der Membran. Sich lösende Stoffe diffundieren in diese hinein und durch sie hindurch. Die Löslichkeit und das Diffusionsverhalten jeder Komponente im homogenen Membranpolymer resultieren in einer stoffspezifischen Permeationsgeschwindigkeit der Komponente, welche für die Stofftrennung verantwortlich ist. Da auf der anderen Membranseite, der Permeatseite, ein starker

Unterdruck angelegt ist, findet am Ende des Diffusionsweges ein Phasenübergang der Komponente von flüssig zu gasförmig statt. Die hierfür nötige Verdampfungsenthalpie wird der Flüssigphase entzogen, was eine Abkühlung an der betreffenden Stelle zur Folge hat. Dieser Phasenübergang unterscheidet die Pervaporation von verwandten Membrantrenntechniken wie der Umkehrosmose (flüssig/flüssig) und der Gaspermeation (gasförmig/gasförmig).

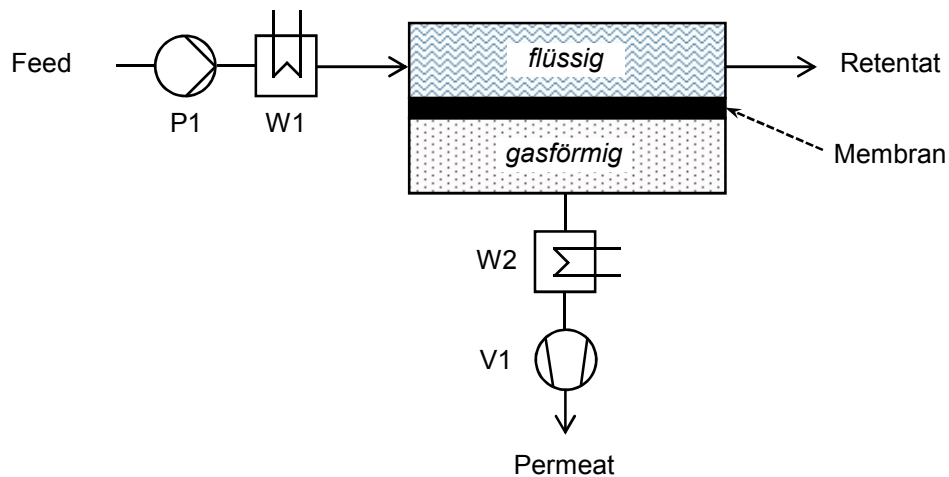


Abb. 3-9 Schema einer Pervaporationseinheit

Ein flüssiger Feedstrom wird temperiert und über eine dichte Membran geleitet. Während das Retentat zurückgeführt werden kann, können in der Membran lösliche und volatile Komponenten wegen eines Unterdrucks auf der Permeatseite abgetrennt werden (Stürken 1994).

Das Retentat kann bei Bedarf dem Feed wieder zugeführt werden, das Permeat wird beispielsweise durch Ausfrieren des Gasstromes mit flüssigem Stickstoff gewonnen. Die Triebkraft für den Stofftransport durch die Membran ist ein Konzentrationsgradient der jeweiligen Komponente über die Membran oder allgemein formuliert der Unterschied im chemischen Potential μ der Komponente auf beiden Seiten der Membran (Stefer 2004). Anders betrachtet setzt die Membran den einzelnen Komponenten einen unterschiedlichen Widerstand entgegen, den diese überwinden müssen. Das Ziel der Membranauswahl bezüglich der aktiven Schichtdicke und des verwendeten Materials muss es sein, den Widerstand für die abzutrennende Komponente möglichst niedrig und für die anderen Komponenten möglichst hoch zu halten. Für jede Anwendung muss letztendlich ein Kompromiss für die beiden Faktoren *Selektivität* der Membran und *Fluss* durch die Membran gefunden werden. Ein hoher Wert des einen Faktors bedingt immer einen niedrigen Wert des anderen. In der Praxis ist oft der Fluss der entscheidende der beiden Faktoren. Ziel einer pervaporativen Trennung kann sowohl ein in Bezug auf eine bestimmte Komponente angereichertes Permeat oder ein angereichertes Retentat sein (Stürken 1994).

Neben der Selektivität hat die Pervaporationstechnik auch den Vorteil einer langen Membranstandzeit, weil praktisch kein Fouling an der unporösen Oberfläche auftreten kann. Weiterhin fungiert bei manchen biotechnologischen Anwendungen die Membran als Sterilbarriere, was weitere Aufarbeitungsschritte eliminiert. Nichtsdestotrotz ist die Pervaporation ein Nischenverfahren, dessen hauptsächlicher Nachteil die geringen Stoffflüsse sind, wenn eine hohe Selektivität gefordert ist. Die hydrophile Pervaporation findet in der industriellen Praxis hauptsächlich bei der Trennung von azeotropen Ethanol/Wasser-Gemischen Anwendung. Inzwischen wurden über 100 Anlagen in Betrieb genommen, von denen die größte einen Durchsatz von 5000 kg/h hat (Baker 2007; Bolto et al. 2011).

Die für diese Arbeit relevante organophile Pervaporation wird größtenteils in Größenordnungen von Labor- oder Pilotanlagen erforscht. Bisher sind lediglich zwei industrielle Anwendungen bekannt (Jonquière et al. 2002; Maltzahn 2005). Interessante Anwendungsmöglichkeiten zeigen sich hier in der Abtrennung von biotechnologisch hergestellten Aromastoffen. In integrierten Bioprozessen wurde gezeigt, dass zum einen die *in situ* Produktabtrennung von z.B. Citronellol, Geraniol und 2-Phenylethanol möglich ist, und zum anderen produktinhibitorische Effekte auf den Mikroorganismus durch die Abtrennung reduziert werden konnten, was in höheren Wachstumsraten und höheren Aromaausbeuten resultierte (Bluemke et al. 2001; Etschmann et al. 2005).

3.4.2 Kennzahlen

Für die quantitative Beurteilung eines Pervaporationsprozesses werden mithilfe von Kennzahlen die Trennleistung und die Trenngüte bewertet (Etschmann 2004).

Die *Trennleistung* wird charakterisiert durch die Gesamtmasse aller pro Zeit- und Flächeneinheit permeierender Komponenten - die Gesamtflussdichte J_{ges} :

$$J_{ges} = \frac{m_p}{A_M \cdot t_{ges}} \quad [\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Da bei der Pervaporation Stoffgemische eingesetzt werden, setzt sich der Permeatstrom meistens aus mehreren Komponenten zusammen. Werden die Massenanteile w_i aller permeierender Komponenten i bestimmt, können damit die Partialflussdichten aller Komponenten berechnet werden:

$$J_i = J_{ges} \cdot w_i \quad [\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (\text{Gl. 3.2})$$

Analog kann die Trennleistung auch in molarer Form angegeben werden. Hierfür muss die Permeatmasse m_P in Gl. 3.1 durch die Permeatstoffmenge n_P und die Massenanteile w_i in Gl. 3.2 durch die Stoffmengenanteile x_i ersetzt und die dimensional Änderungen beachtet werden.

Die *Trenngüte* charakterisiert die Veränderung der stofflichen Zusammensetzung des Permeates im Vergleich zum Retentat. Zentrale Kennzahl hierfür ist der Anreicherungsfaktor β für jede Komponente i . Der Faktor errechnet sich aus dem Quotienten der Konzentrationsmaße der betrachteten Komponente im Permeat und Retentat (Maltzahn 2005):

$$\beta_i = \frac{\overline{x_{i,P}}}{x_{i,F}} \quad [-] \quad (\text{Gl. 3.3})$$

Das Verhältnis der Anreicherungsfaktoren zweier Komponenten i und j liefert den aus der thermischen Verfahrenstechnik bekannten Trennfaktor α_{ij} :

$$\alpha_{ij} = \frac{\beta_i}{\beta_j} = \frac{x_{i,P} \cdot x_{j,F}}{x_{i,F} \cdot x_{j,P}} \quad [-] \quad (\text{Gl. 3.4})$$

Obwohl es sich bei beiden Faktoren um dimensionslose Kenngrößen handelt, muss im Fall des Anreicherungsfaktors β das zugrundeliegende Konzentrationsmaß angegeben werden, da Massenanteile andere Werte liefern als Stoffmengenanteile. Der Trennfaktor α hingegen ist unabhängig vom Konzentrationsmaß. Eine Anreicherung der Komponente i findet statt sobald $\alpha > 1$ wird. Ist $\alpha < 1$, wird Komponente j angereichert.

Die Flussdichten J_i und J_j zweier Komponenten i und j oder auch die Gesamtflussdichte J_{ges} können zur Berechnung einer weiteren die Trenngüte charakterisierenden Kennzahl, der Selektivität S_{ij} oder S_{iges} , herangezogen werden:

$$S_{ij} = \frac{J_i}{J_j} \quad \text{bzw.} \quad S_{iges} = \frac{J_i}{J_{ges}} \quad [-] \quad (\text{Gl. 3.5})$$

Wie beim Anreicherungsfaktor β ist für die Selektivität das für die Berechnung zugrundeliegende Konzentrationsmaß zu beachten.

3.4.3 Betriebsparameter

Um die in Abs. 3.4.2 beschriebenen Faktoren Trennleistung und Trenngüte bei einer gegebenen Anwendung zu optimieren, können die folgenden Betriebsparameter variiert werden:

- Temperatur
- Druck
- Feedkonzentration
- Membranbeschaffenheit

Der externe Stofftransport durch eine sich auf der Feedseite ausbildende Grenzschicht ist von der Viskosität der Lösung und der Diffusionskoeffizienten der Komponenten abhängig. Beide Größen variieren mit Veränderung der Temperatur. Weiterhin ist der Gleichgewichtsdampfdruck der Komponenten der Lösung temperaturabhängig, was einen direkten Einfluss auf die Triebkraft des Pervaporationsprozesses hat. Die Permeabilität P_i , welche das Produkt aus Löslichkeit und Diffusion einer Komponente in der Membran darstellt, ist ebenfalls nach einer Arrhenius-Gleichung temperaturabhängig (Maltzahn 2005):

$$P_i^* = P_{i,0}^* \cdot e^{-\frac{E_P}{R \cdot T}} \quad [\text{kmol} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (\text{Gl. 3.6})$$

Prinzipiell führt also eine Temperaturerhöhung zu einer höheren Permeabilität der Membran bezüglich der Komponente i . Da dies für alle Komponenten gilt, ist in erster Näherung eine Erhöhung des Stoffflusses durch die Membran möglich, ohne die Selektivität zu beeinflussen. Allerdings setzt sich die Aktivierungsenergie der Permeation E_P aus der Sorptionsenthalpie ΔH_{S^*} und der Aktivierungsenergie der Diffusion E_D zusammen:

$$E_P = \Delta H_{S^*} + E_D \quad [\text{kJ} \cdot \text{kmol}^{-1}] \quad (\text{Gl. 3.7})$$

Diese beiden Faktoren sind wiederum temperaturabhängig. In Ausnahmefällen kann bei sorptionskontrollierten Vorgängen die Sorptionsenthalpie negativ werden, was in einer sinkenden Löslichkeit der Komponente in der Membran resultiert und schließlich die Selektivität negativ beeinflussen kann (Stürken 1994; Mulder 1996; Maltzahn 2005).

Der feedseitige Partialdruck der abzutrennenden Komponente hat kaum Einfluss auf die Löslichkeit der Substanz in der Membran, weshalb durch eine Druckerhöhung auf der Feedseite auch keine signifikante Erhöhung der Triebkraft des Pervaporationsprozesses zu erreichen ist. Hier herrscht im allgemeinen Atmosphärendruck. Auf der Permeatseite hingegen wird ein starker Unterdruck angelegt. Hier haben Druckschwankungen einen direkten Einfluss auf die Triebkraft des Prozesses. Wird im Extremfall der Permeatdruck zu hoch, kommt es zur Kondensation der permeierenden Komponente auf der Membranrückseite und der Trennprozess kommt zum Erliegen.

Da die Partialflussdichten nicht linear mit abnehmendem Permeatpartialdruck zunehmen (Alexandre et al. 2000), erhöhen sich die Flussdichten bei niedrigen Drücken überproportional. Ein stabiler Unterdruck auf der Permeatseite wirkt sich also direkt auf die treibende Kraft des Prozesses aus und ist wesentlich wichtiger für die Trennaufgabe als der feedseitige Druck.

Im Gegensatz zum Druck hat die feedseitige Konzentration der Gemischkomponenten sehr wohl einen Einfluss auf die Triebkraft des Trennprozesses. Da die Permeabilität und somit die Flussdichten der betrachteten Stoffe von der gelösten Menge in der Membran abhängen, hat eine hohe Feedkonzentration einen direkten Einfluss auf den Konzentrationsgradienten über die Membran. Da normalerweise aus einem Gemisch nicht nur eine Komponente zu 100% selektiv abgetrennt wird, sondern unterschiedliche Anreicherungen stattfinden, sind auch die relativen Konzentrationsverhältnisse der Komponenten zueinander von Bedeutung. Hier müssen insbesondere Kopplungseffekte genannt werden. Sie sind beispielsweise dafür verantwortlich, dass bei der Alkoholentfernung aus Getränken ein gewisser Verlust an Aroma- und Geschmacksstoffen unumgänglich ist (Bengtson et al. 1995). Ein weiterer wichtiger Effekt speziell für die organophile Pervaporation ist die unterschiedliche Abhängigkeit der Partialflussdichten organischer Stoffe aus wässrigen Lösungen bei variierender Feedkonzentration im Vergleich zur Flussdichte des Wassers (Abb. 3-10).

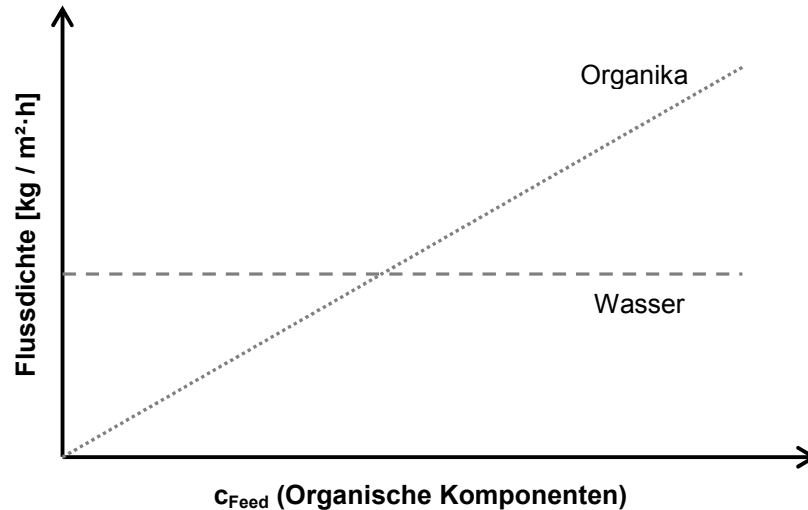


Abb. 3-10 Schematischer Zusammenhang der Partialflüsse von Wasser und Organika bei der organophilen Pervaporation (Hausmanns 1999)

Zur Aufkonzentrierung organischer Stoffe aus wässrigen Lösungen ist eine möglichst hohe Feedkonzentration dieser Stoffe wünschenswert. Bei niedrigen Konzentrationen verschlechtert der relativ hohe Wasserfluss den Aufreinigungsfaktor.

Bei falscher Auslegung der Anlage kann eine Anreicherung negativ beeinflusst werden, wenn die Feedkonzentration der organischen Komponente zu gering wird. Der Wasserfluss nimmt in diesem Fall überproportional zu und verschlechtert das Abtrennergebnis.

Die Membran stellt die Trennschicht zwischen dem Feed- und dem Permeatraum dar und ist somit von essentieller Bedeutung für die Trennaufgabe und das Ergebnis. Zumeist handelt es sich dabei um Kompositmembranen aus 2 bis 3 Schichten: eine 1-20 µm dicke homogene Trennschicht, eine 30-150 µm dicke Stützschrift und einem deutlich dickeren aber extrem porösen Trägervlies. Sowohl die chemische als auch die produktionstechnische Beschaffenheit der Membran wirken sich direkt auf die beiden Faktoren Löslichkeit und Diffusion der Komponenten, welche in der Permeabilität bzw. der Flussdichte resultieren, aus. Obwohl auch die porösen Stützschriften solcher Membranen einen gewissen Diffusionswiderstand darstellen, ist die unporöse Trennschicht die den Prozess bestimmende Größe. Wird ihre Schichtdicke erhöht, nimmt die Gesamtflussdichte ab und die Selektivität zu und entsprechend andersherum. Je nach Temperatur können die Polymere in glasartigem oder gummielastischem Zustand vorliegen. Im letzteren sind die Polymerketten beweglich, was das Sorptionsverhalten der Komponenten beschleunigt und zu einer Quellung der Membran führt. Letztendlich resultiert dies in höheren Flussdichten. Gängige Polymere bei der organophilen Pervaporation sind Polydimethylsiloxan (PDMS), Polyoctylmethylsiloxan (POMS), Polyetherblockamid (PEBA) oder Polytetrafluorethylen (PTFE) (Abb. 3-11).

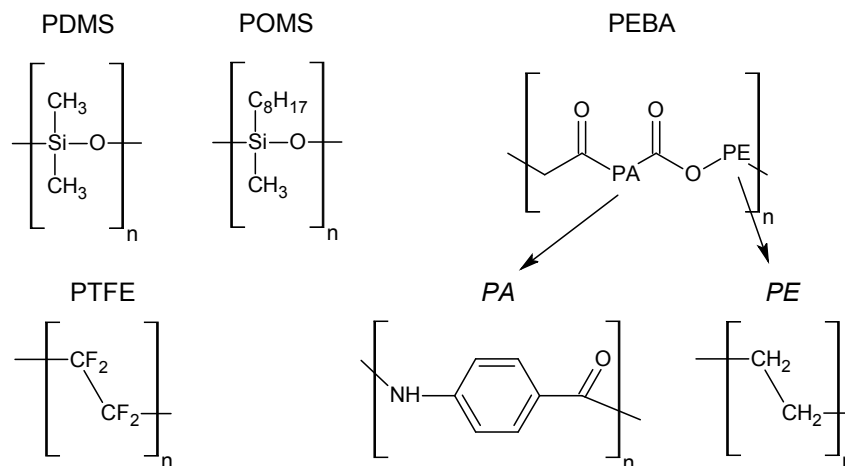


Abb. 3-11 Strukturen gängiger Polymere für organophile Pervaporationsmembranen

PDMS = Polydimethylsiloxan, POMS = Poly(octylmethyl) siloxan, PTFE = Polytetrafluorethylen, PEBA = Polyetherblockamid (Dargestelltes Polyamid (PA) ist beispielhaft, andere sind ebenfalls möglich)

4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Seit der erfolgreichen Klonierung des Gens der Carotinoxygenase *VP14* im Jahr 1997 wurden viele dieser Enzymfamilie angehörende regiospezifische carotinoid-spaltende Enzyme entdeckt, die Gene kloniert und die Enzyme biochemisch charakterisiert. Diese Arbeiten beziehen sich fast ausschließlich auf eine qualitative Analyse des Spaltverhaltens, der Substratazeptanz sowie die Analyse der *in vivo* Lokalisierung und Aktivität dieser Enzyme im Kontext des jeweiligen Wirtsorganismus.

In der vorliegenden Arbeit sollte hingegen die technische Einsetzbarkeit einer der bislang am besten untersuchten Carotinasen, der AtCCD1, zur Aromastoffproduktion aus Carotinoiden untersucht werden.

Nach wie vor ist eine effiziente heterologe Expression des Enzyms aufgrund der Bildung von *inclusion bodies* nicht zufriedenstellend möglich. Aus diesem Grund sollte die Rückfaltung der exprimierten aber inaktiven AtCCD1-Fraktion untersucht werden. Weiterhin ist für die technische Produktion des Enzyms ein Upscaling der Proteinexpression nötig. Hierfür sollten erste Kultivierungen und Expressionen im Bioreaktor durchgeführt und mit den bisher gängigen Schüttelkolbenexperimenten verglichen werden.

Einen weiteren zentralen Schritt für die Kommerzialisierung von enzymkatalytischen Prozessen stellt die Immobilisierung von Enzymen dar. Deshalb sollten erstmals Immobilisierungsstudien mit AtCCD1 durchgeführt werden. Es sollten zwei grundsätzlich unterschiedliche Immobilisierungsprinzipien eingesetzt werden, wobei die Vermittlung der hydrophoben Carotinoid-Substrate als mögliche Schwierigkeit beachtet werden sollte.

Ein weiterer beachtlicher Kostenfaktor bei der Herstellung biotechnologischer Produkte ist das *downstream processing*. Da auch im Fall der Carotinoidspaltung mittels AtCCD1 komplexe Reaktionsmischungen Einsatz finden, sollte die effiziente Abtrennung des Zielproduktes β -Ionon mittels organophiler Pervaporation in einer Laboranlage untersucht und gezeigt werden.

Schließlich sollten die Immobilisierung und die *in situ* Produktabtrennung in einem integrierten Bioprozess kombiniert werden und auf diese Weise die prinzipielle Einsetzbarkeit der AtCCD1 als technisches Enzym für die Produktion und Abtrennung von Aromastoffen nachgewiesen werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Produktion der *Arabidopsis thaliana* Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 (AtCCD1)

Für die wirtschaftliche Nutzung eines biotechnologisch produzierten Enzyms ist ein effizienter Herstellungsprozess nötig, um die Produktionskosten zu minimieren. Im Fall neuartiger, wenig erforschter Enzyme werden zunächst unterschiedliche Expressionshosts und -strategien im Schüttelkolben- oder Mikrotiterplattenmaßstab getestet, um den gentechnisch erfolgversprechendsten Stamm zu identifizieren. Anschließend wird die Enzymproduktion in den Bioreaktormaßstab übertragen, um durch Optimierung der prozesstechnischen Variablen eine Maximierung der Enzymausbeute zu erzielen (Siurkus et al. 2010).

Nachdem in Vorarbeiten erste Expressionsoptimierungen und gentechnische Enzymmodifizierungen durchgeführt worden waren (Schilling 2008), wurden in dieser Arbeit erstmals Upscaling-Versuche im Bioreaktormaßstab durchgeführt und die Enzymexpression von AtCCD1 im Hochzelldichteverfahren realisiert. Weiterhin wurde eine partielle Aufreinigungsstrategie sowie ein *refolding* der als *inclusion bodies* exprimierten AtCCD1 erreicht. Zum Zweck einer stabilen Lagerung wurden Lyophilisierungsversuche in Abwesenheit und Gegenwart von Lyoprotektoren durchgeführt und die AtCCD1 erstmals auf diese Art in aktiver Form konserviert.

5.1.1 AtCCD1 Expression mittels *Escherichia coli* Hochzelldichtekultivierung

Zur Verbesserung der Expressions- und Aktivitätsausbeute von AtCCD1 wurde eine an GST fusionierte AtCCD1-Variante in vier Kultivierungsansätzen mit leicht unterschiedlichen Parametern in einem DASGIP-Parallelreaktor-System mit 250 mL Maximalvolumen exprimiert. Drei Reaktoren wurden im Fed-Batch Verfahren mit Minimalmedium und Regelung der Prozessparameter betrieben. Zu Kontrollzwecken wurde ein Reaktor im Batch Verfahren mit Vollmedium unregelt, bei statischer Rührerdrehzahl und ohne aktive Belüftung betrieben. Der Zeitpunkt der Expressionsinduktion mit IPTG wurde variiert, um zu ermitteln, in welchem Fall die höchste Enzymaktivität zu erreichen war. Die Biomassekonzentration sowie die resultierenden Enzymaktivitäten wurden ermittelt.

Vor dem Ultraschall-Zellaufschluss wurden die Zelldichten normiert, um gleiche Bedingungen beim Aufschluss, in den Aufarbeitungsschritten und den Aktivitätsmessungen zu gewährleisten. Um die Ausbeute der membranständigen AtCCD1 zu maximieren wurde der Aufschluss mit 0,2% (w/v) Triton X-100 versetzt und 30 Minuten

inkubiert. Es wurde ein Aktivitätsassay mit β -Apo-8'-carotenal im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Der Biomassezuwachs mit den entsprechenden Induktionszeitpunkten ist in Abb. 5-1 zu sehen.

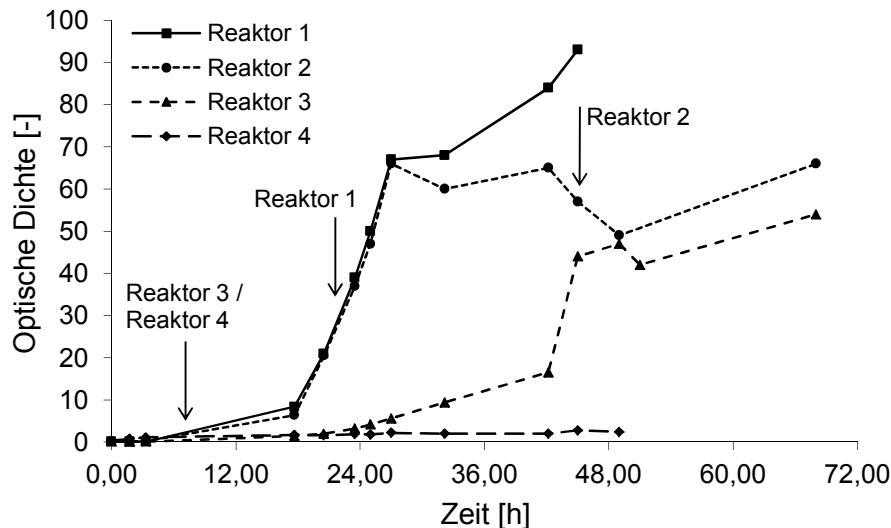


Abb. 5-1 Verlauf der optischen Dichten bei der Hochzelldichtekultivierung von GST-AtCCD1 exprimierenden *E. coli* BL21 im DASGIP-Parallelfemter-System

Reaktoren 1-3 wurden mit Regelung der Betriebsparameter im Fed-Batch mit Minimalmedium betrieben, Reaktor 4 als Batch ungerregelt mit LB-Medium. Die Pfeile markieren die jeweiligen Induktionszeitpunkte mit IPTG (0,2 mM).

Der schnellste und höchste Biomassezuwachs wurde in den Reaktoren 1 und 2 mit finalen optischen Dichten von etwa 100 und 65 erreicht. Dies hängt mit dem vergleichsweise späten Induktionszeitpunkt zusammen, was aus dem Vergleich mit Reaktor 3 (finale OD = 50) hervorgeht. Die Organismen in den Reaktoren 1 und 2 erreichen die exponentielle Wachstumsphase bereits nach 18 Stunden, während diejenigen im Reaktor 3 diese erst nach etwa 42 Stunden erlangen. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der Umstellung des Metabolismus und einer Stressantwort von *E. coli*, sobald IPTG dem Medium zugeführt wird, da alle anderen Parameter konstant gehalten wurden. Diese Stressantwort wirkt sich auch auf die Wachstumsrate aus (Kosinski et al. 1992). Weiterhin stellt die mit der Induktion eingeleitete heterologe Enzymexpression eine metabolische Belastung dar, welche den Organismus zwingt, Energie und Zellbausteine aufzuwenden, die folglich für die Zellreproduktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Da IPTG nicht metabolisiert wird (Dekel et al. 2005), die Zelldichte aber im Fall der Reaktoren 1 und 2 bei Induktion bereits hoch ist, ist die relative IPTG Menge klein im Vergleich zu kleineren Zelldichten. Die einzelne Zelle ist einem vergleichsweise kleinem induktionsbedingtem Stress ausgesetzt als dies bei kleineren Zelldichten der Fall ist. Im Reaktor 3 hingegen wurde bereits bei sehr geringer Biomassekonzentration entsprechend einer hohen relativen IPTG-Menge induziert. In diesem Fall beginnt die Enzymexpression früher, so dass

die metabolische Mehrbelastung das Zellwachstum verzögert. Die Expression eines rekombinanten Enzyms stellt für *E. coli* eine Belastung, die mit der eines Hitzeschocks vergleichbar ist, dar (Valdez-Cruz et al. 2011).

Da zum ersten Mal ein Fed-Batch-Prozess im Labormaßstab mit Minimalmedium für die AtCCD1-Expression durchgeführt wurde, lieferte Reaktor 4 eine Vergleichsmöglichkeit mit dem bisher eingesetzten LB-Medium unter unregelmäßigen Bedingungen im Batch-Prozess. Wie erwartet wurde in diesem Fall mit einer OD von 3 die Biomassendichte der Fed-Batch-Prozesse nicht erreicht. Ein möglicher Grund hierfür ist eine Acetat-Produktion, welche in Kultivierungen mit Vollmedium oftmals eintritt und sich wachstumshemmend auswirkt (Jana et al. 2005). Weiterhin ist LB-Medium in der Versorgung der Organismen mit Kohlenstoff limitierend (Losen et al. 2004). Gepuffertes und mit Glucose oder Glycerol angereichertes Medium kann in diesem Fall hilfreich und der Biomasseproduktion förderlich sein. Letztendlich wirkte sich die frühe Induktion wie auch bei Reaktor 3 bereits diskutiert wachstumshemmend aus.

Für die Aktivitätsuntersuchungen der exprimierten AtCCD1 wurde zu Vergleichszwecken ein Enzympräparat aus einem Schüttelkolbenansatz (400 mL Kulturvolumen, OD = 5) herangezogen, da bisherigen Enzymcharakterisierungen diese Art der Expression vorausgegangen war (Schilling et al. 2007; Schilling et al. 2008). Der Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten bezogen auf die Gesamtproteinmenge aus den Reaktorkultivierungen zeigt, dass Reaktor 4 trotz der mit Abstand schwächsten Biomasseproduktion die höchste aber in der Größenordnung des Reaktors 1 liegende spezifische Enzymaktivität liefert (Abb. 5-2 A). Diese nimmt in den Reaktoren 2 und 3 ab. Bemerkenswert ist, dass der Schüttelkolbenansatz nochmals eine etwa um den Faktor 3 höhere spezifische Aktivität liefert. Ein möglicher Grund hierfür ist eine Sauerstofflimitierung im ebenfalls mit LB-Medium geführten Reaktor 4 verglichen mit dem Schüttelkolben. Da Reaktor 4 nicht aktiv begast wurde und der Füllstand mit 250 mL sehr hoch war, konnten die Organismen nur über eine kleine spezifische Grenzfläche mit Sauerstoff versorgt werden. Dies führte dazu, dass nach bereits 90 Minuten Kultivierungsdauer die gelöste Sauerstoffkonzentration auf unter 1% fiel. Für einige *E. coli* Stämme konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der gelösten Sauerstoffmenge im Medium in kleineren Plasmidkopienzahlen und geringerer Expression von rekombinanten Proteinen resultierte (Li et al. 1992), was eine mögliche Erklärung für die niedrigere spezifische Aktivität darstellt. Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass perfluorierte Kohlenstoffverbindungen eine etwa 20-fach höhere Löslichkeit von Sauerstoff erlauben. Wenn diese als Additive in Hochzelldichtekultivierungen eingesetzt werden, kann aufgrund der so verbesserten Sauerstoffversorgung der Zellen eine höhere Ausbeute an korrekt gefalteter rekombinanter Alkoholdehydrogenase erzielt werden (Pilarek et al. 2011). Im vorliegenden Experiment war aufgrund der fehlenden aktiven Begasung im Bioreaktor die Sauerstoffversorgung im Schüttelkol-

ben bei höherer spezifischer Stoffaustauschfläche besser, was sich positiv auf die korrekte Proteinfaltung und somit die spezifische AtCCD1-Aktivität ausgewirkt hat. Die leicht verbesserte Biomasseproduktion im Schüttelkolbenansatz im Vergleich mit Reaktor 4 ist durch eine erhöhte Scherbeanspruchung der Zellen durch den Energieeintrag des Rührers erklärbar (Lange et al. 2001). Hohe Scherbeanspruchung führte in diesen Experimenten zu einer Zelllyserate von bis zu 80%. Weiterhin ist bekannt, dass eine erhöhte hydrodynamische Belastung der Zellen zu Veränderungen in dessen Metabolismus führt (Edwards et al. 1989). Dies kann ein weiterer Grund für den Aktivitätsunterschied zwischen Enzym aus dem Bioreaktor und dem Schüttelkolben sein.

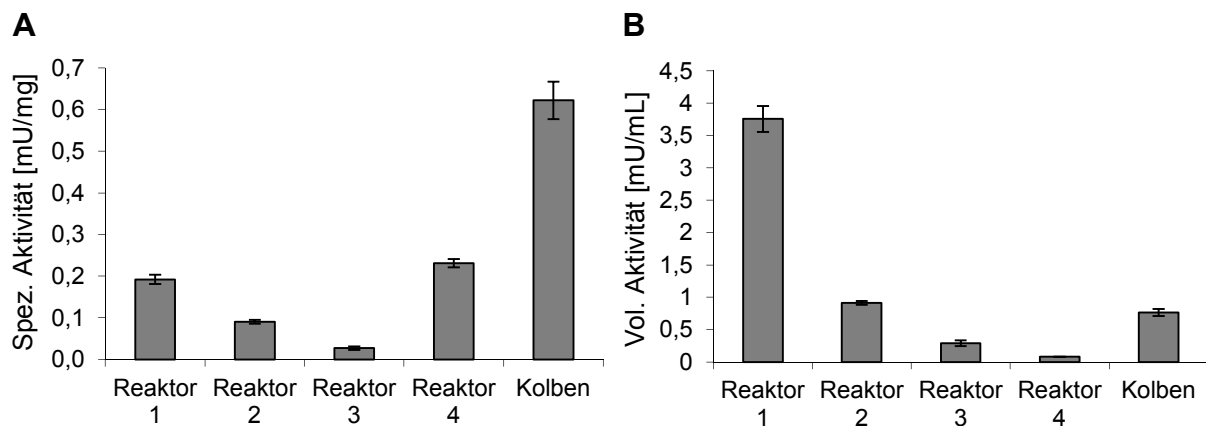


Abb. 5-2 Spezifische (A) und volumetrische (B) Aktivität der GST-AtCCD1 aus den unterschiedlichen Kultivierungsansätzen

Die höchste spezifische Aktivität bezogen auf die Proteinmenge wird im Schüttelkolben-Ansatz erreicht. Die höchste volumetrische Aktivität bezogen auf das Kulturvolumen wird wegen der deutlich höheren Biomasseproduktion im Reaktor 1 erzielt. Die enzymatischen Aktivitäten wurden in 3-fach Replikaten ermittelt.

Ein möglicher Grund für die erhöhten spezifischen Aktivitäten in den Ansätzen mit LB-Medium, verglichen mit den mit Minimalmedium betriebenen Reaktoren 2 und 3, könnte eine verbesserte Versorgung der Organismen mit Aminosäuren und weiteren komplexen Bestandteilen wie Vitaminen oder Cofaktoren direkt aus dem Medium sein. Da die Organismen im Minimalmedium diese Komponenten *de novo* synthetisieren müssen, während sie im Komplexmedium fertig vorliegen, kann hier eine gewisse Limitierung vorliegen (Boccazzi et al. 2005; Sahdev et al. 2008).

Weiterhin hat die Wachstumsrate einen deutlichen Einfluss auf die Produktion eines rekombinanten Proteins. So fanden (Cheng et al. 2003) heraus, dass es im Fall der Expression einer Nuclease in *E. coli* eine optimale Wachstumsrate gibt, oberhalb derer die exprimierte Proteinmenge je Zelle wieder abnimmt. Da die Autoren annehmen, dass es sich hierbei um eine universelle Eigenschaft von *E. coli* handelt, kann dies eine Erklärung für die geringeren spezifischen Proteinaktivitäten in den mit Mi-

nimalmedium geführten Produktionsansätzen sein. Hier ist die Wachstumsrate ebenfalls deutlich höher als in den Ansätzen mit LB-Medium.

Die alleinige Betrachtung der spezifischen Enzymaktivität ist allerdings nicht ausreichend. Da für einen Produktionsprozess der Absolutwert der erzielten enzymatischen Aktivität ausschlaggebend ist, wurden auch die volumetrischen Aktivitäten berechnet (Abb. 5-2 B). Hier zeigt sich, dass wegen der deutlich höheren Biomasseproduktion die volumetrische Enzymaktivität den Schüttelkolbenansatz etwa um den Faktor 4 übersteigt. Auch der Reaktor 2, welcher die zweithöchste Biomassedichte erreichte, ist in der volumetrischen Aktivität mit dem Schüttelkolben vergleichbar, welcher die höchste spezifische Enzymaktivität aufwies. Reaktoren 3 und 4 schneiden auch bei dieser Betrachtung am schwächsten ab.

Zusammenfassend ist aus den Kultivierungsversuchen zu entnehmen, dass der Einsatz von Minimalmedium in einem Fed-Batch-Prozess die höchsten Biomassedichten hervorbringt. Kombiniert mit einer IPTG-Induktion in der exponentiellen Wachstumsphase ist die höchste volumetrische Enzymaktivität erzielbar. Der Einsatz von Vollmedium im Batch-Verfahren resultiert zwar in den höchsten spezifischen Aktivitäten, generiert allerdings nicht die hohen Biomassedichten wie ein Minimalmedium im Fed-Batch. Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass die rekombinante Produktion von aktiver GST-AtCCD1 im kleinen Bioreaktormaßstab möglich ist und volumetrisch betrachtet eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 4 erreicht wurde.

Mit der Erkenntnis, dass höhere Enzymausbeuten durch Verwendung von Minimalmedium erreicht werden, liegt eine Mediumoptimierung durch statistische Versuchsplanung („*design of experiments*“) nahe. An dieser Stelle sei auf die Abhängigkeit der AtCCD1 auf Eisenionen als Cofaktor hingewiesen. In *refolding* Experimenten wurde gezeigt, dass die korrekte Vermittlung des Eisens ins aktive Zentrum entscheidenden Einfluss auf die Enzymaktivierung besitzt (vgl. Abs. 5.1.3.). Dieser Aspekt könnte zukünftig besondere Beachtung beim Mediumdesign in Form der Zugabe unterschiedlicher Eisensalze sowie Komplexbildner finden.

Auch die Expressionstemperatur hat einen entscheidenden Effekt auf die heterologe Proteinexpression und das Verhältnis von korrekt gefaltetem zu fehlerhaft gefaltetem Protein (Sahdev et al. 2008). So war es auch für die AtCCD1 im Schüttelkolbenmaßstab möglich, durch ein Absenken der Expressionstemperatur von 37°C auf 16°C die spezifische Enzymaktivität zu steigern (Schilling 2008). Dies kann mit einer Verlangsamung des Gesamtmetabolismus des Expressionsstammes und somit auch der Translationsgeschwindigkeit erklärt werden. Der Translationsapparat wird auf diese Weise nicht so stark überlastet und produziert mehr korrekt gefaltetes Protein. Da der *E. coli* Translationsapparat bei der Hochzelldichtekultivierung anders beansprucht

wird als im Schüttelkolben, wäre eine Optimierung der Kultivierungstemperatur unter diesen Betriebsbedingungen angebracht.

Im Fall von schwierig zu exprimierenden Enzymen werden häufig Chaperone als Faltungshelfer eingesetzt (Sahdev et al. 2008). Dieses Vorgehen zeigte auch für die AtCCD1 einen vorteilhaften Effekt (Nacke 2011). Ein weiterer möglicher Schritt wäre dementsprechend, die Hochzelldichtekultivierung unter optimierten Medium- und Temperaturbedingungen mit der Coexpression von Chaperonen zu verbinden und so die Enzym- und Aktivitätsausbeute weiter zu steigern.

5.1.2 Partielle AtCCD1-Aufreinigung und Lyophilisierung

Für den kommerziellen Einsatz der AtCCD1 und ebenso anderer Enzyme muss neben der operationalen Stabilität auch Lagerstabilität und Transportierbarkeit gewährleistet sein (Roy et al. 2004). Eine gut geeignete Möglichkeit hierfür ist die Lyophilisierung, bei der dem Produkt im gefrorenen Zustand durch Sublimierung das Wasser entzogen wird. Mit dieser auch in der Lebensmittelindustrie etablierten Methode wird das Produkt sehr schonend getrocknet, was sich bei Proteinen im Allgemeinen positiv auf die Aktivitätserhaltung auswirkt (Cleland et al. 1993; Wang 2000; Trappler 2004). Aus diesem Grund wurde diese Methode für die Lagerung von AtCCD1 untersucht.

Da unterschiedliche Proteine unterschiedlich auf den Lyophilisierungsprozess reagieren und es hierbei auch zu unerwünschten Inaktivierungen kommen kann, wurde der Einsatz von sogenannten Lyoprotektoren getestet. Dabei handelt es sich um niedermolekulare Zucker oder bestimmte Polymere, die sich in Lösung an das zu lyophilisierende Protein anlagern und es während der Gefrier- und Sublimierungsphase vor Denaturierung und Inaktivierung schützen (Fox 1995; Wang 2000).

Es wurde untersucht, wie AtCCD1 auf eine Lyophilisierung und Lagerung in dieser Form reagiert. Dafür wurde GST-AtCCD1 mit $M_w = 87,2$ kDa exprimiert, die Zellen durch Sonifikation und ohne Zusatz von Triton X-100 aufgeschlossen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet und weiterverwendet. Das Pellet wurde im gleichen Volumen Aufschlusspuffer resuspendiert und mit 1% (w/v) Triton X-100 zum Herauslösen der AtCCD1 aus Membranfragmenten versetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand als Triton-Extrakt bezeichnet und weiterverwendet. Es wurden die so gewonnene AtCCD1-Menge, -Aktivität und Lyophilisierbarkeit ohne und mit den Lyoprotektoren Polyethylenglykol (PEG), Saccharose und Mannitol untersucht. Zur Vollständigkeit der AtCCD1-Mengenvergleiche wurde das Pellet nochmals im gleichen Volumen gelöst und eine Probe der unlöslichen Proteinfraction für eine SDS-PAGE-Analyse verwendet.

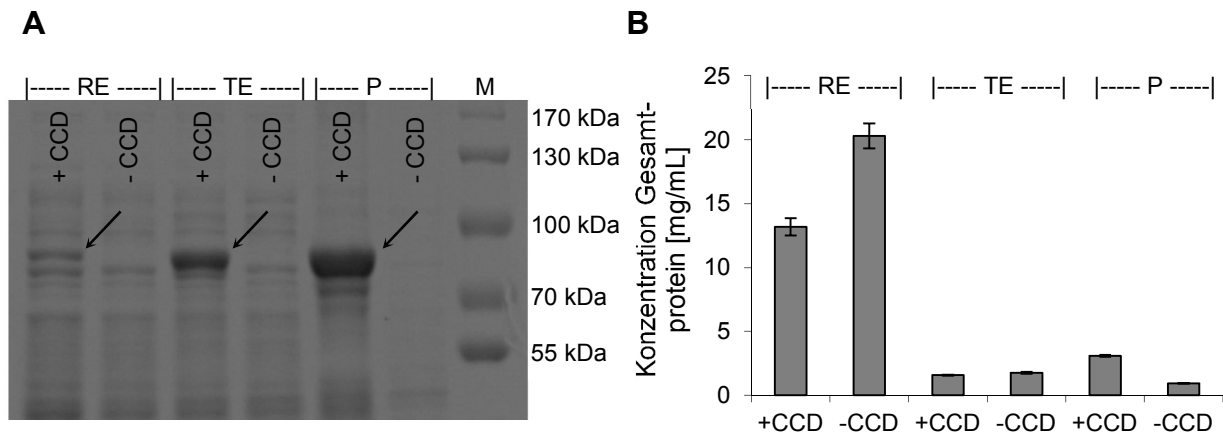


Abb. 5-3 SDS-PAGE unterschiedlicher Protein-Fractionen (A) und Gesamtproteinkonzentrationen derselben Fractionen (B)

Verglichen wird (A) die relative Intensität der GST-AtCCD1-Banden (Pfeile) und (B) die Gesamtproteinmenge der auf unterschiedliche Weise gewonnenen Proteinfraktionen:
 Rohextrakt: lösliches Protein nach Aufschluss und Zentrifugation
 Triton-Extrakt: im gleichen Volumen Aufschlusspuffer mit 1% (w/v) Triton X-100 resuspendiertes, 30 Minuten inkubiertes und zentrifugiertes Pellet
 Pellet: nochmals im gleichen Volumen resuspendiertes Pellet
 +CCD: Proteinexpression mit GST-AtCCD1 tragendem Plasmid
 -CCD: Proteinexpression als Negativkontrolle mit Plasmid ohne AtCCD1, nur GST
 RE = Rohextrakt, TE = Triton-Extrakt, P = Pellet, M = Marker

Für die SDS-PAGE wurden 20 µg Protein je Bahn aufgetragen, so dass optisch die relative AtCCD1-Menge abschätzbar ist. Die Pfeile in Abb. 5-3 A zeigen, dass eine erfolgreiche Überexpression der GST-AtCCD1 stattgefunden hat. Während in allen Proben mit AtCCD1-tragendem Plasmid (+CCD) die erwartete Bande sichtbar ist, sind alle Kontrollen mit Plasmid ohne AtCCD1 (-CCD) negativ. Gleichzeitig ist ersichtlich, dass der Anteil der AtCCD1 am Gesamtprotein der jeweiligen Fraktion zunimmt. Wird lediglich der Rohextrakt nach Zellaufschluss und Zentrifugation verwendet, so ist zwar der Proteingehalt mit etwa 13,2 mg/mL am höchsten (Abb. 5-3 B), der Anteil an *E. coli* Protein aber sehr hoch. Der Extraktionsschritt mit Triton X-100 kann als einfache partielle Aufreinigung angesehen werden, da in diesem Präparat die meisten *E. coli* Proteine bereits ausgewaschen sind (Gesamtproteinmenge 1,6 mg/mL), während AtCCD1 aus Membranfragmenten erst herausgelöst wird. Korrekt gefaltete membranassoziierte Proteine können auf diese Weise isoliert und in Lösung gebracht werden (Garavito et al. 2001). Densitometrische Messungen legen hier einen Anstieg des AtCCD1 Anteils am Gesamtprotein um etwa den Faktor 4 von 11% auf 44% im Fall der mit Triton X-100 extrahierten Probe nahe. Die vergleichsweise hohe Gesamtproteinkonzentration in den Leervektor-Expressionen ist in der heterologen Expression des GST-Tags ($M_w = 26,3$ kDa) begründet. Dieser ist im Kontrollvektor kodiert und wird ebenfalls induziert, ist wegen seiner geringen Größe aber in Abb. 5-3 nicht zu sehen. Die unlösliche *inclusion body* Fraktion, welche als Pellet nach dem Extraktionsschritt zurückbleibt, enthält wiederum mehr AtCCD1 als die

extrahierte Fraktion. Die genaue Quantifizierung ist in diesem Fall sehr schwierig, weil zum einen die Proteinkonzentrationsbestimmung wegen der unlöslichen Partikel einem größeren Fehler unterworfen und die densitometrische Messung in diesem Fall recht ungenau ist. Allerdings kann optisch abgeschätzt werden, dass mindestens die doppelte Menge an AtCCD1 im Vergleich zur Triton-Extrakt-Fraktion nochmals unlöslich im Pellet vorliegt (Abb. 5-3). Während der Zusatz von Triton X-100 bisher verwendet wurde, um die AtCCD1 Menge im Rohextrakt zu erhöhen (Schilling et al. 2007), kann durch Verwerfen des Rohextraktes und anschließende Triton X-100 Extraktion eine Teilreinigung der AtCCD1 erfolgen. Der große Anteil an AtCCD1, welcher an Membranfragmenten assoziiert oder in *inclusion bodies* vorliegt, ist neben den Strukturuntersuchungen zur homologen ACO (Kloer et al. 2005) und auf Sequenzhomologie basierenden Modellierungen der AtCCD1 (Nacke 2011) ein weiterer Hinweis auf die Existenz hydrophober Bereiche an der Enzymoberfläche, welche zur Assoziation mit Membranen dienen und so zur Substrataufnahme verhelfen können.

Die spezifische Aktivität und Stabilität der beiden katalytisch aktiven AtCCD1-Präparationen (Rohextrakt und Triton-Extrakt) wurde bei unterschiedlicher Lagerung getestet und verglichen. Beide Extrakte wurden in Parallelansätzen mit oder ohne Lyoprotektion in flüssigem Stickstoff schockgefroren ein Teil lyophilisiert, während ein anderer Teil bei -80°C gelagert wurde. Als Lyoprotektoren wurden Polyethylenglycol (PEG), Sucrose und Mannitol getestet (jeweils 1% w/v). Diese Substanzen wurden ausgewählt, da sie sich bereits historisch für die Anwendung zur Lyoprotektion bewährt haben (Wang 2000) und durch ihre Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Stoffklassen eine Variation im Screening darstellen. Im Weiteren werden diese Substanzen als Lyoprotektoren bezeichnet, obwohl sie ebenso als Kryoprotektoren beim Einfrierschritt wirken können. Die enzymatische Aktivität wurde im Mikrotiterplatten-Assay in Dreifachansätzen mit dem Modellsubstrat β -Apo-8'-carotenal nach unterschiedlicher Lagerdauer ermittelt. Die unspezifische durch Autooxidation stattfindende Carotinoidspaltung wurde durch Mitführen von Leervektor-Extrakten kompensiert.

Nach Abb. 5-4 A ist die höchste spezifische AtCCD1-Aktivität mit 3,1 mU/mg Protein mit dem Triton-Extrakt ohne Zusätze erzielbar. Die Aktivitätsmessung nach Zugabe der Lyoprotektoren Sucrose, PEG und Mannitol reduziert vor der eigentlichen Lyophilisierung die enzymatische Aktivität ein wenig. Unterschiedliche Ursachen sind hierbei möglich.

Beispielsweise ist bekannt, dass PEG bis zu Konzentrationen von 200 mg/mL präferiert Interaktionen mit Proteinen unterschiedlicher Nettoladung im Vergleich mit der Wasserinteraktion eingeht. Auf diese Weise kann es zum einen die native Enzymkonformation stören (Sharma et al. 2004), zum anderen mit dem Protein über hydrophobe Wechselwirkungen interagieren (Arakawa et al. 1985). Diese Wechselwirkung

mit hydrophoben Proteinbereichen von AtCCD1 kann die Interaktion des Enzyms mit der substratbeladenen Mizelle oder auch die Aufnahme des hydrophoben Substrats in den mit hydrophoben Aminosäuren ausgekleideten Substratkanal erschweren (Nacke 2011). Alle eingesetzten Protektoren können auch proteinfällend wirken, was ebenfalls einen leichten Rückgang der enzymatischen Aktivität erklären würde (Kumar et al. 2009).

Interessanterweise interagieren Mannitol und Sucrose tendenziell nicht mit gelösten verdünnten Proteinen (Carpenter et al. 1988), so dass der leichte Aktivitätsrückgang in diesem Fall eher durch den Einfluss auf die Reaktionslösung erklärt werden muss. Allerdings ist eine Klärung des genauen Wirkmechanismus in diesem Fall wegen der Komplexität der Reaktionslösung ohne tiefere Untersuchungen kaum möglich.

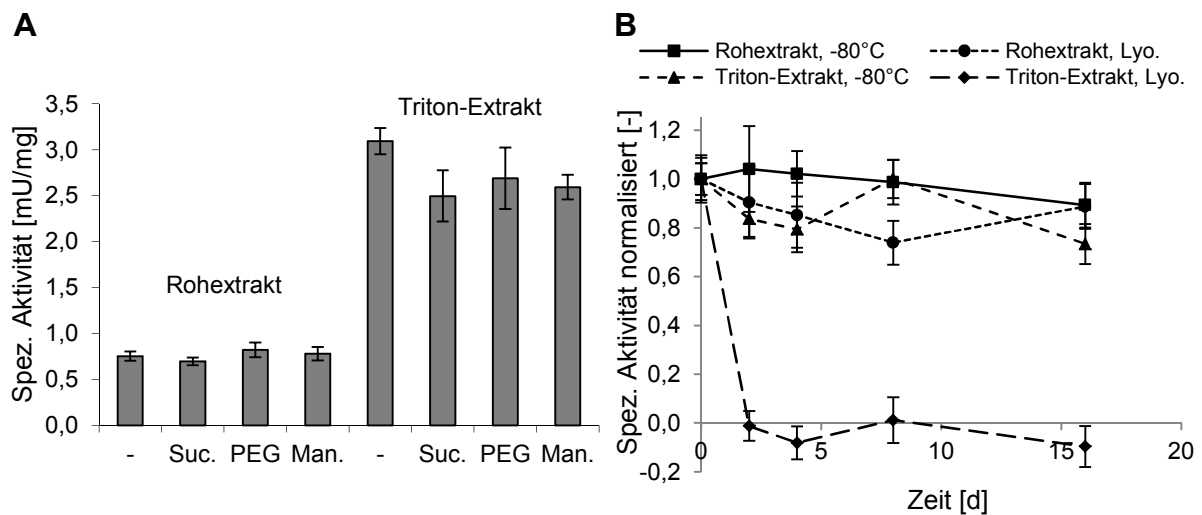


Abb. 5-4 Spezifische Aktivitäten von AtCCD1 vor der Lyophilisierung (A) und Lagerstabilität von GST-AtCCD1 (B)

- (A) Die spezifischen Aktivitäten von 2 unterschiedlichen GST-AtCCD1-Präparationen werden verglichen: Rohextrakt = Extrakt nach Zellaufschluss und Zentrifugation; Triton-Extrakt = Überstand vom in gleichem Volumen Aufschlusspuffer und 1% (w/v) Triton X-100 resuspendiertem, 30 Minuten inkubiertem und zentrifugiertem Pellet; - = kein Zusatz, Suc./PEG/Man. = 1% (w/v) Sucrose/Polyethylenglycol/Mannitol als Lyoprotektor im Extrakt; Aktivitäten wurden als 3-fach Replikate mit β -Apo-8'-carotenal als Substrat gemessen.
- (B) Die Enzymstabilität bei 4 unterschiedlichen Lagerbedingungen wird verglichen: Rohextrakt/Triton-Extrakt = s. (A); Lyo = Lyophilisat, -80°C = eingefrorene Enzymlösung; keine Lyoprotektoren; spezifische Aktivität wurde normalisiert auf die Initialaktivität vor dem Einfrieren; Aktivitäten wurden als 3-fach Replikate mit β -Apo-8'-carotenal als Substrat gemessen.

Die spezifische Aktivität des Rohextraktes ist mit 0,8 mU/mg Protein etwa um den Faktor 3 kleiner. Dies steht im Einklang mit den in Abb. 5-3 A dargestellten Ergebnissen zur Proteinaufbereitung. Der Zusatz der Lyoprotektoren hat in diesem Präparat keine negative Auswirkung, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass der Rohextrakt bereits eine komplexe Mischung aus löslichen *E. coli* Proteinen und anderen löslichen Zellbestandteilen darstellt. Die zusätzlich eingebrachten Lyoprotektoren

können mit wesentlich mehr Komponenten interagieren, was ihren aktivitätsreduzierenden Einfluss mindert.

Die Lyophilisierung des Triton-Extraktes führt interessanterweise zur sofortigen Inaktivierung der AtCCD1, während die Lyophilisierung des Rohextraktes die Enzymaktivität kaum negativ beeinflusst (Abb. 5-4 B). Die Lagerung beider Enzympräparate bei -80°C ohne vorherige Lyophilisierung ist wiederum ohne nennenswerten Aktivitätsverlust möglich. Die Zugabe der Lyoprotektoren verhinderte die Inaktivierung des Triton-Extraktes nicht (nicht gesondert dargestellt).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Inaktivierung der AtCCD1 nicht beim Einfrierschritt, sondern beim darauf folgenden Entzug der Wassermoleküle passiert. Weiterhin bieten die Komponenten des Rohextraktes, wie z.B. andere lösliche Proteine oder Membranfragmente einen besseren Schutzeffekt als die gesondert zugeführten Lyoprotektoren. Aufgrund der nicht exakt definierten Natur des Rohextraktes ist die ursächliche Schutzkomponente schwierig zu identifizieren. Allerdings ist bekannt, dass insbesondere der Gehalt an nativem Protein eine wirkungsvolle Methode der Lyoprotektion darstellt. So wird beispielsweise in manchen Lyophilisierungsstrategien BSA wirkungsvoll zum Schutz des eigentlichen Proteins zugesetzt. Weiterhin wurde gezeigt, dass höhere Proteinkonzentrationen linear mit einem verbesserten Lyophilisierungsverhalten korrelierten (Wang 2000).

Obwohl der Einsatz der Lyoprotektoren die AtCCD1-Inaktivierung bei der Lyophilisierung des Triton-Extraktes nicht verhindern konnte, haben diese Zusätze als Kryoprotektoren eine Schutzwirkung beim Einfrieren in flüssigem Stickstoff und der Lagerung bei -80°C ohne vorherige Lyophilisierung (Abb. 5-5 A). Während der Kontrollansatz im Laufe der Lagerung auf etwa 73% Restaktivität abfällt, liegt die verbliebene Aktivität aller mit den Zusätzen Sucrose, PEG und Mannitol vorbehandelten Proben teilweise sogar über dem initialen Aktivitätsniveau.

Für die entsprechende Lagerung des Rohextraktes zeigen die Zusätze wiederum keinen signifikanten Schutz (Abb. 5-5 B). Hier stagnieren die Aktivitäten bei allen Proben auf vergleichbarem aber hohem Niveau. Ähnlich wie bereits in Abb. 5-4 B gezeigt, scheinen die unterschiedlichen Komponenten des Rohextraktes auch bei der Lagerung bei -80°C präferiert mit AtCCD1 zu interagieren und diese zu stabilisieren, da ein Einfluss der zugesetzten Lyoprotektoren wie im Fall des Triton-Extraktes nicht ersichtlich ist.

Derzeit gibt es zwar einige Theorien über die mögliche Wirkweise der verwendeten Zusätze sowie phänomenologische und vergleichende Beschreibungen, allerdings keine gesicherten Erkenntnisse. So wird angenommen, dass eine Größenveränderung der Eiskristalle oder eine Veränderung der Oberflächenspannung durch die Zusätze eine proteinschützende Wirkung haben kann (Wang 2000). Da hohe Proteinkonzentrationen ebenfalls schützend wirken, wurde vorgeschlagen, dass hier eine

sterische Hinderung der Proteindenaturierung durch die Zusammenlagerung der Proteine stattfindet (Allison et al. 1996).

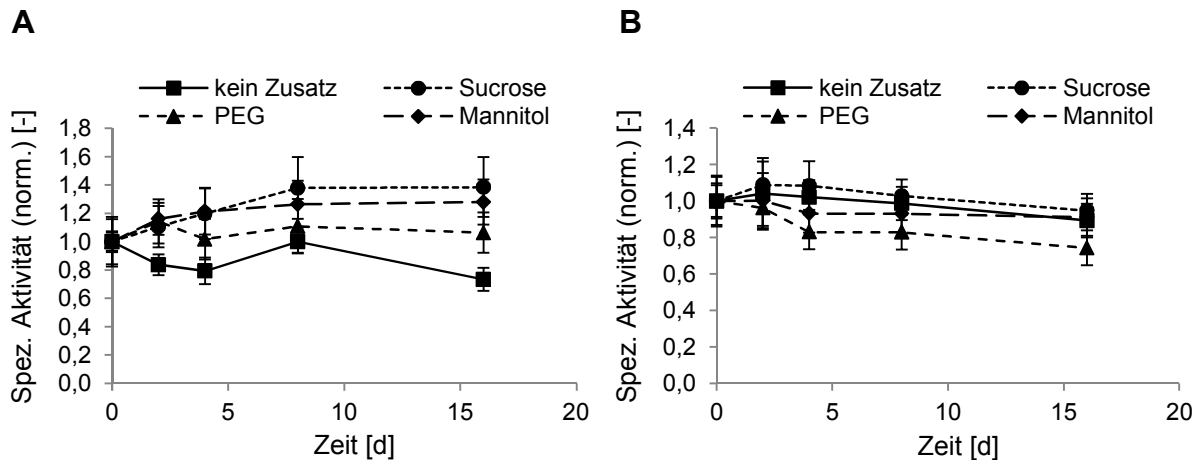


Abb. 5-5 Enzymaktivität und -stabilität bei Zugabe von Lyoprotektoren bei Lagerung bei -80°C ohne Lyophilisierung: (A) GST-AtCCD1 Triton-Extrakt, (B) GST-AtCCD1 Rohextrakt

Die normalisierten spezifischen Aktivitäten von 2 unterschiedlichen GST-AtCCD1-Präparationen werden verglichen: Rohextrakt = Extrakt nach Zellaufschluss und Zentrifugation; Triton-Extrakt = Überstand vom entsprechenden in gleichem Volumen Aufschlusspuffer und 1% (w/v) Triton X-100 resuspendiertem, 30 Minuten inkubiertem und zentrifugiertem Pellet;

Die spezifischen Aktivitäten wurden als 3-fach Replikat mit β -Apo-8'-carotenal als Substrat bestimmt und auf die Initialaktivität vor dem Einfrieren normalisiert. Die Konzentration der Lyoprotektoren betrug 1% (w/v) der Enzymlösung.

5.1.3 Rückfaltung von AtCCD1 Einschlusskörpern

In Abb. 5-3 A wurde gezeigt, dass neben der löslich exprimierten und durch Extraktion zugänglichen gemachten AtCCD1-Menge ein wesentlicher Teil des überexprimierten Proteins als inaktive Einschlusskörper (*inclusion bodies*) vorliegt. Prinzipiell sind diese Proteine durch *refolding* wieder reaktivierbar (Burgess 2009). Es wurde getestet, ob und unter welchen Umständen eine Reaktivierung der AtCCD1 *inclusion bodies* möglich ist.

Die native AtCCD1 ohne löslichkeitsvermittelnde Tags wurde in *E. coli* BL21 überexprimiert. Die entstehenden *inclusion bodies* wurden isoliert, aufgereinigt und schließlich solubilisiert und denaturiert. Die Rückfaltung (*refolding*) wurde mit der *flash dilution* Methode durchgeführt. Um möglichst viele unterschiedliche Bedingungen des Rückfaltungspuffers effizient zu testen, wurde zunächst ein mikrotiterplattenbasiertes Kit verwendet (iFOLD[®] Protein Refolding System1, Novagen), welches das parallele *screening* von 92 unterschiedlichen Pufferzusammensetzungen erlaubt.

Allerdings sind Carotinoide empfindlich gegenüber unspezifischer Spaltung. Da Eisen als Cofaktor der AtCCD1 dem *refolding* zugesetzt werden musste, kam es bei einigen der 92 Pufferkombinationen zu unerwünschten unspezifischen Spaltungsreaktionen bei der anschließenden Überprüfung der Enzymaktivität. Insbesondere die

Kombination aus Eisenionen und chelatisierenden Pufferzusätzen wie EDTA oder TCEP zeigte diese Wirkung. Die Eisen(II)- und Eisen(III)-Ionen fungieren hier in einer zyklischen Reaktion als Katalysator für die Bildung von Sauerstoffradikalen aus reaktiven Sauerstoffspezies (Suthersan 2001; Mayer et al. 2008). Diese Radikale sind wiederum in der Lage, das konjugierte Doppelbindungssystem von Carotinoiden unspezifisch zu oxidieren (Winterhalter et al. 2001).

Da weiterhin für diese komplexe Anwendung die Zahl der Negativkontrollen im Kit nicht ausreichend war, wurde auf das Kit verzichtet und im Folgenden die Zahl der Pufferzusammensetzungen reduziert und vereinfacht sowie durch mehr Negativkontrollen sichergestellt, dass Carotinoidspaltung nach dem *refolding* einzig durch enzymatische Spaltung auftreten konnte.

Tab. 5-1 Übersicht der unterschiedlichen Refoldingstrategien mit ihren einzelnen Ansätzen

3 prinzipiell unterschiedliche Vorgehensweisen für das Refolding mit Cofaktor wurden verglichen (A-C); Als Cofaktoren wurden Fe(II)Cl₂ oder Fe(III)Cl₃ zugegeben; Für jede der 3 Methoden wurden 2 unterschiedliche AtCCD1-Konzentrationen eingesetzt, um sicherzustellen, dass keine Reaggregation des Enzyms stattfindet; Die beiden fett umrahmten Proben nach Methode C zeigten enzymespezifische β -Iononbildung; NK = Negativkontrolle

A Refolding mit Eisenionen im Refolding-Puffer	Fe(II)Cl ₂	AtCCD1 (370 μ g/mL)
		AtCCD1 (100 μ g/mL)
		Dialysepuffer (NK)
	Fe(III)Cl ₃	AtCCD1 (370 μ g/mL)
		AtCCD1 (100 μ g/mL)
		Dialysepuffer (NK)
	H ₂ O (NK)	AtCCD1 (370 μ g/mL)
		AtCCD1 (100 μ g/mL)
		Dialysepuffer (NK)
B Zugabe von Eisenionen zur denaturierten AtCCD1, Inkubation, anschließendes Refolding ohne Eisenionen im Refoldingpuffer	AtCCD1 (1,4 mg/mL)	Fe(II)Cl ₂
		Fe(III)Cl ₃
		H ₂ O (NK)
	AtCCD1 (0,7 mg/mL)	Fe(II)Cl ₂
		Fe(III)Cl ₃
		H ₂ O (NK)
	Dialysepuffer (NK)	Fe(II)Cl ₂
		Fe(III)Cl ₃
		H ₂ O (NK)
C Refolding ohne Eisenionen im Refoldingpuffer, anschließende Zugabe von Eisenionen	AtCCD1 (370 μ g/mL)	Fe(II)Cl₂
		Fe(III)Cl ₃
		H ₂ O (NK)
	AtCCD1 (100 μ g/mL)	Fe(II)Cl₂
		Fe(III)Cl ₃
		H ₂ O (NK)
	Dialysepuffer (NK)	Fe(II)Cl ₂
		Fe(III)Cl ₃
		H ₂ O (NK)

Der Cofaktor Eisen nimmt in diesem Fall eine kritische Stellung ein, da er für eine funktionale AtCCD1 essentiell ist (Guo et al. 2008), gleichzeitig aber die genannte unspezifische Carotinoidspaltung katalysieren kann. Um sicherzustellen, dass die AtCCD1 während der Rückfaltung den Cofaktor richtig einbindet, wurden drei unterschiedliche Methoden der Cofaktor-Darreichung beim *refolding* verwendet (Tab. 5-1). Dies ist nötig, da es keine generell gültigen Regeln bezüglich des Rückfaltens von Proteinen gibt. Die Bedingungen und die Reihenfolge der Zugabe der Komponenten wie auch Cofaktoren müssen für jeden Fall empirisch untersucht werden (Dashivets et al. 2009).

In Methode A waren die Eisenionen im *refolding*-Puffer gelöst, zwei unterschiedlich konzentrierte AtCCD1-Lösungen wurden zugegeben. In Methode B wurden Eisenionen direkt zu zwei konzentrierten AtCCD1-Lösungen zugegeben und diese anschließend im *refolding*-Puffer ohne Eisenionen verdünnt. In der Methode C wurden zwei unterschiedlich konzentrierte AtCCD1-Lösungen zunächst ohne Eisenionen rückgefaltet und anschließend der Cofaktor zugegeben. Die Enzymaktivität wurde in geschlossenen Gefäßen mit dem Modellsubstrat β -Apo-8'-carotenal überprüft. Entstehendes β -Ionon wurde mittels SPME-Extraktion aufkonzentriert und per GC/MS identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass das gesuchte Produkt beim *refolding* nach Methode C enzymatisch produziert wird (Abb. 5-6, Tab. 5-1).

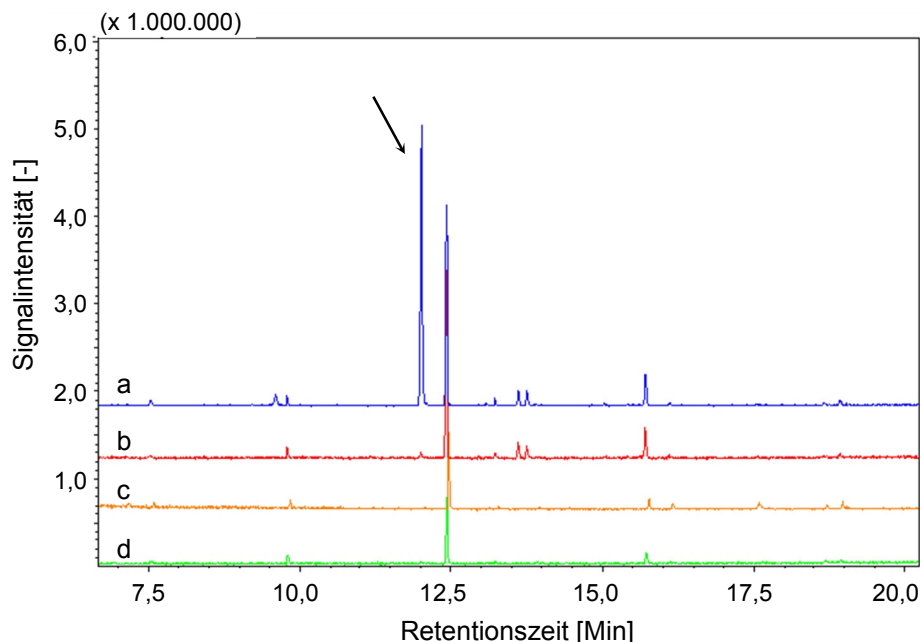


Abb. 5-6 Nachweis der β -Ionon Entstehung durch rückgefaltete AtCCD1 *inclusion bodies*

Totalionenchromatogramme der wesentlichen Proben des *refolding* nach Methode C:

- a - AtCCD1 (370 $\mu\text{g}/\text{mL}$) / mit $\text{Fe}(\text{II})\text{Cl}_2$
- b - AtCCD1 (370 $\mu\text{g}/\text{mL}$) / ohne $\text{Fe}(\text{II})\text{Cl}_2$
- c - Dialysepuffer als Negativkontrolle / mit $\text{Fe}(\text{II})\text{Cl}_2$
- d - Dialysepuffer als Negativkontrolle / ohne $\text{Fe}(\text{II})\text{Cl}_2$

Der mit einem Pfeil markierte Peak wurde massenspektrometrisch eindeutig als β -Ionon identifiziert.

Mit Methode C wurde AtCCD1 erfolgreich aus *inclusion bodies* rückgefaltet und so katalytisch reaktiviert. Es konnte ein eindeutiger β -Ionon Peak identifiziert werden, welcher in allen relevanten Negativkontrollen fehlt (Pfeil in Abb. 5-6). Alle anderen kleineren Nebenpeaks existieren auch in den Kontrollansätzen, so dass es sich hierbei um unspezifische Produkte handelt, die zumeist durch die Substratqualität und -präparation erklärbar sind. Erstaunlicherweise braucht AtCCD1 den Cofaktor nicht für den eigentlichen *refolding* Prozess sondern lediglich zur anschließenden Aktivierung des Enzyms. Es faltet sich ohne den Cofaktor in die richtige Konformation. Dies ist durchaus erstaunlich, da Cofaktoren in vielen Fällen spezifisch mit dem entfalteten Protein interagieren, für die korrekte Rückfaltung essentiell sind und es letztendlich in seiner nativen Konformation stabilisieren (Wittung-Stafshede 2002).

In einem zweiten Ansatz nach Methode C, in dem weniger AtCCD1 zur Rückfaltung eingesetzt wurde, um das Risiko einer Reaggregation der denaturierten Proteinstränge zu minimieren, wurde das gleiche Ergebnis, allerdings wie erwartet mit geringerer finaler Produktmenge, erzielt. Auch dies weist auf eine enzymespezifische Produktbildung hin.

Wie bereits beschrieben wurde aufgrund der Gefahr der unspezifischen Spaltung auf den Einsatz jeglicher chelatisierender oder den Redoxzustand des Eisens beeinflussender Zusätze wie z.B. auch Natriumascorbat verzichtet. Dies birgt die Gefahr, dass der gewünschte Redoxzustand nur temporär aufrecht erhalten werden kann. Allerdings wurde ein eindeutiger Unterschied in den erzielten Ergebnissen zwischen Fe(II)Cl_2 und Fe(III)Cl_3 beobachtet. β -Ionon entsteht spezifisch nur bei Einsatz von Fe(II)Cl_2 .

Diese Beobachtung steht im Einklang mit Strukturanalysen des AtCCD1-verwandten Enzyms ACO aus *Synechocystis* (Kloer et al. 2005). Hier wird das Eisen(II) von vier Histidin-Resten im aktiven Zentrum gebunden. Allerdings variiert das Bindungsverhalten von Eisenionen an bestimmte Aminosäuren mit seinem Redoxzustand. Eisen(II) bindet bevorzugt an schwefel- und stickstoffhaltige Aminosäuren wie Histidin, Cystein und Methionin. Eisen(III) hingegen interagiert tendenziell mit sauerstoffhaltigen Aminosäuren wie Glutamin und Asparagin (Outten et al. 2009). Aufgrund der Verwandtschaft von AtCCD1 und ACO macht es folglich durchaus Sinn, dass Eisen(II) im aktiven Zentrum der AtCCD1 ebenfalls von Histidin gebunden wird und somit die Reaktivierung der enzymatischen Aktivität durch *refolding* nur mit Eisen(II) als Cofaktor funktioniert.

Bei den Methoden A und B interagieren die Proteinstränge vermutlich sofort mit den beiden Arten der Eisenionen, was allerdings zumeist in der Fällung der Proteine resultiert. Je höher hier die eingesetzte Proteinkonzentration ist, desto stärker ist der Effekt. Auch ist die Gefahr der Fällung bei Verwendung von Fe(III)Cl_3 höher, was

möglicherweise darauf hindeutet, dass mehrere Proteinstränge über ein Eisenion über Komplexierung agglomerieren. Der Proteinstrang hat bei diesem Vorgehen nicht die nötige Zeit und räumliche Freiheit, um die korrekte Tertiärstruktur auszubilden. Weiterhin bestätigt diese Beobachtung die unterschiedliche Interaktionspräferenz von Eisen mit unterschiedlichen Aminosäuren in Abhängigkeit von seinem Redoxzustand. Im Fall der Methoden A und B hat das Eisen(III) die Möglichkeit, mit vielen verschiedenen Aminosäuren zu interagieren, da sich das Enzym im entfalteten Zustand befindet. Dies führt zur unspezifischen Aggregation, da das Eisen nicht nur im aktiven Zentrum gebunden wird. Lediglich bei der Methode C, bei der das Eisen erst nach dem eigentlichen *refolding* zugegeben wird, ist die Zahl der interaktionsfähigen Aminosäuren reduziert und es wird kein Protein ausgefällt.

Obwohl die Proteinrückfaltung nach Methode C zu aktiver AtCCD1 geführt hat, sind die Produktausbeuten im Vergleich zum löslich exprimierten Protein gering. Während die Aktivität der löslichen Proteinfraction gut mit photometrischen Methoden messbar ist, war dies für das rückgefaltete Protein schwieriger und musste durch die Chromatographie bestätigt werden. Dies zeigt, dass bei der eingesetzten Proteinmenge das gewünschte Ergebnis erreicht wurde, allerdings eine weitere Optimierung des Rückfaltungspuffers nötig ist, solange der Cofaktor Eisen(II) erst zur Proteinaktivierung am Ende zugegeben wird. Erst nach einer solchen Optimierung ist damit zu rechnen, dass das exprimierte, aber inaktive Protein, effizient regeneriert werden kann. Denkbar wäre hierfür neben der simplen Variation von pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur insbesondere der Einsatz unterschiedlicher Tenside in mizellarer Form oder von Phospholipiden in Liposomen. Auf diese Weise ist es möglich, eine naturähnliche Faltungsumgebung für die membranassoziierte AtCCD1 bereitzustellen. Dies ist sinnvoll, da bereits gezeigt werden konnte, dass membranähnliche Strukturen wie Mizellen oder Liposomen das Rückfalten von Membranproteinen (beispielsweise Bacteriorhodopsin) erleichtern (Booth et al. 1999; Stanley et al. 2008).

5.1.4 Zusammenfassung

Absatz 5.1 beschreibt die Bereitstellung der AtCCD1 für einen in *vitro* Einsatz. Erstmals konnte AtCCD1 in einem *E. coli* Fed-Batch Hochzelldichteverfahren in aktiver Form exprimiert werden. In vier Parallelreaktoren und einem Kontrollansatz im Schüttelkolben konnte gezeigt werden, dass ein Vollmedium und ein Batchverfahren für die spezifische Enzymaktivität gegenüber dem Minimalmedium überlegen ist. Allerdings überkompensiert die weitaus höhere Biomasseproduktion beim Fed-Batch Verfahren mit Minimalmedium und IPTG-Induktion in der frühen exponentiellen Phase diesen Effekt, so dass volumetrisch betrachtet eine Aktivitätssteigerung um den Fak-

tor 4 gegenüber der Schüttelkolbenkultivierung erreicht wurde. Eine frühere oder spätere Induktion führte zu schwächeren spezifischen und volumetrischen Aktivitäten. Für den flexiblen Einsatz der produzierten AtCCD1 wurden unterschiedliche Aufarbeitungsschritte untersucht und bewertet. Es zeigte sich, dass im Rohextrakt wegen des hohen Anteils an *E. coli* eigenem Protein die spezifische Aktivität relativ niedrig ist. Werden die verbleibenden unlöslichen Bestandteile dieser Fraktion mit dem gleichen Volumen Aufschlusspuffer und 1% (w/v) Triton X-100 extrahiert, so ist eine Steigerung um den Faktor 3 bei gleichzeitiger partieller Aufreinigung des Zielproteins möglich. Hierbei handelt es sich um korrekt gefaltete und an Membranfragmente assoziierte AtCCD1.

Mit diesen beiden Enzympräparaten wurde die Lagerfähigkeit bei -80°C und als Lyophilisat mit und ohne den Lyoprotektoren Sucrose, PEG und Mannitol untersucht. Während bei -80°C beide Präparate für mindestens 2 Wochen lagerbar waren, führte die Lyophilisierung im Fall des Triton-Extraktes zur sofortigen Inaktivierung. Die Lyoprotektoren zeigten für beide Präparate keine verbessernde Wirkung. Im Falle des Rohextraktes wirkt sehr wahrscheinlich das *E. coli* eigene Protein als Lyoprotektor für die AtCCD1. Für die Lagerung des Triton-Extraktes bei -80°C zeigten alle Lyoprotektoren eine vergleichbar schützende Wirkung. Während die unbehandelte Kontrolle nach zwei Wochen etwa 27% an Aktivität verloren hatte, behielten die vorbehandelten Proben ihre Aktivität zu 100%.

Der größte Teil des exprimierten Enzyms liegt allerdings unlöslich als *inclusion bodies* in der Zelle vor. Diese konnten erfolgreich isoliert, aufgereinigt, denaturiert, solubilisiert und schließlich in ihre native Konformation nach der *flash dilution* Methode rückgefaltet werden. Nachdem ein *high throughput screening* mithilfe eines kommerziellen Kits im Mikrotiterplattenformat wegen zu vieler unspezifischer eisenkatalysierter Carotinoid-Spaltungsreaktionen nicht eingesetzt werden konnte, wurden drei unterschiedliche Methoden der Cofaktor-Zugabe ohne weitere Zusätze getestet. Es konnte gezeigt werden, dass AtCCD1 sich ohne den Cofaktor Eisen(II) in die native Konformation rückfaltet und durch Zugabe von Fe(II)Cl_2 nach diesem Schritt aktiviert werden kann. Fe(III)Cl_3 zeigt diese Wirkung nicht. Auch eine vorangestellte Cofaktorzugabe zum Rückfaltungspuffer oder zu den denaturierten Proteinsträngen führt entweder zur Reagglomeration der Proteinstränge oder zu inaktiver löslicher AtCCD1. Die spezifische enzymatische Carotinoidspaltung wurde durch eindeutige Identifikation des Zielproduktes β -Ionon mithilfe von Gaschromatographie und Massenspektrometrie nachgewiesen. Die detektierte Produktmenge korrelierte positiv mit der Menge der rückgefalteten Proteinmenge. Allerdings ist der Anteil an korrekt zurückgefaltetem Protein im Vergleich zu den anderen beschriebenen Aufarbeitungsmöglichkeiten noch zu niedrig. Dies liegt daran, dass für einen ersten empirischen Nachweis der generellen Reaktivierbarkeit der AtCCD1 *inclusion bodies* das Rückfaltungsmilieu wegen der Gefahr unspezifischer Reaktionen zunächst sehr einfach ge-

staltet werden musste. Es macht Sinn, in Zukunft schrittweise einzelne weitere Zusätze wie Tenside, Phospholipide, redoxaktive Agenzien, L-Arginin, Glycerol und einige Salze zum Ansatz zuzugeben und weitere Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke zu variieren, um die Effizienz der Rückfaltung zu steigern.

5.2 Produkt Detektion mittels Fluoreszenzmessung

Bei der Spaltung von einem Mol β -Apo-8'-carotenal mit AtCCD1 entsteht ein Mol β -Ionon und ein Mol eines C17-Dialdehyden. Bei Fluoreszenzmessungen zum Sauerstoffverbrauch dieser Reaktion wurden Störungen gemessen, die auf die Entstehung eines fluoreszierenden Produktes schließen ließen. In vielen Gebieten der naturwissenschaftlichen Forschung wird Fluoreszenz als sehr sensitives Instrument zur Erfassung unterschiedlichster Phänomene eingesetzt (Hof et al. 2005). Da es sich bei der entdeckten Störung um ein potentielles Messsignal der Carotinoidspaltung handeln kann, wurde dieses Phänomen näher untersucht.

Emissionsspektren der umgesetzten Reaktionslösung wurden bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen aufgezeichnet, um eine Wellenlängenkombination zu ermitteln, welche die größte Sensitivität für Aktivitätsmessungen gewährleistet (Abb. 5-7 A). Die ermittelten Werte lagen bei 425 nm für die Anregung und bei 610 nm für die Emission. Mit diesen Werten wurde ein enzymatischer Umsatz von β -Apo-8'-carotenal mit der GST-AtCCD1 und einem Kontrollansatz mit Leervektorextrakt vermessen. Erwartungsgemäß wurde eine Produktbildungskinetik für die Positivkontrolle und keine Veränderung in der Fluoreszenz für die Negativkontrolle aufgezeichnet (Abb. 5-7 B).

Aufgrund der Ergebnisse in Abb. 5-7 B muss die fluoreszierende Substanz auf die AtCCD1-Aktivität zurückzuführen sein. Da es sich bei der Reaktionslösung allerdings um ein komplexes Gemisch aus dem Carotinoidsubstrat, dem Tensid Triton X-100, Ethanol als Cosolvens sowie dem Proteinextrakt aus *E. coli* handelt, war zunächst unklar, ob es sich um ein direktes Produkt der enzymatischen Spaltungsreaktion oder um ein eventuelles Folgeprodukt handelt. Während β -Ionon als Fluoreszenzquelle aufgrund des Vorhandenseins eines Standards ausgeschlossen werden konnte, ist der kommerzielle Erwerb des C17-Dialdehyden nicht möglich. Chemische Synthesen erwiesen sich auch durch spezialisierte Firmen als nicht durchführbar. Da der Dialdehyd aufgrund seines ausgeprägten konjugierten π -Elektronensystems als die wahrscheinlichste Fluoreszenzquelle anzusehen war (Märki-Fischer et al. 1988; Bettermann et al. 1993), wurden HPLC-Messungen mit den photometrischen Messungen kombiniert und so Korrelationen aufgestellt, um auf indirektem Wege die Fluoreszenzquelle zu identifizieren.

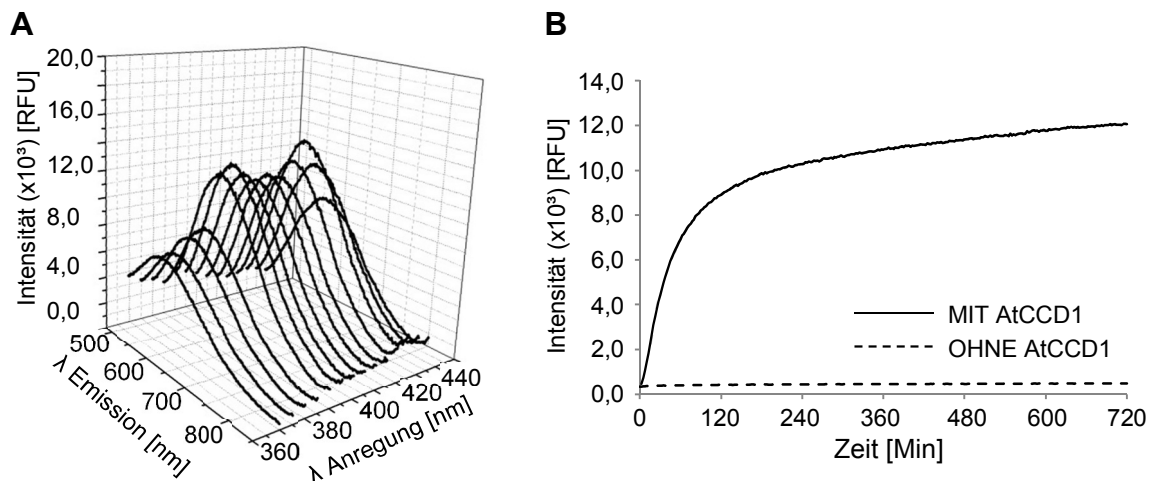


Abb. 5-7 Fluoreszenzmessungen des Umsatzes von β -Apo-8'-carotenal mit GST-AtCCD1

- (A) Aufzeichnung von Emissionsspektren bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen zur Ermittlung der sensitivsten Wellenlängenkombination; Messung wurde nach vollständigem Umsatz von 100 μ L eines Standardassays im Mikrotiterplattenformat durchgeführt; Ermittelte Wellenlängen: Anregung 425 nm, Emission 610 nm.
- (B) Produktbildungskinetik während des Umsatzes; Aufzeichnung erfolgte mit den in (A) ermittelten optimalen Wellenlängen unter sonst gleichen Bedingungen

Um durch Korrelationen auf den Ursprung des Fluoreszenzsignals schließen zu können, muss gewährleistet werden, dass die Spaltungsreaktion quantitativ abläuft und aus einem Molekül β -Apo-8'-carotenal je ein Molekül der beiden Spaltprodukte entsteht. Bei Untersuchungen hierzu wurde festgestellt, dass bei Verwendung von Rohextrakt im Sinne von Abs. 5.1.2 vermutlich eine Metabolisierung des entstehenden Dialdehyden stattfindet, während dies im Fall des Triton-Extraktes im Sinne von Abs. 5.1.2 nicht passiert und der Dialdehyd stabil erhalten bleibt. Dies zeigt sich beim Vergleich der beiden HPLC-Chromatogramme in Abb. 5-8. Während im Fall des Rohextraktes (A) die mit Pfeilen markierten früher eluierenden Komponenten am Ende der Inkubationsdauer auftauchen und gleichzeitig die Peakintensität des Dialdehyden reduziert wird, fehlen diese Produkte im Fall des Triton-Extraktes (B) und die Peakintensität des Dialdehyden verbleibt auf maximalem Niveau.

Da es sich bei Aldehydgruppen allgemein um reaktive Verbindungen handelt und im speziellen ein acides Wasserstoffatom vorliegt (Hart et al. 2007), kann der C17-Dialdehyd in einer komplexen Reaktionsmischung weiterreagieren. Ebenso können *E. coli* eigene Enzyme wie z.B. Alkoholdehydrogenasen das Spaltungsprodukt beispielsweise zu Alkoholen weitermetabolisieren (Holland-Staley et al. 2000; Schwartz et al. 2004). Da bei aerob wachsenden Mikroorganismen reaktive Sauerstoffspezies in Form von Wasserstoffperoxid, Dioxid-Anionen und Hydroxyl-Radikalen entstehen (Cabiscol et al. 2000) und bei Verwendung von Rohextrakt dem Reaktionsgemisch zugeführt werden, können diese Moleküle auch den entstehenden Dialdehyden angreifen und ihn oxidativ und unspezifisch spalten. Im Fall des eingesetzten Triton-Extraktes werden die *E. coli* eigenen Proteine sowie schädliche Sauerstoffverbindun-

gen vorher entfernt und eine reinere Enzympräparation liegt vor. Dadurch finden die beschriebenen unerwünschten Reaktionen nicht statt.

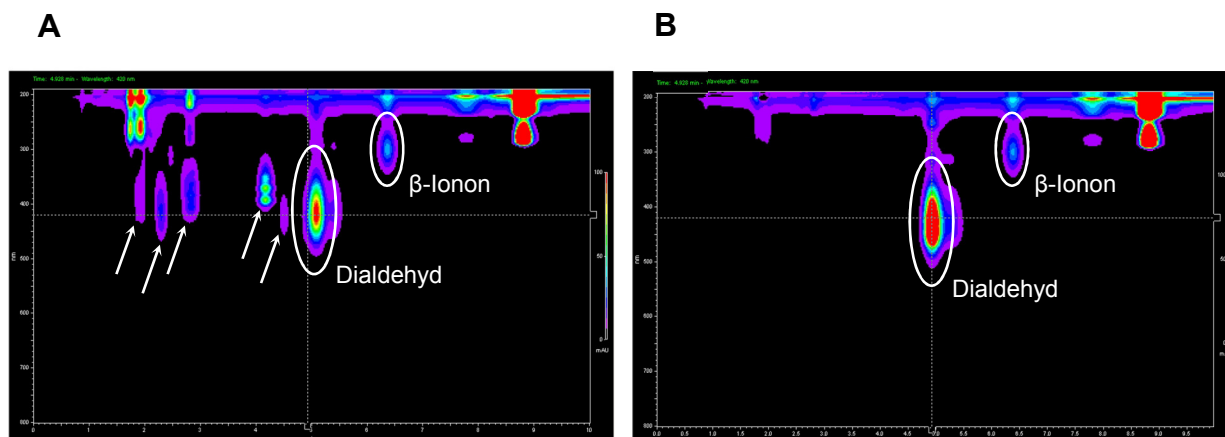


Abb. 5-8 2D-HPLC-Chromatogramme des Umsatzes von β -Apo-8'-carotenal zu β -Ionon und einem C17-Dialdehyden mittels AtCCD1-Rohextrakt (A) und AtCCD1-Triton-Extrakt (B)

Horizontal ist der Elutionszeitpunkt und vertikal das Absorptionsspektrum der Komponenten dargestellt. Die Peakintensität ist durch die Farbe repräsentiert (Skala jeweils rechts im Bild). Neben den eingekreisten erwarteten Hauptprodukten sind mit Pfeilen in Abb. (A) vermutete Dialdehyd-Abbauprodukte markiert, welche im Fall des Triton-Extraktes der AtCCD1 (Abb. (B)) fehlen.

Nachdem die quantitative Dialdehydentstehung durch Verwendung des Triton-Extraktes sichergestellt war, konnte der Dialdehyd anhand der Integration der mit Reaktionsfortschritt zunehmenden Peakflächen im HPLC-Chromatogramm quantifiziert werden. Die Absolutmenge war wegen des nicht existierenden Standards allerdings nicht zugänglich. Nichtsdestotrotz gibt der relative Kurvenverlauf der Fluoreszenzzunahme und der Peakflächenzunahme einen eindeutigen Hinweis, dass es sich bei dem Dialdehyden um die Fluoreszenzquelle handeln muss. Der relative Verlauf der beiden voneinander unabhängigen Messungen ist in Abb. 5-9 dargestellt.

Weiterhin bestätigt die exakte Übereinstimmung des Absorptionsmaximums des Dialdehyden mit der zuvor ermittelten optimalen Anregungswellenlänge von 425 nm die Fluoreszenzquelle. Das ermittelte Absorptionsspektrum entspricht hierbei der Erwartung (Ilg et al. 2009). Zur weiteren Stützung des Ergebnisses wurden Korrelationskoeffizienten nach Spearman und nach Pearson zwischen der Absorptionsmessung der Substratabnahme und der Fluoreszenzmessung der Dialdehydzunahme berechnet (Fahrmeir et al. 2009). Da ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Messsignalen bestehen sollte, wenn ein Mol Substrat zu je einem Mol der beiden Produkte gespalten wird und eines von ihnen für die Fluoreszenz verantwortlich ist, müssten beide Koeffizienten bei annähernd 1 liegen und so eine Korrelation beider Messsignale aufzeigen. Diese Annahme konnte durch Analyse von 198 Wertepaaren bestätigt werden. Diese resultieren zu $K_{\text{Spearman}} = 0,9992$ und $K_{\text{Pearson}} = 0,9932$ und zeigen damit ein Höchstmaß an Korrelation für die beiden Messmethoden (Konfidenzinter-

vall = 99%). Eine hohe Korrelation zweier Signale lässt im Allgemeinen nicht uneingeschränkt auf einen Kausalzusammenhang der beiden Messgrößen schließen. Allerdings ist die Kausalität unter Berücksichtigung der weiteren durchgeführten Messungen sowie der theoretischen Grundlagen der betrachteten enzymatischen Reaktion gewährleistet.

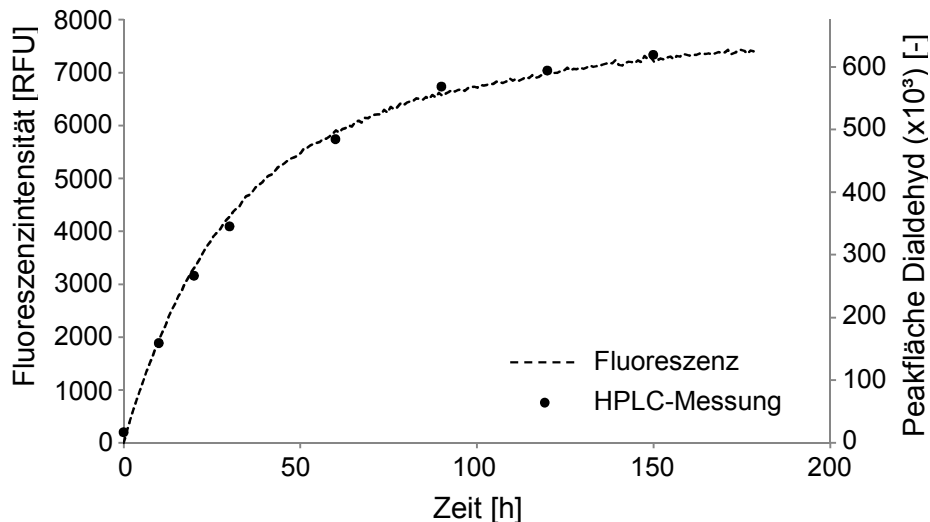


Abb. 5-9 Korrelation des relativen Verlaufs zweier Messsignale zur C17-Dialdehyd-Messung

Die Fluoreszenzmessung wurde im Mikrotiterplattenformat durchgeführt (100 μ L Reaktionsvolumen). Die Quantifizierung des Dialdehyden per HPLC erfolgte durch Integration der Peakflächen nach *reversed phase* Separation des Dialdehyden vom Rest des Reaktionsgemisches. Die Korrelation beider relativen Kurvenverläufe weist auf den Dialdehyden als Fluoreszenzquelle hin.

Obwohl die Ergebnisse mehrerer unabhängiger Messmethoden auf den Dialdehyden als Fluoreszenzquelle hinweisen, besteht die Möglichkeit, dass der entstehende Dialdehyd nicht fluoresziert, aber in einer nicht geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion modifiziert wird und danach erst fluoresziert.

Aus diesem Grund wurde eine vollständig umgesetzte Probe mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin derivatisiert, welches spezifisch nur mit Aldehyd- und den hier nicht relevanten Ketogruppen aber nicht mit beispielsweise Alkoholen reagiert. In HPLC-Messungen zeigte sich daraufhin eine deutliche Verzögerung des ursprünglichen Dialdehyden in der Retentionszeit. Dies deutet auf eine Erhöhung der Hydrophobizität der entstehenden Moleküle durch die Derivatisierungsreaktion hin, was aufgrund der angefügten Phenylreste erklärbar ist. Weiterhin entstanden aus einem Dialdehyd Peak drei eng nacheinander eluierende Derivate mit dem erwarteten Absorptionsmaximum von 370 nm (Kieber et al. 1990). Die drei entstehenden Derivate sind darauf zurückzuführen, dass ein Produktmolekül zwei unterschiedliche Aldehydgruppen aufweist. Bei den detektierten Molekülen handelt es sich wahrscheinlich um den beidseitig derivatisierten Aldehyden sowie zwei jeweils einseitig derivatisierte Moleküle, was der Erwartung entspricht.

Trotz fehlenden synthetischen Standards konnte durch Rekrutierung mehrerer Messmethoden, Korrelation von Fluoreszenz- und Absorptionsmessung und einer Derivatisierungsreaktion die Fluoreszenzquelle mit höchster Wahrscheinlichkeit auf den C17-Dialdehyden zurückgeführt werden.

5.3 Immobilisierung der AtCCD1 in Sol-Gelen

Für den technischen Einsatz von Enzymen ist es aus Kostengründen oft sinnvoll, diese zu immobilisieren und auf diese Weise vom Reaktionsgemisch abtrennbar und wiederverwendbar zu machen (Mateo et al. 2007; Sheldon 2007b). Da es sich bei AtCCD1 um ein relativ neues aber dennoch aufgrund einer hohen Regiospezifität und variablen Substratakzeptanz industriell interessantes Enzym handelt, jedoch bisher keine Immobilisierungen publiziert sind, wurden zwei vielseitige und vom Immobilisierungsprinzip unterschiedliche Strategien im Rahmen dieser Arbeit untersucht. AtCCD1 wurde in verschiedenen Sol-Gelen und auf zwei affinitätsbasierende Arten immobilisiert - mittels His₆-Tag und GST-Tag (Abs. 5.4). Die Methoden wurden ausgewählt, weil sie prinzipielle Eignung für den Einsatz in einer Laboranlage zur *in situ* Produktabtrennung mittels Pervaporation zeigen, worauf detailliert in Absatz 5.5 eingegangen wird.

5.3.1 Immobilisierung in unterschiedlichen hydrophobisierten Sol-Gelen

Bei der Enzymimmobilisierung mit Sol-Gelen handelt es sich um eine Einschlussmethode in glasartigen Siliziumoxid-Polymeren. Hierbei werden die für das Polymer eingesetzten Silan-Monomere unter sauren Bedingungen zu Silanolen hydrolysiert und anschließend mit einer gepufferten leicht alkalischen Lösung, die das Zielprotein enthält, gemischt. Dies führt zum Anstieg des zuvor sauren pH-Wertes und initiiert eine Kondensationsreaktion der Silanole. Da jedes Monomer über mehr als eine reaktive Bindung verfügt, resultiert dies in einer Polymerisation der Gesamtlösung und im Einschluss des eingesetzten Proteins. Nach dem ersten Reaktionsschritt, wird die Lösung „Sol“ genannt, nach der Polymerisation handelt es sich um ein „Gel“ (Schmidt 2001; Jin et al. 2002; Pierre 2004).

Ein Vorteil dieser Methode ist die sehr schonende Immobilisierung des Enzyms, weil es trotz Einschluss in einer wässrigen Umgebung verbleibt (Gill 2001). Neben dem an vier Bindungen hydrolysierbaren Standardmonomer Tetramethylorthosilikat (TMOS) können auch substituierte Monomere eingesetzt werden, welche eine nicht hydrolysierbare Bindung beinhalten. Da diese den ersten der beiden Reaktionsschritte nicht erlaubt, bleibt diese funktionelle Gruppe im finalen Gel erhalten und kann zum Feinjustieren der Mikroumgebung des Enzyms verwendet werden (Reetz et al.

1995). Diese Art der Gele wird Ambigel genannt (Pierre 2004). Die in dieser Arbeit eingesetzten Monomere sind in Abb. 5-10 dargestellt.

In einem ersten *screening* wurde ein Referenzgel aus 100 Mol-% TMOS-Monomeren hergestellt sowie in jeweils 20 Mol-% Schritten die hydrophobisierte Komponente Methyltrimethoxysilan (MTMS) zugegeben und die entsprechende Molmenge TMOS so substituiert. Auf diese Weise wurden 5 in der Hydrophobizität ansteigende Sol-Gele auf dem Boden von verschließbaren Glasgefäßen produziert:

1. 100% TMOS
2. 80% TMOS / 20% MTMS
3. 60% TMOS / 40% MTMS
4. 40% TMOS / 60% MTMS
5. 20% TMOS / 80% MTMS

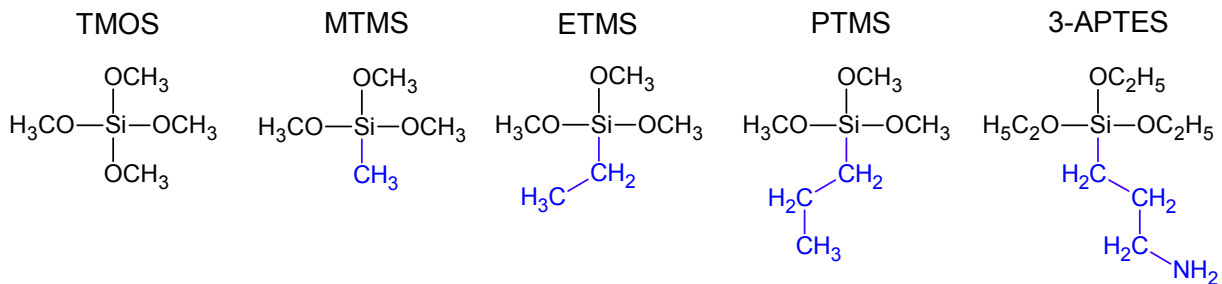


Abb. 5-10 Zur Sol-Gel Herstellung verwendete Monomere

TMOS = Tetramethylorthosilikat; MTMS = Methyltrimethoxysilan, ETMS = Ethyltrimethoxysilan, PTMS = Propyltrimethoxysilan, 3-APTES = 3-Aminopropyltrimethoxysilan; TMOS wurde in unterschiedlichen molaren Verhältnissen mit je einem der anderen Monomere gemischt; Alle Si-O Bindungen sind hydrolysierbar, die blau dargestellten Gruppen können nicht abgespalten werden und bleiben im Sol-Gel erhalten.

Ein Gel aus 100% MTMS polymerisiert unter den gegebenen Bedingungen nicht vollständig, was an der reduzierten Hydrolyserate der Silizium-Alkyl-Bindung liegt. Dieses Hindernis könnte durch Zugabe eines anorganischen Katalysators umgangen werden (Pierre 2004), allerdings wurde Wert auf gleiche Polymerisationsbedingungen in allen Ansätzen gelegt und die nicht polymerisierende Gelvariante aus der Betrachtung ausgeschlossen.

Für alle hergestellten Gele konnte das gewünschte Produkt β -Ionon mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie nachgewiesen werden, so dass in allen Fällen aktive AtCCD1 immobilisiert werden konnte. Optisch und bei der quantitativen Produktanalyse hob sich allerdings das am stärksten hydrophobisierte Gel deutlich hervor. Es zeigte den aus homogenen Ansätzen bekannten Farbumschlag vom roten Substrat β -Apo-8'-carotenal zur gelben Produktlösung. Auch das Gel selbst wurde deutlich erkennbar vom Substrat vollständig eingefärbt und anschließend das Substrat umgesetzt (Abb. 5-11 A).

Dies entspricht der Erwartung, da AtCCD1 hydrophobe Proteinoberflächen besitzt, mit welchen es in der Natur mit der äußeren Chloroplastenmembran assoziiert (Auldridge et al. 2006a). Entsprechend wurde die Hypothese aufgestellt, dass hydrophobisierte Gele eine für die AtCCD1 günstigere Mikroumgebung bereitstellen könnten. Diese Hypothese wird durch den erfolgreichen Nachweis des gewünschten Produktes β -Ionon mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie gestützt (Abb. 5-11 B). Offenbar lagert sich das Enzym über hydrophobe Wechselwirkungen an die Alkylreste der Geloberfläche an und befindet sich so in einem an seiner natürlichen Wirkumgebung angelehnten Milieu (Reetz et al. 1995; Gill et al. 2000).

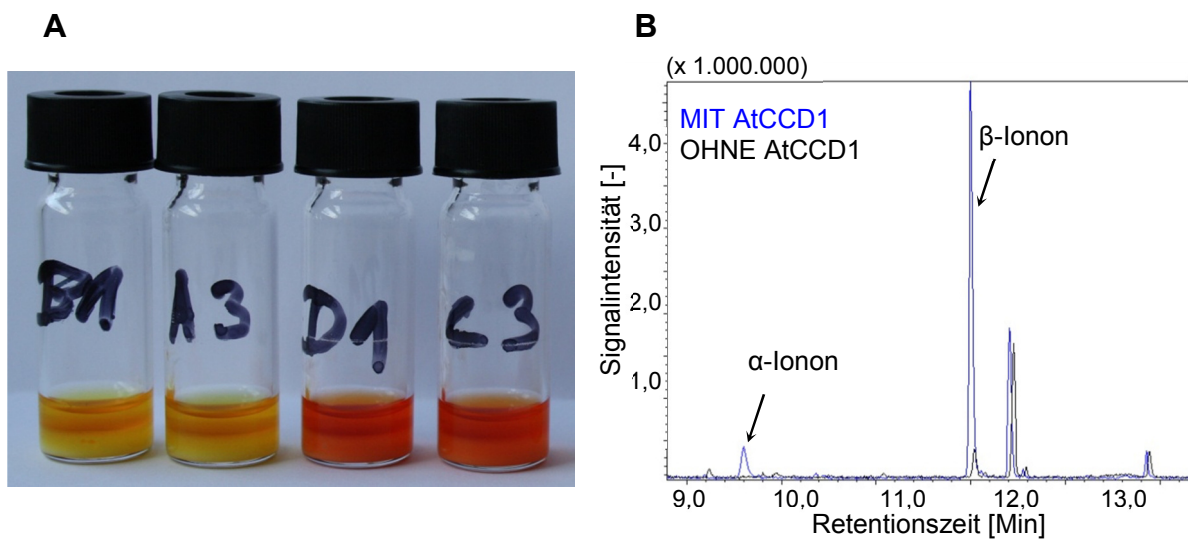


Abb. 5-11 Aktive Sol-Gele mit Kontrolle, 20% TMOS/80% MTMS (A), Totalionenchromatogramm (GC/MS) mit β -Ionon als Produkt (B)

- (A) Dargestellt ist eine Doppelbestimmung der AtCCD1-Immobilisierung im Sol-Gel mit 20% TMOS / 80% MTMS; Am Gefäßboden ist das Sol-Gel, darüber die Reaktionslösung; Die beiden gelben Proben (links) enthalten AtCCD1 im Sol-Gel, die beiden roten (rechts) sind die Kontrolle mit Rohextrakt der Leervektorexpression im Sol-Gel.
- (B) Totalionenchromatogramm der Gaschromatographie; β -Ionon wurde massenspektrometrisch als Produkt identifiziert.

Ein schwacher zusätzlicher α -Ionon Peak ist wahrscheinlich in kleinen Substratverunreinigungen durch Isomerisierung des Substrates begründet. Da die AtCCD1 ein breites Substratspektrum hat, akzeptiert sie wahrscheinlich auch ein Isomer des Modells substrates β -Apo-8'-carotenal, was bei der Regiospezifität des Enzyms zu α -Ionon führt. Diese Annahme ist berechtigt, da AtCCD1 beispielsweise aus Lutein α -Ionon produziert (Schwartz et al. 2001). Ein weiterer Peak nach dem β -Ionon ist sowohl in der Positiv- wie auch Negativkontrolle enthalten, ist also kein enzyspezifisches Produkt. Hierbei handelt es sich um einen Stabilisator von Tetrahydrofuran, welches für das Herstellen der Substratlösung verwendet wird. Diese Verunreinigung ist bei leicht abgewandelter Substratpräparation eliminierbar (Nacke 2011), womit β -Ionon als einziges signifikantes Produkt entsteht.

5.3.2 Protein-Auswaschverhalten unterschiedlicher Sol-Gele

Bevor weitere Sol-Gele hergestellt wurden, musste sichergestellt werden, dass es sich bei der enzymatischen Reaktion auch tatsächlich um immobilisierte AtCCD1 handelt und nicht etwa um aus dem Gel ausgewaschenes Enzym, welches lediglich in homogener Lösung das Substrat umsetzt. Hierfür wurden die Gele in gleicher Art hergestellt und mit zwei unterschiedlichen Lösungen für eine Stunde, drei Stunden und über Nacht inkubiert. Bei der ersten Lösung handelte es sich um Puffer und bei der zweiten um eine Referenzlösung, welche bis auf das Substrat selbst alle Bestandteile der eigentlichen Substratlösung, insbesondere das Tensid Triton X-100, enthielt. Dieses ist für das Auswaschverhalten besonders kritisch, da es die AtCCD1 bei der Enzymherstellung effizient aus Membranfragmenten herauslöst (vgl. Abs. 5.1.2). Eine entsprechende Wirkung im Fall der Sol-Gele wäre unerwünscht. Nach dem Waschen der Gele mit den beiden Lösungen wurde die eluierte Proteinmenge quantifiziert und mit der vorher immobilisierten Menge verglichen. Vor diesem Schritt wurden alle Gele kurz mit Puffer gewaschen, um nicht immobilisiertes Enzym zu entfernen und tatsächlich aus dem Gel reeluiertes Protein zu messen.

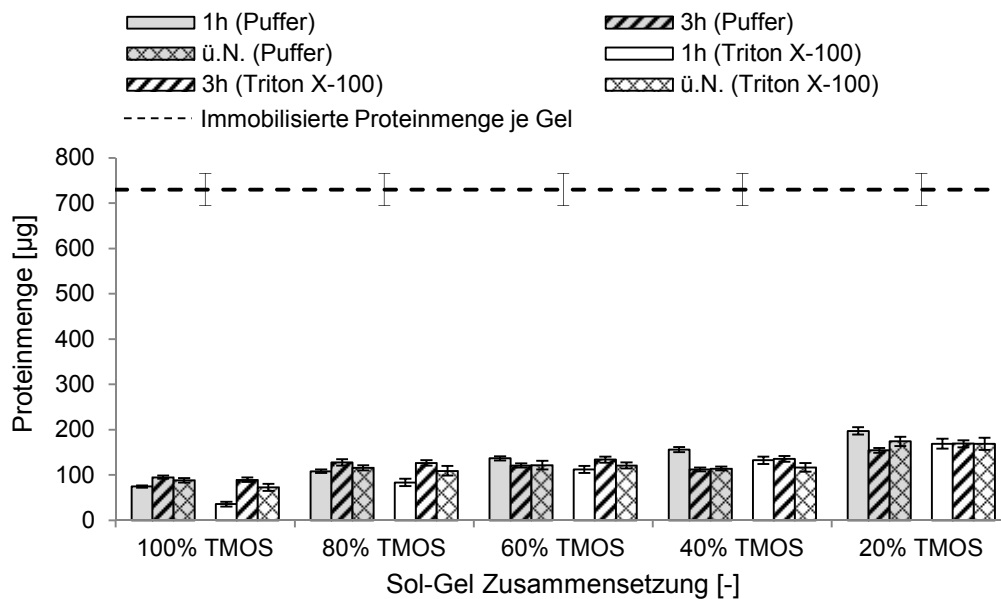


Abb. 5-12 Absolute initial immobilisierte und anschließend ausgewaschene Proteinmengen je Sol-Gel

Fünf von links nach rechts zunehmend hydrophobe Sol-Gele (100%-20% TMOS bzw. 0%-80% MTMS) wurden mit zwei Lösungen (Puffer, graue Balken und Triton X-100 haltige Referenzlösung, weiße Balken) über drei Zeiträume gewaschen und die eluierte Proteinmenge ermittelt (Balken); Die pro Gel zu Beginn immobilisierte Proteinmenge ist gestrichelt dargestellt ($730 \pm 35 \mu\text{g}$); ü.N. = über Nacht; Fehlerbalken repräsentieren 3 Replikate der verwendeten Gele.

Aus allen Gelen ist ein Teil des immobilisierten Proteins über die betrachteten Zeiträume eluiert worden (Abb. 5-12). Das hydrophilste aller Gele (100% TMOS) weist mit maximal $95 \mu\text{g}$ ausgewaschenem Protein das beste Immobilisierungsvermögen auf. Die eluierte Proteinmenge nimmt mit der Hydrophobizität der Gele kontinuierlich

zu und erreicht mit 197 μg bei der hydrophobsten Variante (20% TMOS / 80% MTMS) das Maximum. Dies entspricht im schlechtesten Fall einer Immobilisierungseffizienz von 73% und im besten Fall von 87%. Besonders deutlich wird die genannte Tendenz für die Proben mit 1h Inkubationszeit. Hier ist für beide Waschlösungen ein kontinuierlicher Anstieg über die Gelhydrophobizität erkennbar. Dies entspricht der Erwartung, da tendenziell hydrophile Sol-Gele eine fast quantitative Proteinimmobilisierung ermöglichen, während hydrophobisierte Gele teilweise über 50% des initial immobilisierten Proteins verlieren können (Gill 2001). Somit reflektieren 73% Restprotein als untere Grenze für die verwendete Methode eine gute Immobilisierungseffizienz.

In diesem Zusammenhang ist wichtig, dass die über Nacht eluierte Proteinmenge im Allgemeinen nicht höher ist als nach einer Stunde Inkubationszeit. Dies lässt darauf schließen, dass das ausgewaschene Protein aus der potentiell instabileren Oberflächenregion der Gele stammt und recht zügig ausgewaschen wird, während das in tieferen Gel-Regionen immobilisierte Enzym dort auch verbleibt. Die Instabilität der Oberflächenregion ist im Trocknungsverhalten der Gele nach der Polymerisierung begründet. Hier evaporiert ein Teil der Gel-Feuchtigkeit und lässt das Sol-Gel an dieser Stelle spröde werden (Gill et al. 2000; Gill 2001; Jin et al. 2002; Pierre 2004).

Weiterhin zeigt dieses Ergebnis, dass ein Waschschrift von etwa einer Stunde, wie er auch für das Ergebnis in Abb. 5-11 durchgeführt wurde, ausreichend ist, um eine homogene Reaktion durch herausgewaschenes, gelöstes und somit nicht mehr immobilisiertes Enzym auszuschließen. Dies wurde für alle weiteren Experimente berücksichtigt. Weiterhin ist ersichtlich, dass es keinen signifikanten Unterschied im Elutionsverhalten der beiden untersuchten Lösungen gibt. Der zunächst angenommene negative Effekt von Triton X-100 auf die Immobilisierungseffizienz ist nicht eingetreten. Der entscheidende Faktor auf die Immobilisierungseffizienz ist die Beschaffenheit des Sol-Gels und nicht die exakte Zusammensetzung der Wasch- und Substratlösung.

5.3.3 Optimierung der Sol-Gel Zusammensetzung

Nach dem Sicherstellen einer tatsächlich heterogen katalysierten Spaltungsreaktion des Carotinoids durch AtCCD1 wurden in analoger Weise weitere Sol-Gele mit den in Abb. 5-10 dargestellten Monomeren hergestellt und die jeweils generierte Produktmenge verglichen. Hierbei wurden geeignete Kandidaten in einem Einfachansatz durch Messung der erzielten β -Ionon Konzentration ermittelt (Abb. 5-13 A) und daraufhin die Analyse im Mehrfachansatz auf die vielversprechendsten Sol-Gele fokussiert (Abb. 5-13 B).

Die in Abs. 5.3.1 bereits gefundenen Erkenntnisse zum Einfluss der Hydrophobizität der Sol-Gele konnten auch für die anderen Silan-Monomere bestätigt werden. So

führten auch die mit 60% ETMS oder 60% PTMS modifizierten Sol-Gele zu deutlich höheren Produktkonzentrationen. Das Monomer 3-APTMS verhielt sich unter den eingesetzten Polymerisationsbedingungen völlig anders und führte nach schneller Polymerisation zu inaktiven Gelen. In dieser Konstellation lief die Polymerisierung extrem schnell und unter Wärmeentwicklung ab, was wahrscheinlich zur Hitzeinaktivierung des Enzyms führte. Eine weitere Möglichkeit stellt die Reaktionsfähigkeit der zahlreichen Aminogruppen mit den reaktiven Gruppen des Proteins dar, was auf diese Weise zur Schädigung des Enzyms führen kann. Während im Fall des MTMS ein Molanteil von 80% zur höchsten Produktkonzentration führte, waren diese Gele im Fall der Monomere ETMS und PTMS nicht mehr stabil oder polymerisierten erst gar nicht.

Nach dem zweiten Screeningschritt wird deutlich, dass die beste Enzymaktivität und die höchsten Produktkonzentrationen durch die Gele mit 80% MTMS bzw. 60% ETMS erzielbar sind. Zur Verifizierung wurden die Silan-Konzentrationen weiter um diese bisher erzielten Optima in feineren Schrittweiten optimiert (Abb. 5-13 B). Hier konnte gezeigt werden, dass weitere Verschiebungen der Silan-Verhältnisse hin zu leicht hydrophileren Gelen keine Verbesserung bringen. Im Fall des ETMS ist eine leichte Steigerung auf 65% ETMS förderlich für die Produktausbeute. Allerdings werden durch die optimalen Sol-Gel Zusammensetzungen auch Grenzbereiche erreicht, über die hinaus eine Polymerisierung nicht mehr stattfindet oder die Gele extrem fragil sind, so dass ihr Einsatz keinen Sinn macht. Diese Gele sind in Abb. 5-13 B durch schraffierte Balken markiert.

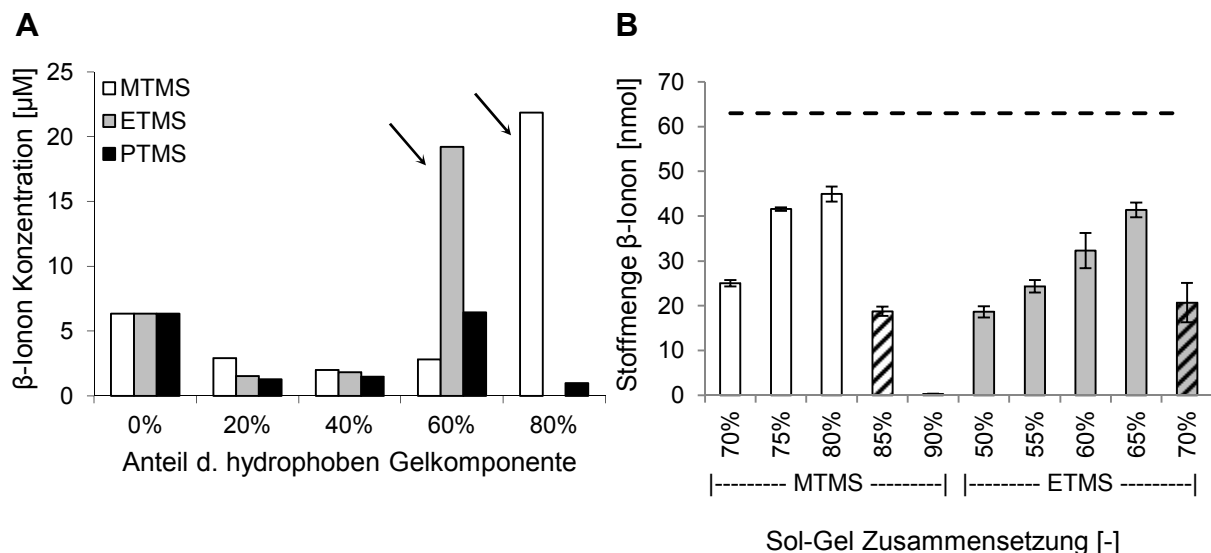


Abb. 5-13 Variation der Sol-Gel Zusammensetzung über unterschiedliche Komponenten und Molanteile (A), Einengung der besten Sol-Gel Zusammensetzung (B)

Die Sol-Gel Zusammensetzung wurde variiert und die höchsten Produktmengen gesucht; Hydrophobe Silankomponente ist jeweils angegeben, hydrophile Komponente ist TMOS; Die beiden besten Gele aus (A), s. Pfeile, wurden in (B) in verfeinerten Intervallen und mit 3 Replikaten näher untersucht; Gestrichelte Linie: maximal erzielbare β -Ionon Stoffmenge, weiße Balken: MTMS-haltige Gele, graue Balken: ETMS-haltige Gele, Schraffierte Balken: Instabile/unbrauchbare Gele.

Für das bessere Verständnis der unterschiedlichen Sol-Gele in Bezug auf die enzymatische Aktivität wurden zum einen Partitionskoeffizienten (Abb. 5-14) des Substrats zwischen dem Sol-Gel und der Substratlösung nach einer Inkubation mit Leervektor-Extrakt beinhaltenen Gelen experimentell ermittelt und zum anderen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht (Abb. 5-15).

Paradoxe Weise und im Gegensatz zu den Produktmengenmessungen deuten die hohen Partitionskoeffizienten im Fall der hydrophileren Sol-Gele zunächst darauf hin, dass das Substrat besser in die hydrophileren Gele diffundiert als in die hydrophoberen. Dies ist so aber nicht der Fall und in der Oberflächenbeschaffenheit der Sol-Gele in Kombination mit der Methode der Substratvermittlung begründet.

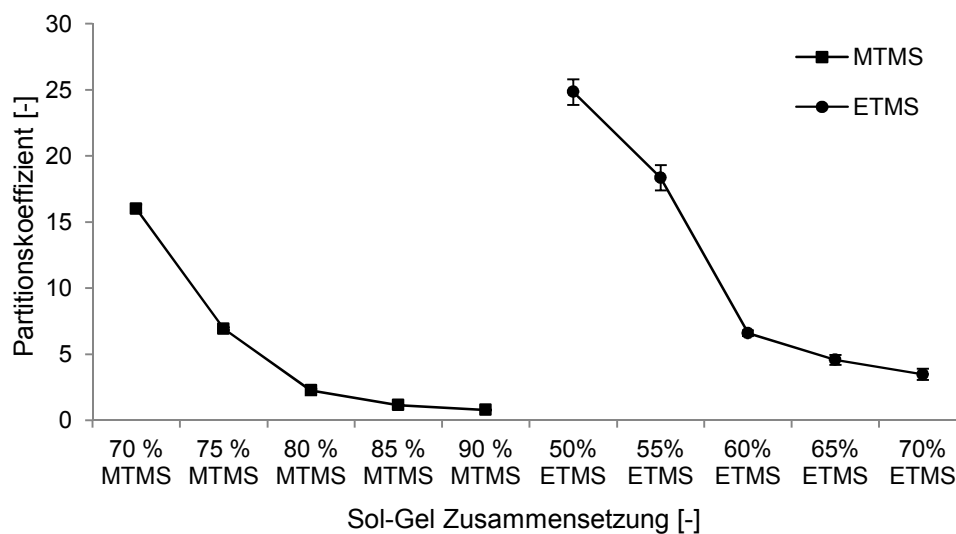


Abb. 5-14 Partitionskoeffizienten des Substrates β -Apo-8'-carotenal zwischen Sol-Gele und Überstand

Ein hoher Partitionskoeffizient (>1) beschreibt eine bevorzugte Substratlokalisierung im Gel oder an seiner Oberfläche als in Lösung; Die hydrophile Silan-Komponente aller Gele war TMOS. Fehlerbalken repräsentieren 3 Replikate der verwendeten Gele.

Wird ein Sol-Gel aus 100% TMOS hergestellt, existieren an seiner Oberfläche größtenteils hydrophile -OH Gruppen. Wird der Anteil der hydrophob modifizierten Monomere gesteigert, so nimmt der Anteil der nicht hydrolysierbaren hydrophoben Seitenkette an den Oberflächen zu (Hüsing et al. 1998; El Rassy et al. 2002; Pierre 2004). Dies führt zu einer höheren Porosität der hydrophoben Gele und im Extremfall dazu, dass aufgrund des hohen Anteils an hydrophober Silankomponente mikroskopisch kleine abgeschlossene Kugeln mit hydrophober Oberfläche entstehen, was eine vollständige Polymerisation unterbindet (s. Sol-Gel 2e in Abb. 5-15).

Gleichzeitig wird das Substrat in mizellarer Form mit Triton X-100 als nichtionischem Tensid dargereicht. Diese Mizellen können mit ihrer hydrophilen Oberfläche mit der hydrophilen Geloberfläche über Dipolmomente und Wasserstoffbrückenbindungen interagieren. Dies wurde in Experimenten mit Triton X-100 und anderen nichtionischen Tensiden und Silikatoberflächen mittels Rasterkraftmikroskopie, Ellipsometrie

und UV-Absorption gezeigt (Paria et al. 2004; Paruchuri 2008). Die Struktur der Mizellen und die Form der Interaktion mit der jeweiligen Oberfläche sind komplexe Funktionen der die Lösung charakterisierenden Parameter. Entscheidend hierbei ist, dass die mizellare Struktur durch die Interaktion mit einer Oberfläche nicht erhalten bleiben muss (Parfitt et al. 1983; Paria et al. 2004). Die einzelnen Tensid-Moleküle können sich umorientieren und beispielsweise eine Doppelschicht statt der Mizellenstruktur ausbilden. Diese Umorientierung führt möglicherweise auch zur Agglomeration des Carotinoide substrats, da dieses nun über hydrophobe Wechselwirkungen interagieren kann. Auch wenn diese Agglomeration nicht passiert, so können die Mizellen recht stabil an einer Oberfläche verharren und ebenso dem immobilisierten Enzym nicht zur Verfügung stehen (Brinck et al. 1998).

Nimmt der Anteil der hydrophoben Sol-Gel Komponente zu, so steigt zum einen die Porosität des Gels an, zum anderen wird die Interaktion zwischen hydrophiler Oberfläche der Mizellen und hydrophobierter Sol-Gel Oberfläche schwächer. Es wird angenommen, dass in diesem Fall eine Interaktion nicht mehr erfolgt (Paria et al. 2004). Diese Effekte führen im Fall der hydrophoben Sol-Gele zu einer einfacheren Diffusion der Mizellen durch die Gele, während die Mizellen im Fall der hydrophilen Gele einfach an deren Oberfläche adsorbieren und dort auch möglicherweise zerstört werden, was zur Agglomeration des hydrophoben Substrats führen würde.

Dies kann neben der Betrachtung der enzymatischen Aktivität und der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Geloberfläche auch optisch anhand der verwendeten Gele erkannt werden. Während die hydrophoben Gele vom Substrat vollständig eingefärbt werden (vgl. Negativkontrollen in Abb. 5-11 A), behalten die hydrophilen Gele ihre weiße bis durchsichtige Farbe bei und das Carotinoid lagert sich an deren Oberfläche ab.

Die günstigeren Diffusionsmöglichkeiten der Mizellen und somit die bessere Substratverfügbarkeit in den hydrophoben und poröseren Gelen sind also die Erklärung für die bessere enzymatische Aktivität dieser Sol-Gele. Weiterhin ist der entscheidende Einfluss der hydrophoben Silan-Komponente im veränderten Polymerisationsverhalten der Gele zu suchen. Die zunehmende Porosität der hydrophoben Sol-Gele erklärt weiterhin die leicht höhere Tendenz zum beobachteten und diskutierten Auswaschen der immobilisierten Proteine (vgl. Abb. 5-12).

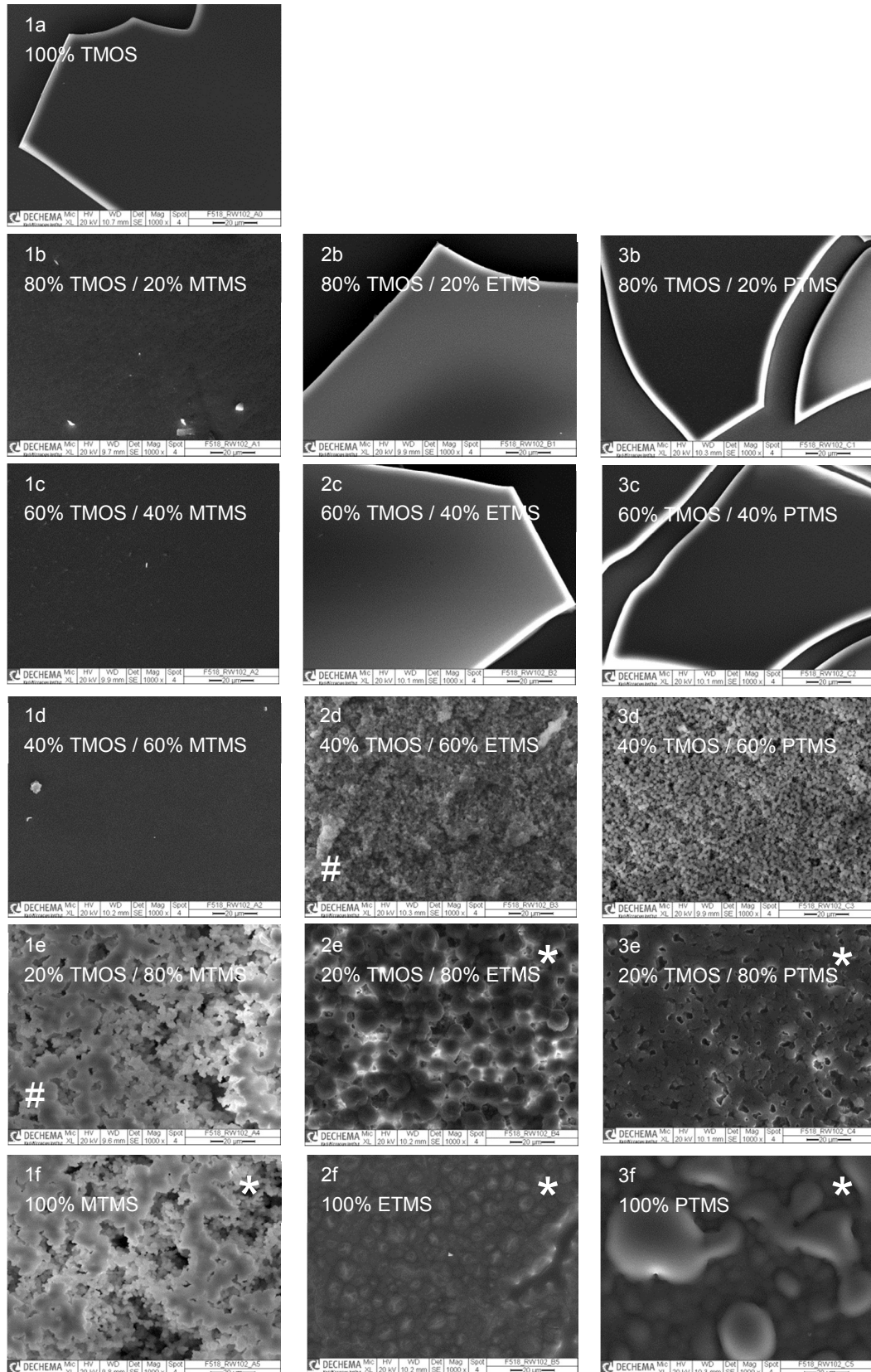


Abb. 5-15 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unterschiedlichen Sol-Gele

Oberflächenaufnahmen der wichtigsten untersuchten Sol-Gele; Hydrophobizität nimmt von oben nach unten zu; Mit * markierte Gele polymerisieren nicht richtig und sind der Vollständigkeit halber dargestellt; Mit # markierte Gele zeigten die beste enzymatische Aktivität (vgl. Abb. 5-13 A).

5.3.4 Beschichtung einer Pervaporationsmembran mit Sol-Gelen

Mit einigen der enzymatisch aktiven Sol-Gel Immobilisate wurde eine Pervaporationsmembran beschichtet. Zweck dieses Vorgehens war das Bündeln der katalytischen Aktivität direkt an der Membranoberfläche, um dort eine möglichst hohe Produktkonzentration zu generieren und die Triebkraft für den *in situ* Produktabtrennungsprozess zu maximieren (Stefer 2004). Es konnten erfolgreich stabile Schichten von unter 10 μm Dicke auf eine kommerzielle Membran aufgebracht werden (Abb. 5-16), allerdings war eine β -Ionon Produktion in Größenordnungen, die im Permeat detektierbar gewesen wären, nicht möglich. Aus diesem Grund wurden weitere Immobilisierungsmöglichkeiten untersucht (Abs. 5.4) und diese schließlich erfolgreich für die Produktion und *in situ* Produktabtrennung von β -Ionon mittels Pervaporation eingesetzt (Abs. 5.5).

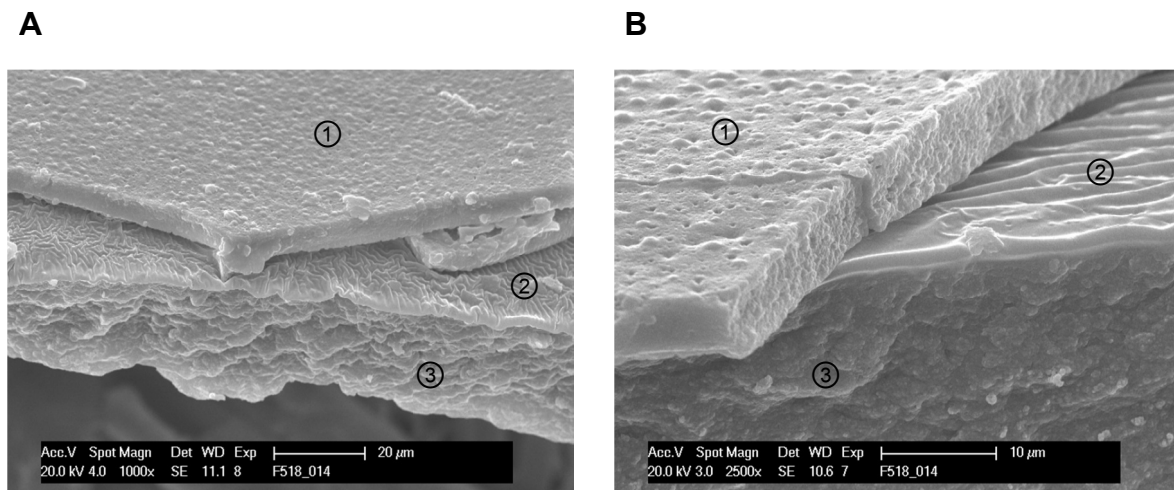


Abb. 5-16 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer mit Sol-Gel (20% TMOS / 80% MTMS) beschichteten Pervaporationsmembran, Vergrößerung: (A) 1000x, (B) 2500x

Der Schichtenaufbau der erzeugten Membran ist zu sehen: ① Sol-Gel Schicht, ② Funktionale Trennschicht, ③ Mechanische Stützschiicht

Mögliche Gründe für die Inaktivität der katalytischen Membran sind in der geringen Schichtdicke des Sol-Gels, welche zwar aus Stabilitäts- und Diffusionslimitierungsgründen erwünscht ist, allerdings negative Folgen für die Enzymaktivität hat. Zum einen wurde in Abs. 5.3.2 gezeigt und diskutiert, dass das immobilisierte Enzym aus den Oberflächenregionen der Gele während der Waschschrirte leichter eluiert wird. Weiterhin wurde ein Trocknungseffekt der Sol-Gele angesprochen, welcher ebenfalls an den Gel-Oberflächen schneller auftritt als im Gellinneren. Diese beiden Phänomene können in Sol-Gel-Monolithen vernachlässigt werden, da der Großteil des Gellinneren katalytisch intakt bleibt. Wird allerdings eine dünne Schicht von maximal 10 μm erzeugt, so wirken sich beide Effekte unvermindert auf die komplette Aktivschicht aus. Obwohl die Sol-Gel Schicht also stabil auf der Membranoberfläche aufgebracht werden konnte, führt wahrscheinlich das Auswaschen des Enzyms sowie die ver-

stärkte Trocknung und Porenverkleinerung zur Inaktivierung der katalytischen Membran.

5.3.5 Zusammenfassung

Die AtCCD1 wurde in siliziumbasierenden Sol-Gelen in aktiver Form immobilisiert. Bei dieser Methode werden Silan-Monomere hydrolysiert und anschließend durch pH-Wert Erhöhung nach Enzymzugabe kondensiert, was zur Polymerisation und zum Enzymeinschluss führt.

Erste Gele wurden aus unterschiedlichen molaren Verhältnissen von TMOS und MTMS hergestellt und die Enzymaktivität mit β -Apo-8'-carotenal getestet. Das gewünschte Produkt β -Ionon konnte für alle getesteten Varianten gaschromatographisch und massenspektrometrisch eindeutig auf enzymatische Aktivität zurückgeführt werden. Um sicherzustellen, dass tatsächlich immobilisiertes und nicht etwa sich rüchlösendes und in homogener Form reagierendes Enzym für die katalytische Aktivität verantwortlich ist, wurden Auswaschversuche durchgeführt und die eluierte Proteinmenge über verschiedene Zeiträume untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss von zusätzlichen Komponenten in der Substratlösung, insbesondere Triton X-100, auf diesen Effekt untersucht. Es zeigte sich, dass 73% - 87% des immobilisierten Enzyms auch nach längerer Waschdauer immobilisiert blieben. Die Immobilisierungseffizienz nahm mit der Hydrophilie der Gele zu. Die Triton X-100 beinhaltende Referenzlösung zeigte kein verstärktes Auswaschverhalten, was aufgrund des löslichkeitsfördernden Verhaltens des Tritons X-100 gegenüber der AtCCD1 durchaus negative Auswirkungen hätte haben können.

Weitere drei Monomere (ETMS, PTMS und 3-APTES) wurden zur Herstellung von hydrophob modifizierten Sol-Gelen jeweils in unterschiedlichen molaren Verhältnissen mit TMOS herangezogen. Die Tendenz zur aktivitätserhaltenden Immobilisierung im Fall größerer Anteile der hydrophob modifizierten Silan-Monomere im Gel blieb auch für ETMS und PTMS bestehen. Die aus der Kombination von TMOS und 3-APTES hergestellten Gele waren nicht aktiv.

Obwohl die graduell hydrophobisierte Mikroumgebung durch ihre direkte Interaktion mit der hydrophoben AtCCD1-Oberfläche als Ursache für die vorteilhaftere Immobilisierung nicht auszuschließen ist, stellt eher das sich verändernde Polymerisationsverhalten der hydrophobisierten Sol-Gele die eigentliche Ursache für die guten Produktausbeuten der betreffenden Immobilisate dar. Da jeweils eine Bindung des hydrophoben Silan-Monomers nicht hydrolysierbar ist, kann sie zur Netzwerkverzweigung nicht beitragen und bleibt als molekularer Endpunkt erhalten. Dies führt zu einer steigenden Porosität des entstehenden Sol-Gels und zunehmender Hydrophobizität der Gel-Oberflächen mit zunehmender Konzentration der hydrophoben Monomer-Komponente. Durch die steigende Porosität ist es den Mizellen möglich, auch in

tiefere Gelregionen zu diffundieren. Im Extremfall bilden sich allerdings mikroskopisch kleine abgeschlossene Sol-Gel Kugeln mit nicht hydrolysierbaren Bindungen an der Oberfläche, was in einer ausbleibenden makroskopischen Polymerisation resultiert und zu verhindern ist. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen das beschriebene Polymerisationsverhalten.

Den zweiten zentralen Effekt stellt die Interaktion der Sol-Gel Oberfläche mit der hydrophilen Oberfläche der substratbeinhaltenden Triton X-100 Mizellen dar. Im Fall der wenig porösen hydrophilen Sol-Gele findet, wie durch Messung und Analyse von Partitionskoeffizienten nachgewiesen wurde, eine ausgeprägte Anlagerung an die Geloberfläche und möglicherweise auch Zerstörung der Mizellen statt, was die Substratverfügbarkeit für das Enzym reduziert. Weiterhin sind die Mizellen möglicherweise zu groß für die kleinen Poren der hydrophilen Sol-Gele, was dazu führt, dass die in tieferen Gel-Regionen immobilisierte AtCCD1 nicht mit Substrat versorgt wird. Im Fall der hydrophoben Sol-Gele zeigt die Partitionskoeffizienten-Analyse eine geringere Tendenz zur Anlagerung der Mizellen, was der theoretischen Erwartung entspricht und weiterhin die Substratverfügbarkeit für die enzymatische Umsetzung erhöht.

Die Kombination aus Polymerisationsverhalten der unterschiedlichen Sol-Gel Komponenten und der mizellaren Substratvermittlung stellt den Grund für die bessere Eignung hydrophob modifizierter Sol-Gele für die AtCCD1-Immobilisierung und den mizellaren Umsatz von Carotinoiden dar.

Im Weiteren war es möglich, unterschiedliche zuvor für aktiv befundene Sol-Gele auf eine kommerzielle Pervaporationsmembran stabil aufzubringen. Allerdings wirkte sich die benötigte geringe Schichtdicke negativ auf die Enzymaktivität aus. Das veränderte Trocknungsverhalten dieser dünnen Gelschicht oder auch das Auswaschen des Enzyms aufgrund der geringen Schichtdicken führten zu einer inaktiven Membran. Aus diesem Grund wurde für die *in situ* Produktabtrennung die in Absatz 5.4.2 beschriebene Immobilisierungsmethode eingesetzt.

5.4 Immobilisierung der AtCCD1 mittels Affinitätsanbindung

Als Alternative zur Sol-Gel Immobilisierung wurde mit der Affinitätsanbindung mittels His₆- und GST-Tag eine prinzipiell andere und reversible Methode gewählt. Dies erlaubt bei erfolgreicher Immobilisierung und Einsatz in der Pervaporationsanlage einen direkten Austausch inaktivierten Enzyms ohne Austausch der Membran. Näheres hierzu wird in Abs. 5.5 betrachtet.

5.4.1 Affinitätsanbindung mittels His₆-Tag

Für den Einsatz in einer Pervaporationsanlage im Labormaßstab wurde eine mit einem His₆-Tag versehene AtCCD1 an eine mit Nickel beladene IMAC¹-Matrix immobilisiert und auf enzymatische Aktivität hin untersucht. Hierfür wurde das Immobilisat mit dem mizellar solubilisierten Substrat β -Apo-8'-carotenal inkubiert und in Intervallen eine Probe genommen, das Immobilisat abzentrifugiert und der Überstand photometrisch auf seinen verbleibenden Substratgehalt vermessen (Abb. 5-17 A). Hierbei konnte gezeigt werden, dass AtCCD1-His₆ in aktiver Form immobilisierbar ist und spezifisch das Substrat zu β -Ionon und einem Dialdehyden spaltet. Die etwa 120 μ M Substratlösung konnte innerhalb von einer Stunde vollständig umgesetzt werden. Der gewünschte Aromastoff wurde per GC/MS eindeutig identifiziert.

Da Carotinoide empfindlich gegenüber unspezifischer Spaltung sind, ist wichtig, dass das an der IMAC-Matrix koordinativ gebundene Nickel eine solche Reaktion nicht katalysiert. Es ist bekannt, dass Nickel Oxidationsreaktionen von Kohlenwasserstoffen und DNA katalysieren kann (Burrows et al. 1996; Muñiz et al. 2007). Aus diesem Grund wurde als Negativkontrolle eine mit Nickel beladene Affinitätsmatrix eingesetzt und parallel zum eigentlichen Immobilisat auf Aktivität untersucht. Abb. 5-17 A ist zu entnehmen, dass eine unspezifische Spaltung nicht stattfindet.

Diese Reaktion wurde an vier aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt, so dass die gewünschte Wiederverwendbarkeit eines solchen Immobilisates gezeigt werden konnte. Dazwischen wurde das Immobilisat bei 4°C in Puffer gelagert. Allerdings nahm die Initialaktivität jeweils zum Vortag um 53%, 29% und 8% ab. Auch reduzierte sich der Anteil an umgesetztem Substrat bis das Immobilisat am fünften Tag inaktiv war.

Diese Aktivitätsabnahme kann zum einen durch Enzymverlust durch die relativ häufigen Waschschriffe aber auch durch Enzymdenaturierung begründet sein. Auch kann ein Auswaschen der Metallionen die Bindung unbeabsichtigt lösen (Mateo et al. 2001). Um das Problem des auch anderweitig bekannten Proteinverlustes zu reduzieren (Chaga 2001; Johnson et al. 2005), können alternative Tags (z. B. Streptavidin), die eine stärkere Bindung zwischen Protein und Matrix erlauben und weniger Proteinverlust zulassen (Block et al. 2009), eingesetzt werden.

Wie im Fall der Sol-Gele wurde auch bei dieser Methode untersucht, ob nicht möglicherweise sich rücklösendes Enzym in homogener Lösung die katalytische Aktivität verrichtet und zu Fehlinterpretationen führt. Dafür wurden die in Abb. 5-17 A genommenen und vom Immobilisat getrennten Überstände unter gleichen Bedingungen weiterinkubiert und später nochmals vermessen. Es zeigte sich, dass Aktivität nur in Präsenz der Immobilisate möglich war, also keine enzymatische Reaktion in der homogenen Reaktionslösung stattfindet.

¹ IMAC = Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography

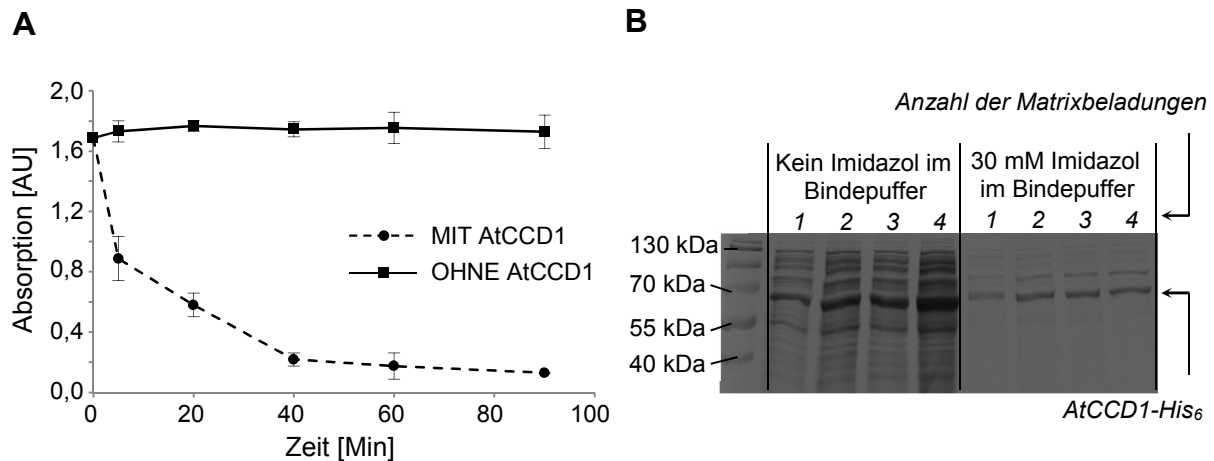


Abb. 5-17 (A) Kinetik der immobilisierten AtCCD1-His₆ Aktivität, (B) SDS-PAGE von eluiertem Immobilisat nach mehrfacher Beladungswiederholung mit und ohne Imidazol

- (A) Dargestellt ist die Absorption des Substrates β -Apo-8'-carotenal bei 510 nm; Zu den dargestellten Zeitpunkten wurde das Immobilisat abgetrennt und der Überstand vermessen; Als Negativkontrolle diente eine mit Leervektorextrakt inkubierte Matrix
- (B) Mehrfachbeladung einer Probe in der Reihenfolge 1-4 fand jeweils mit der Fraktion der zuvor nicht gebundenen Proteine statt

Obwohl es sich bei der His₆-Tag Anbindung um eine der Affinitätschromatographie vergleichbare Methode handelt, was normalerweise eine hohe Spezifität impliziert, können Proteine, welche mehrere Histidine enthalten, unspezifisch an die Matrix binden und das Immobilisat kontaminieren und die Kapazität verringern. Dies liegt daran, dass für die Bindung nicht zwingend sechs konsekutive Histidine nötig sind, sondern lediglich zwei oder auch nur ein einzelnes (Block et al. 2009), was bei einer Vielzahl von Proteinen der Fall sein kann. Dieses Phänomen resultiert in einer leicht reduzierten Bindungselektivität im Vergleich mit der Affinitätschromatographie (Chaga 2001).

Dieses Problem kann durch Zugabe kleiner Konzentrationen von Imidazol während des Immobilisierungsschrittes umgangen werden. Imidazol ist ein Struktur analogon von Histidin und wird in ansteigenden Konzentrationen zur Elution der immobilisierten His₆-Proteine verwendet (Block et al. 2009).

Da für eine hohe volumetrische Aktivität des Immobilisates eine möglichst hohe AtCCD1-Dichte gewünscht ist, wurde untersucht, ob zum einen die Mehrfachbeladung einer Matrix mit der zuvor nicht gebundenen Proteinfraction und zwischengeschaltetem Waschschrift und zum anderen der Zusatz kleiner Imidazol-Konzentrationen im Bindepuffer einen zielführenden Effekt hat. Dafür wurden die Proteine der unterschiedlichen Ansätze wieder eluiert und in einer SDS-PAGE untereinander verglichen (Abb. 5-17 B).

Es wird deutlich, dass die Zugabe von Imidazol die Kontaminationen wie gewünscht größtenteils eliminiert. Allerdings wird auch die Menge der immobilisierten AtCCD1-His₆ reduziert. So ist möglicherweise der spezifische AtCCD1-His₆-Anteil höher, aber

im vorliegenden Fall ist eine möglichst hohe absolute AtCCD1-His₆-Menge wünschenswert. Diese wird erreicht, indem kein Imidazol verwendet wird und die nicht gebundenen Proteine nach einem Waschschrift nochmals wiederholt zur Matrix gegeben werden. Dies macht Sinn, um die schwierig exprimierbare AtCCD1 (vgl. Abs. 5.1.2) möglichst effizient aufzuarbeiten.

5.4.2 Affinitätsanbindung mittels GST-Tag

Da eine mit einem GST-Tag fusionierte AtCCD1 gegenüber der nativen und mit einem His₆-Tag versehenen AtCCD1 ein verbessertes Expressions- und Löslichkeitsverhalten aufweist (Schilling et al. 2007; Schilling 2008) und GST ebenfalls für eine affinitätsbasierende Immobilisierung verwendet werden kann, wurde dies in analoger Weise zu Abs. 5.4.1 durchgeführt.

Nachdem prinzipiell gezeigt werden konnte, dass auch GST-AtCCD1 an einer Matrix immobilisierbar und katalytisch aktiv ist (Abb. 5-18 B), wurde zur Optimierung der immobilisierten Proteinmenge und damit verbundenen spezifischen Aktivität des Immobilisates GST-ATCCD1 unter verschiedenen Bindebedingungen an eine mit kovalent gebundenem Glutathion modifizierte Agarose-Matrix immobilisiert. Hierfür wurden zwei unterschiedlich starke Energieeinträge bei Zellaufschluss, der Zusatz von Dithiothreitol (DTT) und Triton X-100 zum Aufschluss- und Bindepuffer untersucht. Die Energieeinträge wurden untersucht, weil die Zellaufschlussbedingungen zwar auf maximale AtCCD1-Aktivität optimiert waren, allerdings nicht sichergestellt war, dass der für die Immobilisierung essenzielle GST-Tag nicht denaturiert wird. Aus diesem Grund wurde mit halbem Energieeintrag im Vergleich zum Standardaufschluss gearbeitet. Einem ähnlichen Zweck dient das DTT, welches einen proteinkonservierenden Effekt haben kann, indem es die Oxidation von Sulfhydrylgruppen der Proteine zu Disulfidbrücken nach dem Zellaufschluss unterbindet und so die native Konformation bewahrt (Marshak 1996). Weil Zellbestandteile über hydrophobe Interaktionen die Matrix verunreinigen und die Kapazität reduzieren können, wurde mit und ohne Triton-X100 gearbeitet. Der Effekt des Tensids auf AtCCD1 wurde in Abs. 5.1.2 diskutiert.

Es konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Triton X-100 die Immobilisierungseffizienz entscheidend verbessert (Abb. 5-18 A). Dies liegt allerdings weniger an dem Einfluss des Tritons an der Immobilisierung selbst, sondern an dem löslichkeitsfördernden Einfluss auf die exprimierte AtCCD1 (vgl. Abs. 5.1.2). Bei der gegebenen Matrixkapazität konnte zusätzlich gelöste AtCCD1 vollständig immobilisiert werden. DTT hingegen zeigt keinen Einfluss auf die Immobilisierungseffizienz. Ein hoher Energieeintrag beim Zellaufschluss schädigt den GST-Tag hingegen nicht und kann verwendet werden. Für den Ansatz mit Triton X-100 ist er sogar tendentiell förderlich.

Die Intensität einer Ultraschallbehandlung ist ein gängiger Parameter zur Veränderung von definierten Lipidstrukturen in wässrigen Lösungen (Yashroy 1990). Sie kann sogar zur Invertierung einer Lipiddoppelschicht führen, so dass an sich intravesikulär angelagerte Proteine nach der Ultraschallbehandlung extravesikulär vorliegen (Penkett et al. 1968). Dementsprechend kann ein höherer Energieeintrag im Fall von AtCCD1 möglicherweise zu kleineren Membranfragmenten oder invertierten Membranvesikeln führen und so die Zugänglichkeit für das Triton X-100 verbessern, was in einer höheren gelösten GST-AtCCD1 Menge resultiert.

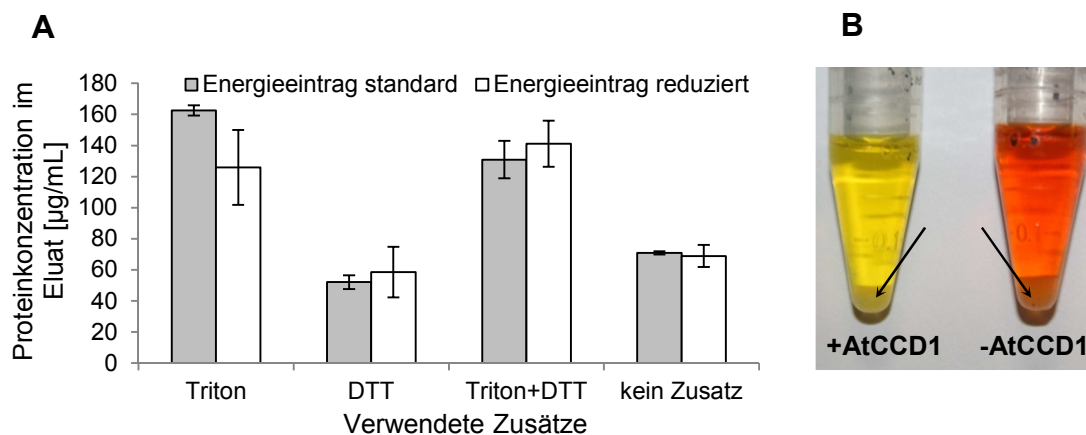


Abb. 5-18 Optimierung der Immobilisierungseffizienz von GST-ATCCD1 (A) und Abbildung eines katalytisch aktiven Immobilisates (B)

- (A) Unterschiedliche Zusätze wurden zu den *E. coli* Zellen gegeben und bei zwei unterschiedlichen Ultraschallintensitäten aufgeschlossen; GST-AtCCD1 wurde immobilisiert, eluiert und quantifiziert.
- (B) Aktives Immobilisat nach vollständigem Umsatz von β -Apo-8'-carotenal (+AtCCD1) und zugehörige Negativkontrolle mit immobilisiertem Leervektor-Extrakt (-AtCCD1); Pfeile markieren das Immobilisat.

5.4.3 Vergleich der beiden affinitätsbasierten Methoden

Da sowohl die GST- als auch die His₆-Anbindung der AtCCD1 an eine Matrix unter Erhalt der enzymatischen Aktivität möglich war, wurden beide Methoden verglichen, um die katalytisch aktivere Variante für eine *in situ* Produktabtrennung in einer Pervaporationsanlage einzusetzen (Kap. 5.5). Zu diesem Zweck wurde einerseits die immobilisierte Proteinmenge und andererseits die Produktbildungskinetik beider Immobilisierungsvarianten untersucht (Abb. 5-19). Die Immobilisierung fand an je 100 µL der entsprechenden Matrix statt, da das Matrixvolumen einen zentralen Limitierungsfaktor in der Pervaporationsanlage darstellt.

Es wird deutlich, dass wie bereits angesprochen die Immobilisierung mittels Nickel Chelatisierung unter Beteiligung des His₆-Tags kontaminationsanfällig ist. Wegen der zuvor durchgeführten Optimierungsergebnisse (Abs. 5.4.1, Abb. 5-17 B) wurde an dieser Stelle auf den Einsatz von Imidazol zur Unterbindung dieser Kontaminationen

verzichtet. Die AtCCD1-His₆ Bande ist sichtbar, hebt sich bezüglich der Proteinmenge allerdings gegenüber unspezifisch gebundenen Proteinen nicht extrem hervor. Im Fall der GST-AtCCD1 ist das Bild deutlich besser. Höchste Bindespezifität und fast keine Kontamination führen zu einer deutlichen GST-AtCCD1 Bande. Dies entspricht der Erwartung, da Affinitätschromatographische Bindemethoden der Metallchelatisierung bezüglich ihrer Selektivität im Allgemeinen überlegen sind (Chaga 2001).

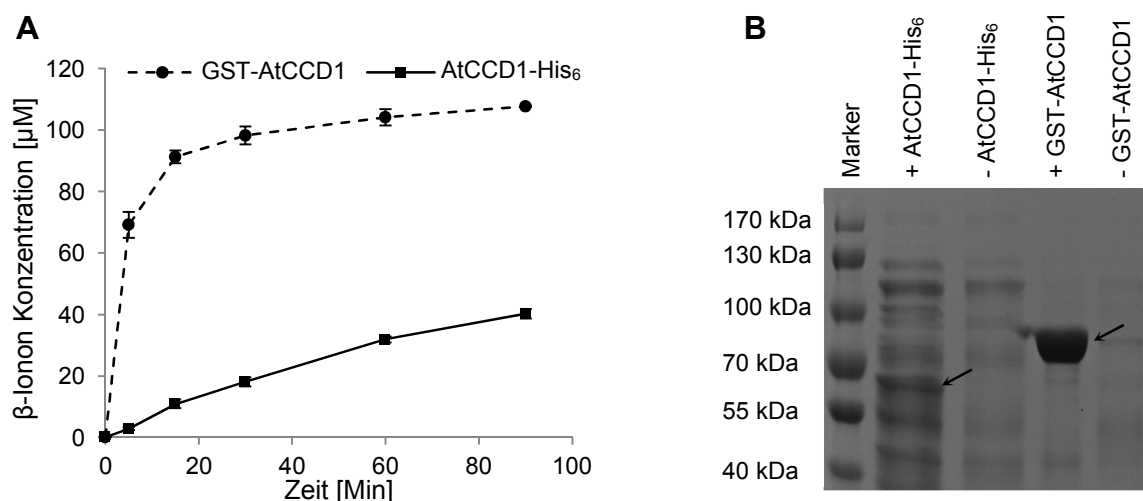


Abb. 5-19 Vergleich der beiden affinitätsbasierten Immobilisate (His₆, GST)

- (A) Produktbildungskinetik von β -Ionon; Substratkonzentration: 126 μ M β -Apo-8'-carotenal, je 1 mL wurde verwendet; Eingesetzte Matrixmenge: je 100 μ L;
 (B) SDS-PAGE der immobilisierten und anschließend eluierten Proteine; Pfeile markieren die AtCCD1-His₆ und GST-AtCCD1; Als Negativkontrollen wurden die entsprechenden Leervektorextrakte eingesetzt.

Abb. 5-19 B zeigt das von den Matrices gebundene und eluierte Protein sowohl für die AtCCD1 beinhaltenen Proben als auch die der Kontrollen mit Leervektorextrakt. Densitometrische Quantifizierungen der interessanten Proteinbanden legen nahe, dass mit etwa 61 pmol AtCCD1-His₆ im Vergleich zu etwa 283 pmol GST-AtCCD1 fast fünfmal so viel von der GST-fusionierten Enzymvariante immobilisiert wurden wie von der His₆-Variante. Weiterhin wurde berechnet, dass im Fall der Leervektorkontrolle zu GST-AtCCD1, in welcher das GST-Protein alleine exprimiert wird, etwa 3,4 nmol des GST-Fragments immobilisiert wurden ($M_W(\text{GST}) = 26,3$ kDa, in Abb. 5-19 B außerhalb des dargestellten Bereichs). Dies bedeutet, dass GST-AtCCD1 ungefähr 8% der vorhandenen Bindemöglichkeiten belegt hat. Obwohl dies ein niedriger Wert zu sein scheint, ist der sterische Einfluss des mit 87,2 kDa im Vergleich zum GST-Protein mehr als dreimal so großen GST-AtCCD1 Fusionsproteins zu beachten, welcher zu einer signifikant niedrigeren Beladungsdichte der Affinitätsmatrix führen kann (Frangioni et al. 1993; Smith 2000).

Da die einzelnen Enzymvarianten unterschiedliche molare Aktivitäten haben können, ist eine alleinige Betrachtung der immobilisierten Proteinmenge nicht zielführend. Es muss zusätzlich hierzu auch die katalytische Aktivität der beiden Immobilisate vergli-

chen werden. Auch in diesem Fall zeigt sich GST-AtCCD1 als die bessere Variante (Abb. 5-19 A). Mit einer Anfangsaktivität von $13,8 \pm 0,8$ mU/mL ist das GST-AtCCD1-Immobilisat dem His₆-AtCCD1-Immobilisat mit $0,6 \pm 0,1$ mU/mL etwa um den Faktor 24 überlegen. Diese Angabe bezieht sich auf das Gesamtimmobilisat statt auf das einzelne Enzym und stellt den zentralen Bewertungsfaktor für die Weiterverwendung der getesteten Immobilisate dar.

Eine Möglichkeit zur Erklärung der Überlegenheit des GST-Immobilisates stellt eine teilweise Inaktivierung der immobilisierten AtCCD1-His₆ dar. Es ist bekannt, dass das Enzym durch kombinierten Einsatz von Kupferionen und EDTA durch Entfernen des im aktiven Zentrum gebundenen Eisenions inaktiviert werden kann (Guo et al. 2008). Da die Matrix mit chelatisierten Nickelionen beladen ist, kann ein analoger Vorgang für die Verdrängung des Eisenions aus dem aktiven Zentrum der AtCCD1 verantwortlich sein. Auch wenn dies nicht mit allen Enzymen passiert, kann ein solcher Effekt für das signifikant schlechtere Abschneiden des AtCCD1-His₆-Immobilisates gegenüber dem GST-AtCCD1 Immobilisat verantwortlich sein.

Aufgrund der deutlichen Überlegenheit in der Aktivität des GST-AtCCD1-Immobilisates gegenüber dem AtCCD1-His₆-Immobilisat sowie der Inaktivierung AtCCD1-beladener Sol-Gele, sobald diese auf eine Pervaporationsmembran aufgebracht werden (vgl. Abs. 5.3), wurde das GST-AtCCD1-Immobilisat für den Einsatz in einer Pervaporationsanlage im Labormaßstab zur β -Ionon-Produktion und *in situ* Produktabtrennung ausgewählt und untersucht (Abs. 5.5.2).

5.4.4 Zusammenfassung

Mit der His₆-Tag und GST-Tag Immobilisierung wurden als Alternative zu den Sol-Gelen zwei affinitätsbasierende Immobilisierungsmethoden für die AtCCD1 erfolgreich angewendet und das Zielprodukt β -Ionon nachgewiesen.

Im Fall der AtCCD1-His₆ förderte der Zusatz von Imidazol zum Bindepuffer zwar die Reinheit des Proteinpräparates, reduziert aber die absolut immobilisierte AtCCD1-Menge, was in diesem Fall unerwünscht ist. Die Mehrfachbeladung der Matrix konnte gewisse Kontaminationen mit Fremdprotein nicht unterbinden, führte aber zur maximalen absolut immobilisierten AtCCD1-His₆ Menge. Eine Wiederverwendbarkeit eines solchen Immobilisates konnte für vier aufeinander folgende Tage mit Zwischenzeitlicher Lagerung in Puffer bei 4°C gezeigt werden. Weiterhin wurde sichergestellt, dass die enzymatische Spaltungsreaktion auch tatsächlich durch immobilisiertes und nicht durch sich rücklösendes Enzym katalysiert wurde.

Auch im Fall der GST-AtCCD1 wurden Optimierungsreihen durchgeführt, um die immobilisierte Proteinmenge und die katalytische Aktivität zu maximieren. Als beste Variation wurde der Zusatz von 1% Triton X-100 in Kombination mit einem höheren

Energieeintrag identifiziert. Triton X-100 löst effizient die GST-AtCCD1 aus Membranfragmenten heraus und stellt eine größere Menge des Enzyms für die Immobilisierung bereit. Eine höhere Beschallungsintensität beim Aufschluss begünstigt diesen Prozess, ohne die Bindefähigkeit an die Affinitätsmatrix zu beeinträchtigen.

Nach der Optimierung beider affinitätsbasierender Methoden wurden diese hinsichtlich der katalytischen Aktivität miteinander verglichen. Bei Verwendung der gleichen Immobilisatmenge war die Variante mit GST-AtCCD1 etwa um den Faktor 24 aktiver als die AtCCD1-His₆ Variante. Dies konnte zum einen auf die selektivere und effizientere Immobilisierung im Fall der GST-AtCCD1 zurückgeführt werden. Da aus densitometrischen Messungen hervorging, dass etwa 5x mehr GST-AtCCD1 immobilisiert wurde als AtCCD1-His₆, die Aktivität aber um den Faktor 24 höher war, muss auch eine enzymkinetische Überlegenheit der GST-AtCCD1 vorliegen. Eine mögliche Ursache stellt hier die Orientierung der jeweiligen Fusionspartner am Enzym und daraus folgend eine sich wahrscheinlich unterscheidende Ausrichtung des Enzyms an der Matrix dar.

Aufgrund der deutlichen katalytischen Aktivität des GST-AtCCD1 Immobilisates wurde dieses für die Produktion und *in situ* Produktabtrennung von β -Ionon mittels Pervaporation eingesetzt.

5.5 Pervaporation als Methode zur *in situ* β -Ionon Abtrennung

AtCCD1 spaltet die Substrate regiospezifisch. Besonders im Vergleich zur unspezifischen cooxidativen Spaltung resultiert dies in hohen Ausbeuten der gewünschten Produkte wie z.B. des β -Ionons. Nichtsdestotrotz ist eine Produktabtrennung und -aufreinigung unumgänglich, da es sich bei der Reaktionslösung um ein komplexes Gemisch aus Substrat, Tensid, Cosolvens, dem entstehenden Nebenprodukt und nicht zuletzt der Enzymlösung mit weiteren aus *E. coli* stammenden Komponenten handelt. Weiterhin ist eine *in situ* Produktabtrennung des entstehenden β -Ionons von Interesse, da eine Produktinhibierung der AtCCD1 beschrieben wurde (Schilling 2008).

Die organophile Pervaporation nimmt in diesem Zusammenhang gegenüber alternativen Produktabtrennungsmethoden eine prädestinierte Stellung ein. Das Zielprodukt β -Ionon erfüllt die grundlegenden Voraussetzungen, Hydrophobizität und Volatilität, für die Aufreinigung auf diesem Wege. Insbesondere die Selektivität dieser Membranmethode ist hervorzuheben. Lediglich das Cosolvens Ethanol, welches aus enzymkinetischen Gründen der Reaktionslösung zugesetzt wird (10% v/v), erfüllt die genannten Voraussetzungen ebenfalls und ist im Permeat detektierbar. Dies ist in diesem Zusammenhang allerdings ein Vorteil, da gezeigt wurde, dass Ethanol den Aromastoff-Transport durch eine Pervaporationsmembran begünstigt (Bengtson et al. 1995).

Andere *in situ* Abtrennungsmethoden wie Adsorption oder Stripping können anfälliger für Kontaminationen sein. Insbesondere bei Verwendung von *E. coli* Rohextrakt können Substanzen über den Luftweg mitabgetrennt werden oder auch unspezifisch an eine Adsorptionsmatrix binden. Da bei der Pervaporation eine homogene Membran eingesetzt wird, kann im Allgemeinen kein Fouling auftreten.

Wegen der genannten theoretischen Vorteile dieser Produktabtrennungsmethode für die bestehende Aufgabe wurde die Abtrennung des enzymatisch produzierten β -Ionons mittels Pervaporation untersucht. Dies wurde zunächst in einem homogenen Umsatz und anschließend mit zuvor immobilisierter AtCCD1 durchgeführt.

5.5.1 Homogener Umsatz

Die Versuche zur Produktabtrennung wurden in einer Pervaporationslaboranlage mit einer PV-Membranfläche von 0,0035 m² durchgeführt (Abb. 5-20). Die Komplexität der Pervaporationsversuche wurde stufenweise gesteigert. Um die generelle Pervaporierbarkeit von β -Ionon sicherzustellen, wurden zu Beginn Modelllösungen aus β -Ionon, Ethanol als Cosolvens und Wasser pervaporiert. Nachdem festgestellt wurde, dass das gewünschte Produkt im Permeat detektierbar ist und mit einem Aufreinigungsfaktor von 17 aufkonzentriert werden kann, wurde der homogene Ansatz aus AtCCD1-Rohextrakt und β -Apo-8'-carotenal auf 30°C temperiert und über die PV-Membran zirkuliert. In regelmäßigen Abständen wurden die permeatseitigen Kühlfallen ausgetauscht und das Retentat sowie das gefrorene Permeat chromatographisch auf ihre Zusammensetzungen hin untersucht.

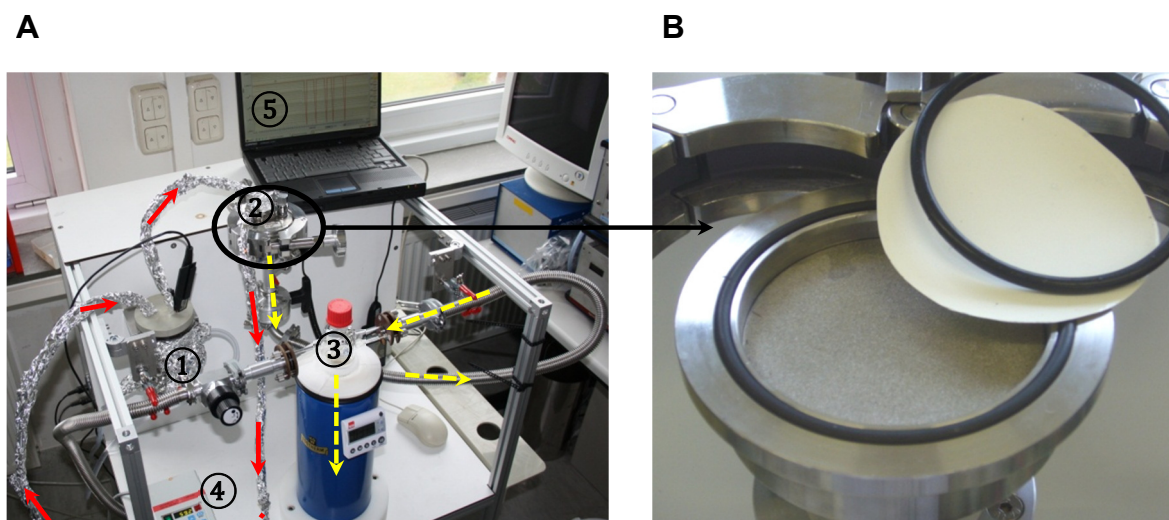


Abb. 5-20 Aufbau der Pervaporationsanlage (A) und offenes PV-Modul mit PV-Membran mit funktioneller PDMS-Schicht und Dichtung (B)

- (A) Rote Pfeile markieren die Substratzirkulation, gelbe gestrichelte Pfeile zeigen den Weg des β -Ionons auf der Unterdruckseite der Membran; ① Substratreservoir, ② Pervaporationsmodul, ③ Kühlfalle, ④ Substratpumpe, ⑤ Druckaufzeichnung; Vakuumpumpe ist im Bild nicht zu sehen
- (B) Geöffnetes PV-Modul aus Abb. A; Membran G/V-1, GMT Membrantechnik

In Abb. 5-21 A sind die Konzentrationsverläufe von β -Ionon im Permeat und Retentat vergleichend aufgetragen. Es konnte so gezeigt werden, dass auch das enzymatisch produzierte β -Ionon gut pervaporierbar ist. Dies ist aufgrund von Limitierungen des mizellaren Substratvermittlungssystems nicht selbstverständlich. Die Konzentrationen des Ionons in den Modelllösungen waren höher gewählt als dies mit dem mizellaren System erreichbar gewesen wäre.

Es wird deutlich, dass die enzymatische β -Ionon Produktion etwa 90-120 Minuten andauert. Zu diesem Zeitpunkt erreicht die Produktkonzentration im Retentat ihren Höchststand. Dies deckt sich mit dem katalytischen Verhalten der AtCCD1 im Kleinmaßstab (Schilling 2008). Die ersten β -Ionon Mengen im Permeat wurden nach einer Stunde detektiert.

Hierbei ist zu beachten, dass eine frequentere Probennahme durch das Wechseln von Kühlfallen kaum möglich ist. Das erste β -Ionon muss im Permeat also im Zeitintervall 30 bis 60 Minuten erscheinen. Dass dies erst relativ spät im Vergleich zum Entstehen im Retentat passiert, ist in der PV-Membran als Diffusionsbarriere begründet. Deren funktionelle homogene Schicht muss eine ausreichende β -Ionon Menge absorbiert haben, um es auf der Permeatseite effizient wieder desorbieren zu können. Die Produktkonzentration im Permeat steigt noch zweimal an und fällt ab dann wieder. Dies liegt daran, dass die Pervaporationsleistung unter anderem von den Konzentrationen der Retentatkomponenten abhängt. Da die Temperatur und der permeatseitige Unterdruck unverändert blieben, muss es sich bei der Produktkonzentration im Retentat um die entscheidend beeinflussende Größe handeln. Nach etwa zwei Stunden ist die Iononproduktion im Retentat abgeschlossen und zu diesem Zeitpunkt die Triebkraft für den Trennprozess am größten. Danach wird das Ionon aus dem Retentat abgezogen, ohne dass neues nachproduziert wird.

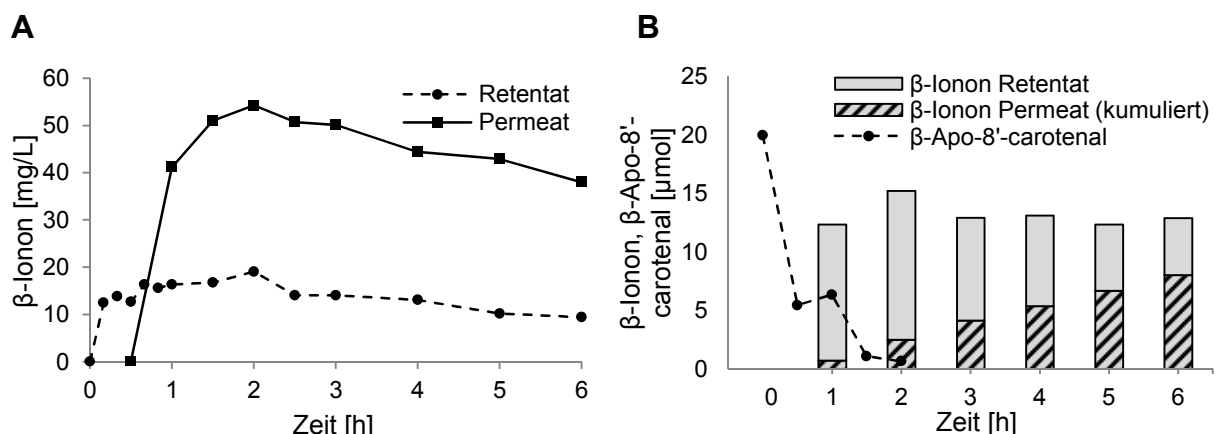


Abb. 5-21 Abtrennung des homogen enzymatisch aus β -Apo-8'-carotenal hergestellten β -Ionons mittels organophiler Pervaporation: (A) Zeitliche Konzentrationsverläufe im Retentat und Permeat, (B) Kumulierte Absolutmengen

Permeatproben wurden durch sukzessiven Austausch der Kühlfallen gewonnen, Retentatproben wurden aus dem Vorratsgefäß entnommen

Die Zweistufigkeit des Prozesses wird in Abb. 5-21 B noch deutlicher. Hier sind die absoluten Substrat- und Produktmengen vergleichend dargestellt. Knapp 20 μmol Substrat stehen zu Beginn des Prozesses zur Verfügung. Diese sind nach etwa 90-120 Minuten umgesetzt und der größte Teil des entstandenen Ionons befindet sich im Retentat. Danach ändert sich die Gesamtmenge an β -Ionon nur marginal, aber die Verteilung zwischen Retentat und Permeat deutlich. Es findet ein kontinuierlicher Übergang vom Retentat ins Permeat statt.

5.5.2 Heterogener Umsatz mit affinitätsimmobilisierter GST-AtCCD1

Nachdem die *in situ* Produktabtrennung mittels organophiler Pervaporation im Fall der homogenen β -Ionon Produktion mittels gelöster AtCCD1 erfolgreich demonstriert werden konnte, wurde die gleiche Methode für den heterogenen Ansatz untersucht. Neben der Wiederverwendbarkeit des Immobilisates, war ein Ziel, den Biokatalysator möglichst dicht an der Pervaporationsmembran zu positionieren. Dies sollte zur Folge haben, dass nach der Carotinoid-Spaltung eine höhere lokale β -Ionon Konzentration auftreten würde, als dies im homogenen Ansatz der Fall ist. Dies wirkt sich wiederum unmittelbar auf den Konzentrationsgradienten über der Membran und somit die Triebkraft des Trennprozesses aus (Lipnizki et al. 2000).

Um diesen Effekt zu erzielen, wurde das in den Absätzen 5.4.2 und 5.4.3 untersuchte und optimierte Immobilisat in das Pervaporationsmodul direkt auf die Pervaporationsmembran gegeben und mit einer porösen Nitrocellulosemembran abgedeckt (Abb. 5-22). Dies gewährleistet, dass das Immobilisat am vorgesehenen Ort verbleibt, gleichzeitig aber das Substrat zum Immobilisat vordringen kann. Der Rest der Anlage wurde wie in Abb. 5-20 A dargestellt betrieben. Allerdings wurde der Substratdurchfluss mithilfe eines Bypasses zunächst auf 1 L/Min gedrosselt. Dies führte allerdings nicht zu einer signifikanten Produktmenge im Permeat. Mögliche Gründe dafür sind z.B. Kurzschlussströmungen über der Nitrocellulosemembran. Daraus resultiert, dass das Substrat nicht in ausreichenden Kontakt mit dem Enzym kommt. Weiterhin ist der Prozess dadurch diffusionskontrolliert, was die Reaktion möglicherweise so sehr verzögert, dass die AtCCD1 in der Zwischenzeit an Aktivität verliert.

Um diese Limitierungen zu umgehen, wurde der heterogene Umsatz mit der maximal möglichen Flussrate von 20 L/Min durchgeführt. Es wurde zunächst eine Negativkontrolle eingesetzt (Affinitätsmatrix inkubiert mit Leervektorextrakt) und direkt danach das GST-AtCCD1-Immobilisat analysiert. Dies ist nötig, weil ein kleiner β -Ionon Hintergrund auch bei langen Pervaporationsdauern aus der Anlage nicht eliminierbar ist. Grund hierfür sind Polymerdichtungen in der Anlage, welche das Ionon aus früheren Versuchen teilweise absorbieren und später nach und nach abgeben.

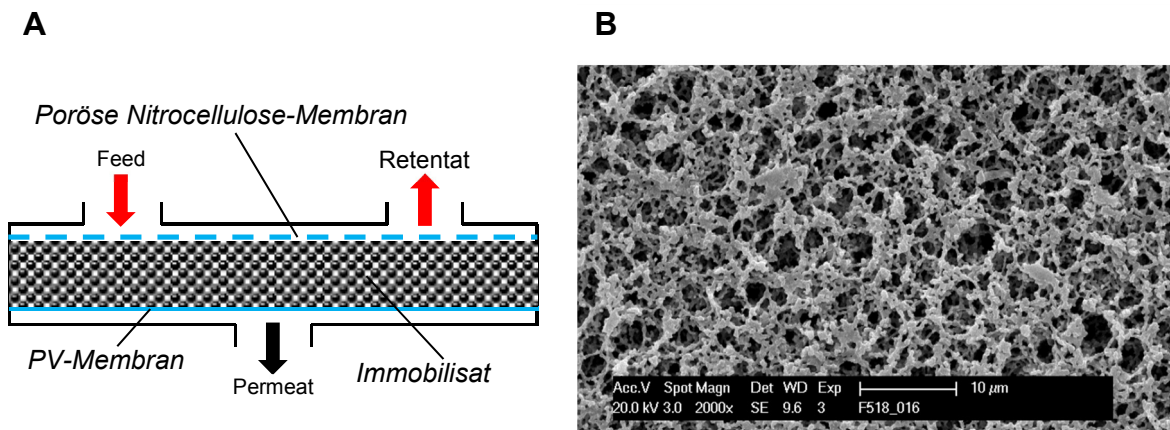


Abb. 5-22 (A) Schema des im PV-Modul untergebrachten Immobilisates;
(B) Rasterelektronenmikroskop Aufnahme der porösen Nitrocellulose-Membran

Im Betrieb mit der erhöhten Flussrate konnte schließlich heterogen produziertes und *in situ* abgetrenntes β -Ionon nachgewiesen werden (Abb. 5-23). Bereits in der ersten Permeatprobe wurde eine Produktkonzentration von etwa 5 mg/L gemessen, die eindeutig auf enzymatische Spaltung des Substrats zurückzuführen ist. Im Verlauf der folgenden Proben stieg die Konzentration weiter an. Allerdings wurde β -Ionon auch im Retentat nachgewiesen (Abb. 5-23 A). Die Konzentration ist dort zwar mit maximal 2,2 mg/L deutlich niedriger, allerdings ist anzumerken, dass das Gesamtretentatvolumen mit etwa 557 mL deutlich höher als das Gesamtpermeatvolumen mit 17,8 mL ist. Dies bedeutet, dass ein Teil des produzierten β -Ionons aufgrund der hohen Flussrate in das Retentat ausgetragen wird.

Weiterhin wurde festgestellt, dass der Großteil des im Retentat befindlichen β -Ionons nach 2 Stunden hergestellt ist. Die maximale Iononkonzentration im Permeat tritt hingegen frühestens nach 4 Stunden auf. Dies stellt zum einen eine Verzögerung gegenüber dem Retentat beim heterogenen Umsatz, aber auch eine deutliche Verzögerung gegenüber der Produktabtrennung im homogenen Ansatz dar (vgl. Abb. 5-21 A). Es wurde somit gezeigt, dass die heterogene Produktion von β -Ionon und dessen direkte Abtrennung mittels organophiler Pervaporation prinzipiell möglich sind, in der gewählten Anordnung allerdings auch gewisse Nachteile mit sich bringen.

Ambivalent ist hierbei besonders die hohe Flussrate. Sie ist einerseits nötig, um eine ausreichende Turbulenz zu erzeugen, um die Substratmizellen zum Enzym zu transportieren. Gleichzeitig führt die hohe Turbulenz allerdings auch dazu, dass das β -Ionon, obwohl es in der Nähe der Membran entsteht, wieder teilweise ins Retentat ausgetragen wird. Wenn die Flussrate reduziert wird, um diesen Austrag zu minimieren, wird gleichzeitig die Substratvermittlung an das Enzym erschwert und die β -Ionon Produktion kommt zum Erliegen. Der β -Ionon Austrag ins Retentat wird bei hoher Flussrate wahrscheinlich durch zwei weitere Effekte unterstützt. Sowohl die enzymatische Reaktion als auch die Diffusion in und durch die Pervaporationsmembran sind in diesem Zusammenhang limitierend. Eine potentiell höhere β -Ionon

Konzentration entsteht im PV-Modul deshalb nicht, das Produkt wird stattdessen in der Substratlösung verdünnt. Nachdem das β -Ionon ins Retentat ausgetragen wurde, hat es eine deutlich höhere Diffusionsbarriere zu überwinden als dies beim homogenen Umsatz der Fall ist. Dies führt wahrscheinlich zu den deutlich niedrigeren Permeatkonzentrationen und dem verzögerten Auftauchen im Permeat im Vergleich zur homogenen Reaktion.

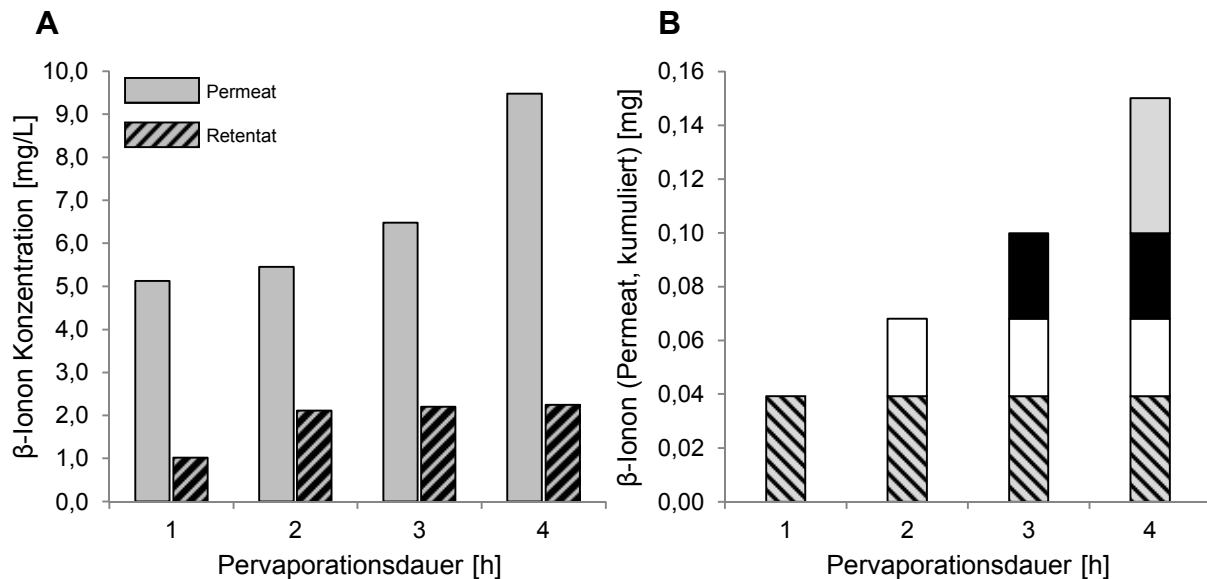


Abb. 5-23 Produktion und sofortige *in situ* Produktabtrennung von β -Ionon aus β -Apo-8'-carotenal mittels affinitätsimmobilisierter GST-AtCCD1

- (A) Aufkonzentrierung des β -Ionons im Permeat im Vergleich mit dem Retentat. Die Permeatproben wurden aus voneinander unabhängigen separaten Kühlfällen entnommen, Retentatproben wurden direkt aus dem Vorratsgefäß entnommen (vgl. Abb. 5-20).
- (B) Kumulierte β -Ionon Menge des Permeats. Die unterschiedlich gefüllten Balkenanteile repräsentieren die sukzessive ausgetauschten Kühlfällen.

Basierend auf den Ergebnissen sowohl zum heterogenen als auch zum homogenen Umsatz von β -Apo-8'-carotenal zu β -Ionon macht es Sinn, die GST-AtCCD1 durch Affinitätsanbindung zu immobilisieren und das Produkt mittels organophiler Pervaporation abzutrennen. Allerdings ist es nicht zwingend förderlich, das Immobilisat direkt an der Membran zu konzentrieren, weil dadurch zusätzliche Diffusionsbarrieren eingebaut werden. Es ist sehr wahrscheinlich vorteilhafter, das Immobilisat in einem separaten Reaktor suspendiert zu betreiben und die Reaktionslösung zur Produktabtrennung über die PV-Membran zu leiten. Dies führt zu einer schnelleren Produktgenerierung und zu weniger Diffusionslimitierungen bei der Abtrennung.

5.5.3 Zusammenfassung

In Abs. 5.5 wurde die Produktabtrennung von β -Ionon mittels organophiler Pervaporation untersucht. Dies geschah in einer Laboranlage mit einer PV-Membranfläche

von 0,0035 m² und einer G/V-1 Membran der Firma GMT Membrantechnik mit einer funktionalen Polymerschicht aus PDMS.

Zunächst wurde die generelle Pervaporierbarkeit des β -Ionons mit Modelllösungen bestehend aus Wasser, Ethanol als Cosolvens und β -Ionon sichergestellt. Es wurde ein Aufreinigungsfaktor von 17 erzielt.

Im nächsten Schritt wurde β -Apo-8'-carotenal in Triton X-100 Mizellen in homogener Lösung mit GST-AtCCD1 und 10% Ethanol als Cosolvens gespalten. Das entstehende β -Ionon konnte ebenfalls durch die Membran abgetrennt werden. Das mizellare System limitiert die maximale Substratkonzentration, so dass die hohen β -Ionon Konzentrationen der Modelllösungen nicht erreicht werden können. Weil dadurch die Triebkraft des Trennprozesses verringert wird, ist es als vielversprechendes Ergebnis zu deuten, dass auch enzymatisch produziertes β -Ionon mittels Pervaporation abgetrennt werden konnte. Auffällig ist, dass die auf Diffusion basierende Pervaporation eindeutig der limitierende Schritt in diesem enzymatischen Produktionsprozess ist. Es wurde deutlich, dass sich im Batch-Ansatz eine Zweistufigkeit des Prozesses ergibt. Die Carotinoidspaltung läuft als erstes ab, die Abtrennung des Produktes folgt zeitlich versetzt. Grund dafür ist wiederum die konzentrationsabhängige Triebkraft des Prozesses. Es muss eine ausreichende Produktmenge erzeugt worden sein, um eine effiziente Diffusion durch die Membran zu erlauben. Ebenso hat die Membran eine gewisse Aufnahmekapazität für das β -Ionon, was den Übergang ins Permeat verzögert.

Um die beschriebene Triebkraft in Form eines möglichst hohen Ionogradienten über der Membran zu maximieren, wurde ein GST-AtCCD1-Immobilisat direkt im PV-Modul auf die PV-Membran gegeben und mit einer porösen Nitrocellulose-Membran dort fixiert. Die Nitrocellulose-Membran war so gewählt, dass sie einerseits das Immobilisat zurückhält, gleichzeitig aber das Passieren der Substrat-Mizellen gewährleistet. Auch in diesem Ansatz wurde β -Ionon erfolgreich durch Carotinoidspaltung erzeugt und pervaporativ abgetrennt. Allerdings hat diese Anordnung einen Nachteil. Es ist ein hoher Volumenstrom erforderlich, um die nötige Turbulenz zu gewährleisten, durch welche die Mizellen durch die poröse Membran und auch durch das dort befindliche Immobilisat transportiert werden. Durch den hohen Volumenstrom reduziert sich allerdings die Verweilzeit im PV-Modul drastisch. Dies führt dazu, dass das Produkt ins Retentat ausgewaschen und verdünnt wird. Eine Reduktion der Flussrate umgeht dieses Problem nicht, weil in diesem Fall der Transport des Substrates zum Enzym zu langsam stattfindet. Nachdem das β -Ionon ausgetragen ist, hat es eine wesentlich höhere Diffusionsbarriere im PV-Modul zu überwinden als dies im homogenen Ansatz der Fall ist. Dies führt zu einer Verzögerung der β -Ionon Abtrennung.

Ein möglicher Ausweg besteht im Betrieb eines separaten Reaktors mit suspendiertem AtCCD1-Immobilisat und nachgeschaltet das Pervaporationsmodul zur Produkt-

abtrennung einzusetzen. Dies ermöglicht eine Wiederverwendung des Enzyms und reduziert gleichzeitig die meisten Diffusionsbarrieren. Eine schnellere Abtrennung des Aromastoffes wäre somit möglich.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Roth, ABCR (beide Karlsruhe), Sigma Aldrich, Fluka, Riedel de Haën (alle Taufkirchen) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Sie waren von höchster erwerbbarer Reinheit.

6.1.2 Medien und Puffer

Kultivierung und Zellaufschluss

LB-Medium	10 g/L Trypton 10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium 15 g/L Agar
TB-Medium	12 g/L Trypton 24 g/L Hefeextrakt 4 mL Glycerol 2,31 g/L KH_2PO_4 12,54 g/L K_2HPO_4
SOC-Medium	20 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 0,5 g/L NaCl 2,5 mM KCl 1 mM MgCl_2 2 mM D-Glucose
Minimalmedium	25,0 g/L Glucose 13,3 g/L KH_2PO_4 4,0 g/L $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ 1,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,7 g/L Zitronensäure

	8,4 mg/L EDTA
	2,5 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
	15,0 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
	1,5 mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	3,0 mg/L H_3BO_3
	2,5 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	17,0 mg/L ZnSO_4
	100,0 mg/L Fe(III)Citrat
	4,5 mg/L Thiamine·HCl
	0,1 mL/L Antifoam
	50 mg/L Ampicillin
Feed-Medium	285 g/L Glucose
	20,0 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	13,0 mg/L EDTA
	4,0 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
	23,5 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
	2,5 mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	5,0 mg/L H_3BO_3
	4,0 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	21,0 mg/L ZnSO_4
	40,0 mg/L Fe(III)Citrat
Tris/HCl-Puffer	20 mM Tris
	pH 7,4
PBS-Puffer	140 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na_2HPO_4
	1,8 mM KH_2PO_4
	pH 7,3

SDS-PAGE

5x Probenpuffer	0,25 M Tris
	0,5 M β -Mercaptoethanol
	10% (w/v) SDS
	0,5% (w/v) Bromphenolblau
	50% (v/v) Glycerin
	pH 6,8

Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8
Laufpuffer	0,125 M Tris 1,25 M Glycin 0,5% (w/v) SDS pH 8,3
Färbelösung	0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250 50% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	20% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure

Rückfaltung

Resuspensionspuffer:	50 mM Tris 50 mM NaCl 1 mM TCEP 0,5 mM EDTA 5% (w/v) Glycerol pH 8,0
Waschpuffer:	Resuspensionspuffer + 1% (w/v) Triton X-100
Denaturierungspuffer:	50 mM Tris 50 mM NaCl 5 mM TCEP 0,5 mM EDTA 5% (w/v) Glycerol pH 8,0
Dialysepuffer:	10 mM Tris 0,05 mM EDTA pH 8,0

Rückfaltungspuffer 1:	20 mM Tris, (pH 7,4)
Rückfaltungspuffer 2:	20 mM Tris, (pH 7,4) 20 μ M Fe(II)Cl ₂
Rückfaltungspuffer 3:	20 mM Tris, (pH 7,4) 20 μ M Fe(III)Cl ₃

His₆-Tag-Immobilisierung

Säulenvorbereitung	0,1 M NiSO ₄
Binde-/Waschpuffer	0,02 M Na ₂ HPO ₄ 0,5 M NaCl pH 7,4
Elutionspuffer	0,02 M Na ₂ HPO ₄ 0,5 M NaCl 0,5 M Imidazol pH 7,4
Nickelelution	0,05 M EDTA

GST-Tag-Immobilisierung

Binde-/Waschpuffer	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,3
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl 10 mM reduziertes Glutathion pH 8,0

6.1.3 Mikroorganismen

Escherichia coli BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt)

Escherichia coli DH5 α (Invitrogen, Karlsruhe)

6.1.4 Plasmide und Antibiotikakonzentrationen

pET29a 30 µg Kanamycin/mL LB-Medium/-Agar
pGEX-4-T 50 µg Ampicillin/mL LB-Medium/-Agar

6.1.5 Marker für SDS-Page

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher, USA)

6.1.6 Enzyme

Benzonase (Merck, Darmstadt)

Lysonase (Merck, Darmstadt)

6.1.7 Immobilisierungsmatrices

GST-Immobilisierung: Glutathion-Agarose (Sigma-Aldrich, USA)

His₆-Immobilisierung: HIS-Select™ Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich, USA)

6.1.8 Kommerzielle Kits

Proteinquantifizierung: BCA Protein Assay Reagent (Thermo Fisher, USA)

Roti-Quant, 5x Lösung (Carl Roth, Karlsruhe)

Plasmidpräparation: Genelute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, USA)

6.1.9 Geräte

Photometrische Messungen

Genios Mikrotiterplatten-Photometer (Tecan, Österreich)

Filter: 510nm, 560nm, 590nm

Software: Magellan 3.11 (Tecan, Österreich)

(nur Absorptionmessungen)

Infinite M200 Mikrotiterplatten-Photometer (Tecan, Österreich)

Software: Magellan 6,5 (Tecan, Österreich)

(Absorptions- und Fluoreszenzmessungen)

Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Steuereinheit: SCL-10A (Shimadzu, Japan)

Autosampler: SIL-10AD (Shimadzu, Japan)

Pumpen: 2x LC10AT (Shimadzu, Japan)

Detektoren:	SPD-M10A Diode-Array-Detector (Shimadzu, Japan) SPD-20A UV-Detector (Shimadzu, Japan) RID-10A Brechungsindex-Detektor (Shimadzu, Japan)
Ofen:	CTO-10AC (Shimadzu, Japan)
Vorsäulen:	C18 AllGuard, 7,5 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm (Alltech, USA), nur für Carotinoidanalytik Carbo-P Cartridge, 30 x 4,6 mm, Partikelgröße 2 µm (Bio-Rad, USA), nur für Alkoholanalytik
Säulen:	Prevail C18, 250 x 4,6 mm, Partikelgröße 10 µm (Alltech, USA), nur für Carotinoidanalytik Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, Partikelgröße 2 µm (Bio-Rad, USA), nur für Alkoholanalytik

Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS)

Chromatograph:	GC17A (Shimadzu, Japan)
SPME-Faser:	CAR-PDMS (Carboxene/PDMS), 75 µm (Supelco, USA)
Säule:	Valcobond VB-5 (5% Phenyl- / 95% Methylpolysiloxan, L = 30 m, Innendurchmesser = 0,25 mm, Film = 0,25 µm)

Zellkultivierung und Proteinexpression

Fermenter:	FedBatchPro (DASGIP, Jülich)
------------	------------------------------

Pervaporation

PV-Modul:	Spezialanfertigung (GKSS, Geesthacht)
Membran:	G/V-1, Membranfläche 0,0035 m ² (GMT Membrantechnik, Rheinfeldern)
Drucksensor:	Thyracont VD84 M (Thyracont Vacuum Instruments, Passau)
Kühlfallen:	Spezialanfertigung (KGW Isotherm, Karlsruhe)
Vakuumpumpe:	Edwards RV5 (Edwards, Kirchheim)
Software:	Thyracont VacuGraph 5.09 (Thyracont Vacuum Instruments, Passau)

Sonstige Geräte

Glucosemessung:	2700 Biochemistry Analyzer (Yellow Springs Instruments, USA)
Ultraschall-Sonotrode:	Branson Sonifier W-250 D (Emerson, USA)
Gelelektrophorese:	PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

Zentrifugen:	Mini-Protean 3 (Bio-Rad, USA) Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg) Sigma 6K15 (Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz) Centrikon H-401 (Kontron)
Lyophilisator:	P5 (Piatkowski Forschungsgeräte, München)
Thermomixer:	Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg)

6.1.10 Software

Geldokumentation:	BioDoc Analyze (Biometra, Göttingen)
Photometr. Messungen:	Magellan, Versionen 3.11 und 6.5 (Tecan, Österreich)
GC-MS:	GCMS solution, Version 1,20 (Shimadzu, Japan)
HPLC:	Class Vp, Version 6.14 (Shimadzu, Japan)
Pervaporatioin:	VacuGraph 5.09 (Thyracont Vacuum Instruments, Passau)
Datenauswertung:	Excel 2007 und 2010 (Microsoft, USA) Origin, Version 6.0 (OriginLab, USA) Prism, Version 5 (GraphPad, USA)

6.2 Methoden

6.2.1 Mikrobiologische Methoden

Plasmid-Transformation

Plasmide standen zu Beginn der Arbeiten in der Arbeitsgruppe zur Verfügung (Schilling 2008). Bei -80°C gelagerte *E. coli* BL21 (Novagen) wurden auf Eis aufgetaut und zu je 20 μL aliquotiert. 1 μL der jeweiligen Plasmidpräparation wurde zugegeben und ohne zu pipettieren vorsichtig vermischt. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden und eine erneute Abkühlung auf Eis für 2 Minuten. Zur Regeneration der Zellen wurde 200 μL SOC-Medium zugegeben und für eine Stunde bei 37°C im Thermomixer bei 200 rpm inkubiert. 20 μL dieser Transformationen wurden auf antibiotikahaltigem Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Plasmidisolierung

Zur Plasmidvermehrung wurden 5 mL *E. coli* DH5 α mit dem gewünschten Plasmid über Nacht in LB-Medium bei 300 rpm kultiviert. Die Isolierung von Plasmiden erfolgte mit Lösungen und nach Anleitung des Genelute Plasmid Miniprep Kits.

Glycerolkulturen

Für Glycerolkulturen wurden *E. coli* DH5 α in 5 mL LB-Medium bis zur exponentiellen Phase kultiviert. Je 900 μ L wurden in verschraubbare Kryogefäße aliquotiert, mit 100 μ L steriler Glycerol-Lösung (80% m/v) versetzt und intensiv gemischt. Danach wurden die Zellen für 2 Minuten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Zellen dienten für erneute Plasmidpräparationen.

6.2.2 *Proteinexpression und -analyse*

Expression im Erlenmeyerkolben

E. coli BL21 wurden vor der Expression frisch transformiert. 20 mL antibiotikahaltiges LB-Medium wurde in einem 100 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und bei 37°C und 300 rpm als Vorkultur für etwa 6 Stunden inkubiert. Danach wurde die Vorkultur in einem 2-L Erlenmeyerkolben in der Menge verdünnt, so dass sich bei einem Gesamtvolumen von 400 mL antibiotikahaltigem LB-Medium eine initiale OD₆₀₀ von 0,1 ergab. Es wurde weiter bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 wurde die Expression mit 0,2 mM IPTG induziert und für 12 Stunden bei 20°C und 300 rpm fortgeführt.

Nach Beendigung der Expression wurden je 50 mL in Falcon-Gefäße überführt, für 20 Minuten bei 5000g zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Sofern mehrere Kolben parallel inkubiert worden waren, wurden die Inhalte vor der Aliquotierung vereinigt, um die Gleichheit der resultierenden Pellets zu gewährleisten. Da insbesondere für die Pervaporationsversuche größere Enzymmengen nötig waren, wurde hier leicht modifiziert vorgegangen: 400 mL zellhaltige Expressionslösung wurden in 400 mL Zentrifugationsgefäße überführt, bei 5000g für 20 Minuten zentrifugiert, das Pellet auf Eis erneut in 40 mL Tris-Puffer (20 mM) resuspendiert und nochmals in Falcon-Gefäßen für 20 Minuten bei 5000g pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert.

Hochzelldichtekultivierung und Proteinexpression

Vor Beginn der Hochzelldichtekultivierung im DASGIP-Parallelermenter System wurden die Sauerstoff- und pH-Sonden kalibriert. *E. coli* BL21 wurden mit dem GST-AtCCD1 tragenden pGEX-4T Plasmid frisch transformiert. Mit einer Kolonie wurde eine 40 mL Vorkultur in einem 200 mL Schüttelkolben angeimpft und für 5 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden 4 Parallelreaktoren mit jeweils 10 mL der Vorkultur angeimpft.

Die 3 im Fed-Batch betriebenen Reaktoren wurden mit 150 mL Glucoseminimalmedium gestartet und der Feed bis zum Endvolumen von 250 mL aufrechterhalten. Die Zugaberate des Feed-Mediums wurde anhand regelmäßiger Probennahme und Bestimmung der Glucosekonzentration auf die aktuelle Verbrauchsrate im Reaktor nachgeregelt. Die Regulierung der Drehzahl zur Aufrechterhaltung einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 100% Luftsättigung und die Laugendosierung zur Stabilisierung des pH-Wertes bei 7,0 erfolgten automatisch. Im späteren Kultivierungsverlauf wurde reiner Sauerstoff zugeführt, da die maximale Drehzahl erreicht war. Die Kultivierungstemperatur lag bei 25°C. Die Induktion erfolgte mit 0,2 mM IPTG bezogen auf das Endvolumen von 250 mL.

Im Vergleichsreaktor wurden 240 mL LB-Medium mit 10 mL der Vorkultur angeimpft und bei 25°C und konstanten 1000 rpm gerührt. Eine pH-Regelung und ein Feed erfolgten nicht. Ebenso erfolgte keine aktive Belüftung.

Die Isolierung Lagerung der Zellen erfolgte analog dem Vorgehen bei der Expression im Erlenmeyerkolben.

Proteinaufarbeitung

Die bei -20°C gelagerten *E. coli* BL21 Pellets wurden in Tris-Puffer (20 mM, pH 7,4) auf Eis aufgetaut und resuspendiert. Die Puffermenge wurde so gewählt, dass eine 10-fache Aufkonzentrierung der Zellen im Vergleich zur Kultur erzielt wurde. Die Zellen wurden nach Zugabe von 1 mM PMSF mittels Ultraschall aufgeschlossen. Hierfür kam ein Branson-Sonifier mit einer Spitze von 5 mm Durchmesser und einer Amplitude von 20% zum Einsatz. Es wurde bei ständiger Kühlung durch ein Eisbad für 2 Minuten sonifiziert, wobei nach 0,5 Sekunden Beschallung 0,8 Sekunden pausiert wurde. Das Aufschlussvolumen überstieg niemals 20 mL. Für einfache Rohextrakte wurde dem Zellaufschluss vor der Sonifikation 1% (w/v) Triton X-100 zugefügt und nach dem Aufschluss für 15 Minuten bei 20°C und 150 rpm inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer für 10 Minuten bei 13.000g abzentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

In einigen Versuchen wurde der Einfluss des Energieeintrags beim Zellaufschluss auf die Proteinimmobilisierung untersucht. In diesem Fall blieb das Verfahren wie beschrieben, lediglich die Amplitude wurde für die betreffenden Ansätze auf 10% reduziert.

Wurde partiell gereinigte AtCCD1 benötigt, wurde dem Aufschluss kein Triton X-100 zugefügt. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer wurde der Überstand verworfen und das Pellet im ursprünglichen Aufschlussvolumen Tris-Puffer (20 mM, pH 7,4) mit 1% (w/v) Triton X-100 resuspendiert und für 15 Minuten bei 20°C und 150 rpm inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (13.000g, 10 Minuten) wurde das Pellet verworfen und der Überstand weiter verwendet.

Sofern Lyophilisate benötigt wurden, wurde die Enzymlösung zu je 200 µL aliquotiert, für 2 Minuten in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für 48 Stunden bei 0,2 mbar lyophilisiert. Der Probenhalter war auf -80°C vorgekühlt.

Rückfaltung

Native AtCCD1 beinhaltende *E. coli* BL21 aus 100 mL LB-Kultur wurden in 20 mL Resuspensionspuffer gelöst, mit 20 µL Lysonase versetzt, 15 Minuten bei 20°C leicht geschüttelt und anschließend per Ultraschall im Eisbad aufgeschlossen. 1% (w/v) Triton X-100 wurde zugegeben und nochmals für 15 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation bei 8000g für 15 Minuten bei 10°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet erneut in Waschpuffer resuspendiert. Zentrifugation und Waschen wurden 4x wiederholt. Die Waschschrte ab der zweiten Wiederholung erfolgten zum Auswaschen des Tritons X-100 mit Resuspensionspuffer. *Inclusion body* Pellets wurden gewogen und bei -80°C gelagert.

Nach der Isolierung der *inclusion bodies* wurden diese denaturiert. Hierfür wurden pro 0,5 g Feuchtmasse 10 mL Denaturierungspuffer zugegeben, kurz sonifiziert bis die Lösung homogen war und im Anschluss pro 0,5 g Feuchtmasse 1,75 mL 30% N-Lauroylsarcosin zugegeben. Bei 20°C und leichtem Schütteln wurde für eine Stunde inkubiert. Die jetzt aufgeklärte Lösung wurde durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert und gegen Dialysepuffer für 2 x 4 Stunden bei einer Rückhaltegrenze von 3,7 kDa dialysiert. Nachdem die Konzentration der *inclusion bodies* per BCA-Assay bestimmt worden war, wurden 50% der Lösung auf 1 mg/mL verdünnt und die anderen 50% unverdünnt weiterverwendet.

Zur Initiation des *refolding* wurden 50 µL der Proteinlösung per *flash dilution* in 450 µL des entsprechenden Rückfaltungspuffers verdünnt und bei 20°C und 200 rpm für 12 Stunden inkubiert. Sofern der Cofactor Eisen erst nach dem Rückfalten zugegeben wurde, so wurden 490 µL rückgefalteten Proteins mit 10 µL einer frischen 1 mM Fe(II)Cl₂- oder Fe(III)Cl₃-Lösung versetzt.

Die Aktivität der rückgefalteten Enzyme wurde mithilfe des Standardassays und anschließender SPME-GC-MS Analyse untersucht.

SDS-PAGE

Zur Analyse unterschiedlicher Enzympräparate wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und gefärbt. Es wurden 10% SDS-Polyacrylamidgele eingesetzt. Der Proteingehalt der Präparate wurde vorher bestimmt und bei Bedarf auf die gleiche Gesamtproteinkonzentration normiert. Zu analysierende Zellpellets wurden im ursprünglichen Volumen Tris-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden mit 5-fach Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C und langsamem Schütteln inkubiert und da-

nach kurz anzentrifugiert, um Kondensat am Gefäßdeckel zu sammeln. Die Auftrennung erfolgte mit 10 µL / Geltasche für 2 Stunden bei 140 V. Die Gele wurden unter leichtem Schütteln für 1 Stunde mit Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend für mindestens 1 Stunde und mehrmaligem Wechsel der Lösung entfärbt.

Sofern densitometrische Analysen geplant waren, wurden 5 Taschen der Gele mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen befüllt und damit die Linearität der densitometrischen Messung gewährleistet. Der densitometrisch bestimmte Zielprotein-Anteil wurde mit der mittels BCA- oder Bradford-Assay bestimmten Gesamtproteinkonzentration multipliziert und ergab die Konzentration des Zielproteins.

Zusammensetzung der SDS-PA-Gele (10%):

Sammelgel:

Poly-/Bisacrylamid (29:1, 40%)	0,83 mL
Puffer	1,67 mL
H ₂ O	3,77 mL
10% SDS	67 µL
1,5% APS	333 µL
TEMED	5 µL

Trenngel (10%):

Poly-/Bisacrylamid (29:1, 40%)	2,5 mL
Puffer	1,25 mL
H ₂ O	5,645 mL
10% SDS	100 µL
1,5% APS	500 µL
TEMED	5 µL

Proteinkonzentrationsbestimmung

Bei tensidhaltigen Proteinlösungen wurde zur Proteinkonzentrationsbestimmung ein kommerzieller Bicinchoninsäure-Assay (BCA) im Mikrotiterplattenformat eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach beiliegender Anweisung. Rinderserumalbumin (BSA) wurde in Konzentrationen zwischen 0 und 2 mg/mL zur Kalibrierung bei jedem Ansatz mitgeführt. Es wurden immer mindestens Dreifachbestimmungen gemessen.

Zur Quantifizierung Glutathion-haltiger Proteinlösungen wurde ein kommerzielles Bradford-Reagenz (Roti-Quant) eingesetzt, da der BCA-Assay empfindlich gegenüber reduziertem Glutathion ist. Die Durchführung erfolgte im Mikrotiterplattenformat in mindestens Dreifachbestimmung nach beiliegender Anleitung. In Vorversuchen wurde sichergestellt, dass Glutathion die Messung nicht verfälscht. Auch hier wurde

BSA bei jedem Ansatz zur Kalibrierung, allerdings im Konzentrationsbereich von 0 bis 100 µg/mL, mitgeführt.

6.2.3 Proteinimmobilisierung

Sol-Gele

Zur Solherstellung wurden die Silane TMOS, MTMS, ETMS, PTMS und 3-APTES eingesetzt. Die Gesamtsilanstoffmenge betrug jeweils 15 mmol und wurde bei Verwendung von mehr als einer Komponente prozentual aufgeteilt. Diese Mischung wurde mit 146 mmol H₂O (pH 7,0) und 19 mmol H₂O (pH 2,8) versetzt und bis zum Auflösen der zwei Phasen bei 20°C und 500 rpm geschüttelt. Nach Entstehen einer homogenen Phase, wurde das Gefäß geöffnet und für weitere 15 Minuten zum Abdampfen des entstandenen Methanols geschüttelt. 150 µL des so entstandenen Sols wurden mit 150 µL Enzymlösung (vgl. Proteinaufarbeitung) intensiv vermischt und 200 µL dieses Gemisches in verschlossenen Glasvials (4 mL) für 12 Stunden bei 4°C polymerisiert.

Vor jeder Aktivitätsmessung wurden die Gelmonolithe gewaschen:

- 2x Tris, 20 mM, pH 7,4, je 2 mL
- 1x Tris, 20 mM, pH 7,4, 1% (w/v) Triton X-100, 2 mL, 100 rpm für 2 Stunden
- 2x Tris, 20 mM, pH 7,4, je 2 mL

Für die Quantifizierung des ausgewaschenen Proteins wurden je 1 mL der jeweiligen Waschlösung direkt nach dem Polymerisieren zum Gel gegeben und bei 30°C unterschiedlich lang bei 300 rpm inkubiert. Die Waschlösungen wurden abgenommen, 1 Minute bei 13.000g zentrifugiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und 48 Stunden lyophilisiert. Nach Resuspension der Lyophilisate in 200 µL Puffer wurden die Proteinkonzentrationen mittels BCA-Assay ermittelt.

Affinitätsimmobilisierung

Die AtCCD1-haltigen Zellpellets wurden im entsprechenden Bindepuffer standardmäßig aufgeschlossen. Bei beiden Immobilisierungsmethoden wurde 1 mM PMSF zugegeben. Triton X-100 wurde für die GST-Immobilisierung auf 1% (w/v) und für die His₆-Immobilisierung auf 0,4% (w/v) zugegeben.

Die Matrices wurden nach Herstellerangaben equilibriert und 50 µL oder 100 µL Matrix für die Immobilisierung aliquotiert. Eine Immobilisierungsrunde fand mit 200 µL Proteinlösung / 25 µL Matrix und für 2 Minuten bei vorsichtigem manuellem Mischen statt. Wurde die Matrix mehrfach beladen, so wurde die nicht gebundene Proteinfrak-

tion (NGP) nach Abzentrifugation der Matrix auf Eis aufbewahrt und die Matrix währenddessen mit 2x 1 mL des entsprechenden Bindepuffers gewaschen. Anschließend wurde die NGP in gleichen Volumina wieder zur Matrix gegeben.

Sofern das immobilisierte Protein für Quantifizierungen wieder eluiert werden sollte, wurde 2 x mit je 50 μ L des entsprechenden Elutionspuffers eluiert und die beiden Fraktionen vereinigt.

6.2.4 Substratvermittlung & Aktivitätsmessungen

Aktivitätsmessungen der AtCCD1 wurden im Mikrotiterplattenformat oder insbesondere bei Einsatz von Immobilisaten in Eppendorfgefäßen oder Glasvials durchgeführt. Die Analyse des Reaktionsfortschritts erfolgte somit entweder photometrisch oder nach Probennahme mittels HPLC oder GC-MS.

In jedem Fall wurde die mizellare Substratlösung gesondert vorbereitet und zu Reaktionsbeginn mit der Enzymlösung gemischt. Dabei wurde die Carotinoid-Stammlösung 10-fach konzentriert angesetzt, so dass die Menge der Enzymlösung variiert werden konnte. Ein typischer Reaktionsansatz mit 100 μ L in der Mikrotiterplatte bestand aus (v/v):

10 %	10x Carotinoid-Stammlösung	} Mizellare Substratlösung
60 \pm x %	Puffer (Tris, PBS)	
10 %	Ethanol	
20 \pm x %	Enzymlösung	

Die 10x Carotinoid-Stammlösung wurde wie folgt angesetzt:

β -Apo-8'-carotenal wurde in THF gelöst (12,5 mM). 1 mL dieser Lösung wurde in einem 10 mL Messkolben mit 995 mg Triton X-100 gemischt und das THF anschließend durch 20 Minuten Stickstoffbegasung und 20 Minuten Vakuum (0,2 mbar) verdampft. Das Carotinoid liegt danach im Triton X-100 gelöst vor. Durch Auffüllen auf 10 mL mit Puffer und intensivem vortexen wird die homogene mizellare Lösung erzeugt.

Sofern Immobilisat verwendet wurde, wurde die Puffermenge auf 80% erhöht und die beiden anderen Komponenten der mizellaren Substratlösung bei je 10% belassen.

Im Fall der Sol-Gele wurden 500 μ L Substratlösung pro Gel und im Fall der Affinitätsimmobilisate 1 mL Substratlösung pro Ansatz eingesetzt. Die Inkubation erfolgte immer bei 30°C. Affinitätsimmobilisate wurden in Eppendorf-Gefäßen bei 1400 rpm geschüttelt.

Die Substratlösungen für die Pervaporationsversuche wurden in gleichen Verhältnissen und Konzentrationen hergestellt wie oben dargestellt. Allerdings wurden hier Volumina von bis zu einem Liter hergestellt.

6.2.5 Pervaporation

Experimentelles

Als PV-Modul für die Pervaporation wurde eine Sonderanfertigung des GKSS Forschungszentrums Geesthacht (seit November 2010 Helmholtzzentrum Geesthacht) verwendet. Die verwendete PV-Membran (G/V-1, GMT Membrantechnik) hatte eine Fläche von 0,0035 m².

Vor Beginn der Versuche wurde die Anlage für 1 h bei 30°C mit destilliertem Wasser betrieben, um die Membran zu quellen, Schmutz zu beseitigen und Leitungen zu temperieren. Die Bauteile der Anlage waren so optimiert worden, dass der Unterdruck auf der Permeatseite unter 0,1 mbar lag. Der Druckverlauf wurde über die komplette Prozessdauer aufgezeichnet. Die Masse der trockenen Kühlfalle wurde zu Beginn notiert.

Bei Probennahme wurden 1-5 mL aus dem Retentat-Vorratsgefäß entnommen und per HPLC vermessen. Danach wurde die Kühlfalle durch Ventile isoliert, aus dem flüssigen Stickstoff genommen, verschlossen und unter fließendem Wasser von außen aufgetaut. Die Permeatmasse wurde durch erneutes Wiegen bestimmt. Um das im Inneren der Kühlfalle noch gefrorene Permeat zwecks genauer Konzentrationsbestimmungen vollständig aufzutauen, wurden ein paar Milliliter Methanol zugegeben und dessen Masse ebenfalls durch Wiegen festgehalten. Das Permeat wurde per HPLC oder GC vermessen.

Datenauswertung

Im Folgenden ist die Berechnung der Produktkonzentration beschrieben. Die Konzentration des β -Ionons im Permeat $c_{\text{Ionon},P}$ kann nicht direkt gemessen werden, weil Methanol zum vollständigen Auftauen der Permeatmasse und zur genaueren Messung zugegeben wird. Sie berechnet sich deshalb aus der gemessenen β -Iononkonzentration nach Methanolzugabe $c_{\text{Ionon},P+\text{MeOH}}$, dem Permeatvolumen V_P und dem zugegebenen Methanolvolumen V_{MeOH} , welches sich aus der Methanolmasse und -dichte (0,793 g/cm³) ergibt:

$$c_{\text{Ionon},P} = \frac{c_{\text{Ionon},P+\text{MeOH}} \cdot (V_P + V_{\text{MeOH}})}{V_P} \quad (\text{Gl. 6.1})$$

Das erforderliche Permeatvolumen V_P ergibt sich aus der Permeatmasse m_P und -dichte ρ_P :

$$V_P = \frac{m_P}{\rho_P} \quad (\text{Gl. 6.2})$$

Die benötigte Permeatdichte ρ_P wurde mithilfe eines Iterationsverfahrens (Lapostolet-Resch 2001) approximiert:

$$\rho_P = \frac{1}{\frac{m_{EtOH,P}}{m_P} \cdot \frac{1}{\rho_{EtOH}} + \frac{m_P - m_{EtOH,P}}{m_P}} \quad (\text{Gl. 6.3})$$

Während die Permeatmasse m_P und die Ethanoldichte ρ_{EtOH} ($= 0,789 \text{ g/cm}^3$) bekannt sind, wird die Ethanolmasse im Permeat $m_{EtOH,P}$ ebenfalls iterativ über die Konzentration des Ethanols im Permeat $c_{EtOH,P}$ bestimmt (Lapostolet-Resch 2001):

$$c_{EtOH,P} = \frac{c_{EtOH,P+MeOH} \cdot \left(\frac{m_P}{\rho_P} + \frac{m_{MeOH}}{\rho_{MeOH}} \right)}{\frac{m_P}{\rho_P}} \quad (\text{Gl. 6.4})$$

Daraus ergibt sich:

$$m_{EtOH,P} = c_{EtOH,P} \cdot m_P \quad (\text{Gl. 6.5})$$

Im ersten Iterationsschritt wird die Ethanolkonzentration im Permeat $c_{EtOH,P}$ mit einer angenommenen Permeatdichte von $\rho_P = 1 \text{ kg/L}$ nach (Gl. 6.4) berechnet. Nach Berechnung der Ethanolmasse im Permeat mittels (Gl. 6.5) kann diese nun für eine genauere Berechnung der Permeatdichte ρ_P in (Gl. 6.3) eingesetzt werden. Diese Iteration wird wiederholt bis die Änderung der Permeatdichte weniger als 1% beträgt. Mit der Permeatdichte kann das Permeatvolumen nach (Gl. 6.2) und somit die Konzentration von β -Ionon nach (Gl. 6.1) berechnet werden.

6.2.6 Analytik

Photometrische Messungen

Die auf der Absorption des Substrates basierenden photometrischen Aktivitätsassays wurden im Mikrotiterplattenformat mit einem Reaktionsvolumen von $100 \mu\text{L}$ in mindestens Dreifachbestimmung bei 30°C durchgeführt. Als Kontrollen wurden Proben mit Leervektorextrakt statt der eigentlichen Enzymlösung mitgeführt, um Autooxidationseffekte zu kompensieren. Der Effekt von präzipitierenden Komponenten wurde durch eine Kontrolle ohne Substrat kompensiert. Die beiden Kontrollen wurden punktweise von der Probe abgezogen und die Substratabnahme anhand einer Kalibrierkurve aus der photometrischen Messung berechnet. Die Absorption wurde bei 510 nm gemessen. Eine Verschiebung aus dem Absorptionsmaximum bei 460 nm ist

nötig, weil der entstehende Dialdehyd auch noch in diesem Bereich absorbiert und so die Messung verfälschen würde.

Die Fluoreszenzmessungen wurden ebenfalls in der Mikrotiterplatte bei ansonsten gleichen Bedingungen wie die Absorptionsmessungen durchgeführt. Bauartbedingt erfolgte die Anregung von unterhalb und die Detektion von oberhalb der Platte. Die Wellenlängen wurden zur Optimumsfindung variiert. Optimale Wellenlängen für den entstehenden Dialdehyden waren 425 nm zur Anregung und 610 nm für die Emission.

Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Proben für die GC-MS wurden mit Chloroform extrahiert, 5-fach konzentriert und mit Na₂SO₄ getrocknet. Bei Bedarf wurde zur qualitativen Identifikation von kleinen Produktmengen eine PDMS-SPME Faser verwendet. Hierfür wurde die Faser mit der Gasphase der Probe für 15 Minuten bei 40°C in Kontakt gebracht. Die Identifikation von β -Ionon fand mithilfe eines Standards, der entsprechenden Retentionszeit sowie dem Vergleich des Massenspektrums mit einer internen Bibliothek statt. Die Messparameter waren:

Injektionsvolumen:	2 μ L
Injektionstemperatur:	270°C
Split-Ratio (nicht bei SPME):	1:10
Temperaturprogramm Ofen:	80°C, linearer Gradient auf 160°C bei +6°C/Min, 160°C, 2 Min., linearer Gradient auf 325°C bei +50°C/Min, 325°C, 1 Min.
GC-MS Interfacetemperatur:	280°C
Scanbereich:	35-350 m/z

Festphasenmikroextraktion (*solid phase microextraction* - SPME)

Sofern eine SPME-Analyse geplant war, wurden Umsätze in 4 mL HPLC-Glasvials mit perforierbarem PTFE-Septum für die Umsätze verwendet. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Septum mit der Faser durchstoßen und eine Adsorption für 15 Minuten bei 40°C (Wasserbad) durchgeführt. Die Desorption im GC-MS Injektor dauerte 5 Minuten bei ansonsten gleichem Vorgehen wie bei der oben beschriebenen GC-MS Analytik.

Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Auftrennung und Analyse der entstehenden Carotinoid-Spaltprodukte und insbesondere bei der Verwendung von Immobilisaten wurde der Reaktionsumsatz mittels HPLC analysiert. Die Immobilisate wurden durch Zentrifugation (1 Min, 13.000g) abgetrennt und die Überstände analysiert. Für die Auswertung der Pervaporationsversuche, wurde eine Ethanol- und Methanolquantifizierung mittels HPLC durchgeführt. Kalibrierungen wurden mithilfe von externen Standards durchgeführt und regelmäßig überprüft.

Messparameter Carotinoide und β -Ionon:

Fluss:	1,5 mL/Min
Säulentemperatur:	31°C
Injektionsmenge:	10 μ L
DAD-Messbereich:	190-800 nm
UV-Detektor:	300 nm
Laufmittel:	0-5 Min: 80% MeOH / 20% H ₂ O 5-15 Min: 85% Acetonitril / 10% MeOH / 5% Isopropanol 15-28 Min: 80% MeOH / 20% H ₂ O

Messparameter Ethanol und Methanol:

Fluss:	0,6 mL/Min
Säulentemperatur:	27°C
Injektionsmenge:	10 μ L
Detektionsmethode:	Brechungsindex
Laufmittel:	0-20 Min: H ₂ SO ₄ (3 mM)

Rasterelektronenmikroskopie

Die Mikrostruktur der unterschiedlichen Sol-Gele wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Hierfür wurden Tropfen des flüssigen Sols auf ein Deckglas aufgebracht und unter Standardbedingungen polymerisiert. Anschließend wurden sie mittels Vakuum-Kohlenstoffbedampfung beschichtet und im REM untersucht. Im Fall der auf PV-Membranen polymerisierten Gele wurden diese Membranen in flüssigem Stickstoff gefroren, gebrochen und anschließend die Bruchkanten im REM analysiert.

Derivatisierung des C17-Dialdehyden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

2,4-Dinitrophenylhydrazin wurde bis zur Sättigung in Methanol gelöst, welches mit 3,5% (v/v) konzentrierter Salzsäure versetzt war. 100 µL dieser Lösung wurden mit 100 µL umgesetzter mizellarer Carotinoidlösung gemischt und für eine Stunde bei 50 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Das so entstehende Hydrazon wurde 3 mal mit 400 µL Pentan extrahiert. Nach Evaporation des Pentans wurde das Produkt in 100 µL Chloroform gelöst und per HPLC untersucht.

7 Literatur

- Alexandre, T., Rehbock, S. und Blümke, W. (2000).** Study of pervaporation to recover 2-phenylethanol from a life bioreactor. Poster, EMS XVI Annual Summer School - 23.-28. August, 1999, Veszprem, Hungary
- Allison, S. D., Dong, A. und Carpenter, J. F. (1996).** Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying, and rehydration. *Biophys J* 71(4): 2022-2032.
- Andreescu, S., Bucur, B. und Marty, J.-L. (2006).** Affinity immobilization of tagged enzymes (in: Immobilization of enzymes and cells). J. M. Guisan, Humana Press. 22: 97-106.
- Arakawa, T. und Timasheff, S. N. (1985).** Mechanism of polyethylene glycol interaction with proteins. *Biochemistry* 24(24): 6756-6762.
- Auldridge, M. E., Block, A., Vogel, J. T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, M., DellaPenna, D., McCarty, D. R. und Klee, H. J. (2006a).** Characterization of three members of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant J* 45(6): 982-993.
- Auldridge, M. E., McCarty, D. R. und Klee, H. J. (2006b).** Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* 9(3): 315-321.
- Baker, R. W. (2007).** Membrane technology and applications. Wiley, Chichester [u.a.]
- Ben Aziz, A., Grossman, S., Ascarelli, I. und Budowski, P. (1971).** Carotene-bleaching activities of lipoxygenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method. *Phytochemistry* 10: 1445-1452.
- Bengtson, G. und Bøddeker, K. W. (1995).** Extraction of bioproducts with homogeneous membranes (in: Bioflavour 95: biocalalysts for flavour production). P. Etievant and P. Schreier, INRA Editions Route de St. Cyr 78026 Versailles Cedex France: 393-403.
- Betancor, L., López-Gallego, F., Alonso-Morales, N., Dellamora, G., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R. und Guisan, J. M. (2006).** Glutaraldehyde in protein immobilization (in: Immobilization of enzymes and cells). J. M. Guisan, Humana Press. 22: 57-64.
- Bettermann, H., Bienioschek, M., Ippendorf, H. und Martin, H.-D. (1993).** Dual fluorescence of diapocarotenoids. *J Luminescence* 55(2): 63-70.
- Block, H., Maertens, B., Priestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. und Schäfer, F. (2009).** Chapter 27: Immobilized metal affinity

- chromatography (IMAC): a review (in: Methods in Enzymology). R. B. Richard and P. D. Murray, Academic Press. Volume 463: 439-473.
- Bluemke, W. und Schrader, J. (2001).** Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavors and fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. *Biomol Eng* 17: 137-142.
- Boccazzi, P., Zanzotto, A., Szita, N., Bhattacharya, S., Jensen, K. F. und Sinskey, A. J. (2005).** Gene expression analysis of *Escherichia coli* grown in miniaturized bioreactor platforms for high-throughput analysis of growth and genomic data. *Appl Microbiol Biotechnol* 68(4): 518-532.
- Bolto, B., Hoang, M. und Xie, Z. (2011).** A review of membrane selection for the dehydration of aqueous ethanol by pervaporation. *Chem Eng Process: Process Intensif* 50(3): 227-235.
- Booth, P. J. und Curran, A. R. (1999).** Membrane protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 9(1): 115-121.
- Bouvier, F., Dogbo, O. und Camara, B. (2003a).** Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment Bixin (Annatto). *Science* 300(5628): 2089-2091.
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J. und Camara, B. (2003b).** Oxidative Remodeling of Chromoplast Carotenoids: Identification of the Carotenoid Dioxygenase CsCCD and CsZCD Genes Involved in *Crocus* Secondary metabolite Biogenesis. *Plant Cell* 15: 47-62.
- Brady, D., Jordaan, J., Simpson, C., Chetty, A., Arumugam, C. und Moolman, F. S. (2008).** Spherezymes: a novel structured self-immobilisation enzyme technology. *BMC Biotechnol* 8: 8.
- Brena, B. M. und Batista-Viera, F. (2006).** Immobilization of enzymes: a literature survey (in: Immobilization of enzymes and cells). J. M. Guisan, Humana Press. 22: 15-30.
- Brinck, J., Jönsson, B. und Tiberg, F. (1998).** Kinetics of nonionic surfactant adsorption and desorption at the silica-water interface: One component. *Langmuir* 14(5): 1058-1071.
- Britton, G. (1995).** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb J* 9(15): 1551-1558.
- Bruns, N. und Tiller, J. C. (2005).** Amphiphilic network as nanoreactor for enzymes in organic solvents. *Nano Lett* 5(1): 45-48.
- Buchholz, K., Kasche, V. und Bornscheuer, U. T. (2005).** Biocatalysts and enzyme technology. Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim
- Burgess, R. R. (2009).** Chapter 17 - Refolding solubilized inclusion body proteins (in: Methods in enzymology). Academic Press. Volume 463: 259-282.

- Burrows, C. J., Muller, J. G., Poulter, G. T. und Rokita, S. E. (1996).** Nickel-catalyzed oxidations: from hydrocarbons to DNA. *Acta Chem Scand* 50(4): 337-344.
- Cabiscol, E., Tamarit, J. und Ros, J. (2000).** Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3(1): 3-8.
- Cabral, J. M. und Kennedy, J. F. (1991).** Covalent and coordination immobilization of proteins (in: *Protein immobilization. Fundamentals and applications*). R. F. Taylor. New York, NY, Marcel Dekker. 14: 73-138.
- Carpenter, J. F. und Crowe, J. H. (1988).** The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25(3): 244-255.
- Chaga, G. S. (2001).** Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *J Biochem Biophys Meth* 49(1-3): 313-334.
- Cheng, L. C., Hor, L. I., Wu, J. Y. und Chen, T. L. (2003).** Effect of specific growth rate on the production of a recombinant nuclease by *Escherichia coli*. *Biochem Eng J* 14(2): 101-107.
- Choi, J. H., Keum, K. C. und Lee, S. Y. (2006).** Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem Eng Sci* 61(3): 876-885.
- Cleland, J. L., Powell, M. F. und Shire, S. J. (1993).** The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 10(4): 307-377.
- Creighton, T. E. (1990).** Process for the production of a protein, U.S. Patent 4977248.
- Cunningham, F. X., Jr. und Gantt, E. (1998).** Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev: Plant Physiol Mol Biol* 49: 557-583.
- Dashivets, T., Wood, N., Hergersberg, C., Buchner, J. und Haslbeck, M. (2009).** Rapid matrix-assisted refolding of histidine-tagged proteins. *Chem Biochem* 10(5): 869-876.
- Dekel, E. und Alon, U. (2005).** Optimality and evolutionary tuning of the expression level of a protein. *Nature* 436(7050): 588-592.
- Dogbo, O. und Camara, B. (1987).** Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Lipids Lipid Metabol* 920(2): 140-148.
- Drauz, K. und Waldmann, H. (2002).** *Enzyme catalysis in organic synthesis: a comprehensive handbook*. Wiley VCH Verlag GmbH

- Duilio, A., Tutino, M. L. und Marino, G. (2004).** Recombinant protein production in antarctic gram-negative bacteria. *Methods Mol Biol* 267: 225-237.
- Edwards, N., Beeton, S., Bull, A. T. und Merchuk, J. C. (1989).** A novel device for the assessment of shear effects on suspended microbial cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 30(2): 190-195.
- El Rassy, H., Buisson, P., Bouali, B., Perrard, A. und Pierre, A. C. (2002).** Surface characterization of silica aerogels with different proportions of hydrophobic groups, dried by the CO₂ supercritical method. *Langmuir* 19(2): 358-363.
- Erdodi, G. und Kennedy, J. P. (2006).** Amphiphilic conetworks: definition, synthesis, applications. *Prog Polym Sci* 31(1): 1-18.
- Esposito, D. und Chatterjee, D. K. (2006).** Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr Opin Biotechnol* 17(4): 353-358.
- Etschmann, M. M., Sell, D. und Schrader, J. (2005).** Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation. *Biotechnol Bioeng* 92(5): 624-634.
- Etschmann, M. M. W. (2004).** Entwicklung eines integrierten Verfahrens zur biotechnologischen Produktion von 2-Phenylethanol. Books on Demand, Norderstedt.
- Fahnert, B., Lilie, H. und Neubauer, P. (2004).** Inclusion bodies: formation and utilisation (in: *Physiological stress responses in bioprocesses*). Springer Berlin / Heidelberg. 89: 93-142.
- Fahrmeir, L., Pigeot, I., Künstler, R. und Tutz, G. (2009).** Statistik: Der Weg zur Datenanalyse. Springer
- Floss, D. S. und Walter, M. H. (2009).** Role of carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1) in apocarotenoid biogenesis revisited. *Plant Signal Behav* 4(3): 172-175.
- Fox, K. C. (1995).** Biopreservation. Putting proteins under glass. *Science* 267(5206): 1922-1923.
- Frangioni, J. V. und Neel, B. G. (1993).** Solubilization and purification of enzymatically active Glutathione S-Transferase (pGEX) fusion proteins. *Analyt Biochem* 210(1): 179-187.
- Fraser, P. D. und Bramley, P. M. (2004).** The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43(3): 228-265.
- Fraser, P. D., Miura, Y. und Misawa, N. (1997).** *In vitro* characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* 272(10): 6128-6135.

- Fraser, P. D., Shimada, H. und Misawa, N. (1998).** Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate in vitro assay. *Eur J Biochem* 252(2): 229-236.
- Garavito, R. M. und Ferguson-Miller, S. (2001).** Detergents as tools in membrane biochemistry. *J Biol Chem* 276(35): 32403-32406.
- Gill, I. (2001).** Bio-doped nanocomposite polymers: sol-gel bioencapsulates. *Chem Mater* 13: 3404-3421.
- Gill, I. und Ballesteros, A. (2000).** Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends Biotechnol* 18(7): 282-296.
- Goodman, D. S., Huang, H. S., Kanai, M. und Shiratori, T. (1967).** The enzymatic conversion of all-trans beta-carotene into retinal. *J Biol Chem* 242(15): 3543-3554.
- Goodman, D. S., Huang, H. S. und Shiratori, T. (1966).** Mechanism of the biosynthesis of vitamin A from beta-carotene. *J Biol Chem* 241(9): 1929-1932.
- Goodrick, J. C., Xu, M., Finnegan, R., Schilling, B. M., Schiavi, S., Hoppe, H. und Wan, N. C. (2001).** High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnol Bioeng* 74(6): 492-497.
- Guisan, J. M. (2006a).** Immobilization of enzymes and cells. Humana Press, Totowa, N.J.
- Guisan, J. M. (2006b).** Immobilization of enzymes as the 21st century begins (in: Immobilization of enzymes and cells). J. M. Guisan, Humana Press. 22: 1-13.
- Guo, S., Boyd, J., Sammynaiken, R. und Loewen, M. C. (2008).** Identification and characterization of a unique cysteine residue proximal to the catalytic site of *Arabidopsis thaliana* carotenoid cleavage enzyme 1. *Biochem Cell Biol* 86(3): 262-270.
- Hanefeld, U. (2009).** Immobilization as a tool for improving enzymes (in: Modern biocatalysis). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 21-41.
- Hart, H., Craine, L. E., Hart, D. J., Kindler, N. und Christopher Hadad, M. (2007).** Organische Chemie. Wiley-VCH Verlag GmbH
- Hausmanns, S. (1999).** Organophile Pervaporation wässriger Mehrkomponentensysteme. VDI Verlag, Düsseldorf
- Heck, A. (2009).** Synthese heterologer Membranproteine und Carotinoide in dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Düsseldorf

- Hof, M., Hutterer, R. und Fidler, V. (2005).** Fluorescence spectroscopy in biology: advanced methods and their applications to membranes, proteins, DNA, and cells. Springer
- Holland-Staley, C. A., Lee, K., Clark, D. P. und Cunningham, P. R. (2000).** Aerobic activity of *Escherichia coli* Alcohol Dehydrogenase is determined by a single amino acid. J Bacteriology 182(21): 6049-6054.
- Holzinger, A., Phillips, K. S. und Weaver, T. E. (1996).** Single-step purification/solubilization of recombinant proteins: application to surfactant protein B. Biotechniques 20(5): 804-806, 808.
- Huang, F. C., Horvath, G., Molnar, P., Turcsi, E., Deli, J., Schrader, J., Sandmann, G., Schmidt, H. und Schwab, W. (2009a).** Substrate promiscuity of RdCCD1, a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena*. Phytochemistry 70(4): 457-464.
- Huang, F. C., Molnar, P. und Schwab, W. (2009b).** Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes. J Exp Bot 60(11): 3011-3022.
- Hüsing, N., Schubert, U., Misof, K. und Fratzl, P. (1998).** Formation and structure of porous gel networks from Si(OMe)₄ in the presence of A(CH₂)_nSi(OR)₃ (A = Functional Group). Chemistry of Materials 10(10): 3024-3032.
- Ilg, A., Beyer, P. und Al-Babili, S. (2009).** Characterization of the rice carotenoid cleavage dioxygenase 1 reveals a novel route for geranyl biosynthesis. Febs J 276(3): 736-747.
- Jana, S. und Deb, J. K. (2005).** Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol 67(3): 289-298.
- Jin, W. und Brennan, J. D. (2002).** Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. Analytica Chimica Acta 461(1): 1-36.
- Johnson, D. L. und Martin, L. L. (2005).** Controlling protein orientation at interfaces using histidine tags: an alternative to Ni/NTA. J Am Chem Soc 127(7): 2018-2019.
- Jonquière, A., Clément, R., Lochon, P., Néel, J., Dresch, M. und Chrétien, B. (2002).** Industrial state-of-the-art of pervaporation and vapour permeation in the western countries. J Membr Sci 206: 87-117.
- Jucker, W. (2011).** Carotenoids. CHIMIA Int J Chem 65(1): 109-110.
- Jüttner, F. und Höflacher, B. (1985).** Evidence of beta-carotene 7,8(7',8') oxygenase (beta-cyclocitral, crocetindial generating) in *Microcystis*. Arch Microbiol 141: 337-343.

- Kahlenberg, L. (1905).** On the nature of the process of osmosis and osmotic pressure with observations concerning dialysis. *J Phys Chem* 10(3): 141-209.
- Kajiwara, S., Kakizono, T., Saito, T., Kondo, K., Ohtani, T., Nishio, N., Nagai, S. und Misawa, N. (1995).** Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and astaxanthin synthesis in *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol* 29(2): 343-352.
- Kane, J. F. und Hartley, D. L. (1988).** Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 6(5): 95-101.
- Kieber, R. J. und Mopper, K. (1990).** Determination of picomolar concentrations of carbonyl compounds in natural waters, including seawater, by liquid chromatography. *Environmental Science & Technology* 24(10): 1477-1481.
- Kierstan, M. P. und Coughlan, M. P. (1991).** Immobilization of proteins by noncovalent procedures: principles and applications (in: Protein immobilization - fundamentals and applications). 14: 13-71.
- Kim, J. und DellaPenna, D. (2006).** Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of *Arabidopsis* carotenoid beta-ring hydroxylase CYP97A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(9): 3474-3479.
- Kloer, D. P., Ruch, S., Al-Babili, S., Beyer, P. und Schulz, G. E. (2005).** The structure of a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Science* 308(5719): 267-269.
- Kloer, D. P. und Schulz, G. E. (2006).** Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell Mol Life Sci* 63(19-20): 2291-2303.
- Kober, A. (1917).** Pervaporation, perstillation and percrystallization. *J Am Chem Soc* 39: 944-950.
- Kosinski, M. J., Rinas, U. und Bailey, J. E. (1992).** Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 36(6): 782-784.
- Kumar, V., Sharma, V. K. und Kalonia, D. S. (2009).** Effect of polyols on polyethylene glycol (PEG)-induced precipitation of proteins: impact on solubility, stability and conformation. *Int J Pharm* 366(1-2): 38-43.
- Lange, H., Taillandier, P. und Riba, J.-P. (2001).** Effect of high shear stress on microbial viability. *J Chem Technol Biotechnol* 76(5): 501-505.
- Lapostolet-Resch, S. (2001).** Aufbau und Charakterisierung einer Pervaporationsanlage zur Kopplung an einen Biokonversionsprozeß im Labormaßstab. Diplomarbeit, FH Frankfurt, FB Verfahrenstechnik, Frankfurt
- Latowski, D., Akerlund, H.-E. und Strzalka, K. (2004).** Violaxanthin de-epoxidase, the xanthophyll cycle enzyme, requires lipid inverted hexagonal structures for its activity. *Biochemistry* 43(15): 4417-4420.

- Latowski, D., Kruk, J., Burda, K., Skrzynecka-Jaskier, M., Kostecka-Gugala, A. und Strzalka, K. (2002).** Kinetics of violaxanthin de-epoxidation by violaxanthin de-epoxidase, a xanthophyll cycle enzyme, is regulated by membrane fluidity in model lipid bilayers. *Eur J Biochem* 269: 4656-4665.
- Lee, D. H., Kim, W. H., Kweon, D. H. und Seo, J. H. (2004).** Consortium of fold-catalyzing proteins increases soluble expression of cyclohexanone monooxygenase in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 549-552.
- Li, X., Robbins, J. W., Jr. und Taylor, K. B. (1992).** Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant *Escherichia coli* strains. *J Ind Microbiol* 9(1): 1-9.
- Lipnizki, F., Hausmanns, S., Laufenberg, G., Field, R. und Kunz, B. (2000).** Use of pervaporation-bioreactor hybrid processes in biotechnology. *Chem Eng Technol* 23(7): 569-577.
- Losen, M., Frolich, B., Pohl, M. und Buchs, J. (2004).** Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnol Prog* 20(4): 1062-1068.
- Maltzahn, B. (2005).** Design und Modellierung eines integrierten Bioprozesses zur Produktion natürlicher Aromastoffe. Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg, Technische Fakultät Erlangen-Nürnberg
- Margolin, A. L. (1996).** Novel crystalline catalysts. *Trends Biotechnol* 14: 223-230.
- Märki-Fischer, E. und Eugster, C. H. (1988).** Rosafluin, ein neues Diapocarotindiol aus Rosenblüten. 8. Mitteilung über Rosenfarbstoffe. *Helvetica Chimica Acta* 71(6): 1491-1497.
- Marshak, D. R. (1996).** Strategies for protein purification and characterization: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Cortes, E., Garcia, J. L., Fernandez-Lafuente, R. und Guisan, J. M. (2001).** One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-His-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports. *Biotechnol Bioeng* 76(3): 269-276.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. und Fernandez-Lafuente, R. (2007).** Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* 40(6): 1451-1463.
- Mateo, C., Pessela, B. C. C., Grazu, V., Torres, R., López-Gallego, F., Guisan, J. M. und Fernandez-Lafuente, R. (2006).** One-step purification, immobilization, and stabilization of poly-Histidine-tagged enzymes using metal chelate-epoxy supports (in: Immobilization of enzymes and cells). J. M. Guisan, Humana Press. 22: 117-128.

- Mayer, A. C., Bolm, C., Laschat, S., Rabe, V., Baro, A. und García Mancheño, O. (2008).** Iron-catalyzed oxidation reactions (in: Iron catalysis in organic chemistry). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 73-123.
- Meyer, K. (2002).** Carotinoide - Bedeutung und technische Synthesen. Chemie in unserer Zeit(3): 178-192.
- Moore, T. (1930).** Vitamin A and carotene: the absence of the liver oil vitamin A from carotene. VI. The conversion of carotene to vitamin A in vivo. Biochem J 24(3): 692-702.
- Mulder, M. (1996).** Basic principles of membrane technology. Kluwer Academic
- Muñiz, K., Streuff, J., Hövelmann, C. H. und Núñez, A. (2007).** Exploring the nickel-catalyzed oxidation of alkenes: a diamination by sulfamide transfer. Angewandte Chemie International Edition 46(37): 7125-7127.
- Munk, K. und Eikmanns, M. (2001).** Mikrobiologie. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.]
- Nacke, C. (2011).** Selektive biokatalytische Herstellung von Aromastoffen aus Carotinoiden durch Kombination molekularbiologischer, enzym- und verfahrenstechnischer Methoden. Dissertation, Technische Universität München, Biotechnologie der Naturstoffe, München
- Nacke, C. und Schrader, J. (2011).** Liposome based solubilisation of carotenoid substrates for enzymatic conversion in aqueous media. J Mol Catal B: Enzym 71(3-4): 133-138.
- Nacke, C. und Schrader, J. (2012).** Micelle based delivery of carotenoid substrates for enzymatic conversion in aqueous media. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 77(0): 67-73.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., van den Berg, J. und Sandmann, G. (2006).** Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. Mol Genet Genomics 275(2): 148-158.
- Olson, J. A. und Hayaishi, O. (1965).** The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. Proc Natl Acad Sci USA 54(5): 1364-1370.
- Orive, G., Hernández, R. M., Gascón, A. R. und Pedraz, J. L. (2006).** Encapsulation of cells in alginate gels (in: Immobilization of enzymes and cells). J. M. Guisan, Humana Press. 22: 345-355.
- Outten, F. W. und Theil, E. C. (2009).** Iron-based redox switches in biology. Antioxid Redox Signal 11(5): 1029-1046.

- Pan, J. G., Rhee, J. S. und Lebeault, J. M. (1987).** Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* in fed-batch culture. *Biotechnol Lett* 9(2): 89-94.
- Parfitt, G. D. und Rochester, C. H. (1983).** Adsorption from solution at the solid/liquid interface. Academic Press
- Paria, S. und Khilar, K. C. (2004).** A review on experimental studies of surfactant adsorption at the hydrophilic solid-water interface. *Adv Colloid Interface Sci* 110(3): 75-95.
- Paruchuri, V. K. (2008).** Surface Micelles as Revealed by Soft Contact Atomic Force Microscopy Imaging. The University of Utah
- Penkett, S. A., Flook, A. G. und Chapman, D. (1968).** Physical studies of phospholipids. IX. Nuclear resonance studies of lipid-water systems. *Chem Phys of Lipids* 2(3): 273-290.
- Pierre, A. C. (2004).** The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocat Biotransform* 22(3): 145-170.
- Pilarek, M., Glazyrina, J. und Neubauer, P. (2011).** Enhanced growth and recombinant protein production of *Escherichia coli* by a perfluorinated oxygen carrier in miniaturized fed-batch cultures. *Microb Cell Fact* 10: 50.
- Poncelet, D. (2006).** Microencapsulation: fundamentals, methods and applications (in: *Surface chemistry in biomedical and environmental science*). J. Blitz and V. Gun'ko, Springer Netherlands: 23-34.
- Prado-Cabrero, A., Scherzinger, D., Avalos, J. und Al-Babili, S. (2007).** Retinal biosynthesis in fungi: characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot Cell* 6(4): 650-657.
- Rao, N. N., Lütz, S., Seelbach, K. und Liese, A. (2006).** Basics of bioreaction engineering (in: *Industrial biotransformations*). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 115-145.
- Redmond, T. M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., Gantt, E. und Cunningham, F. X. (2001).** Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *J Biol Chem* 276: 6560-6565.
- Reetz, M. T. (1997).** Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry. *Adv Mater* 9(12): 943-954.
- Reetz, M. T. (2006).** Practical protocols for lipase immobilization via sol-gel techniques (in: *Immobilization of enzymes and cells*). J. M. Guisan, Humana Press. 22: 65-76.

- Reetz, M. T., Zonta, A. und Simpelkamp, J. (1995).** Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnol Bioeng* 49(5): 527-534.
- Riesenberg, D. (1991).** High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 2(3): 380-384.
- Rodríguez-Bustamante, E. und Sánchez, S. (2007).** Microbial production of C13-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage. *Crit Rev Microbiol* 33(3): 211-230.
- Roy, I. und Gupta, M. N. (2004).** Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnol Appl Biochem* 39(Pt 2): 165-177.
- Roy, I. und Gupta, M. N. (2006).** Bioaffinity immobilization (in: Immobilization of enzymes and cells). J. M. Guisan, Humana Press. 22: 107-116.
- Ruch, S., Beyer, P., Ernst, H. und Al-Babili, S. (2005).** Retinal biosynthesis in eubacteria: in vitro characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis sp. PCC 6803*. *Mol Microbiol* 55(4): 1015-1024.
- Rudolph, R., Lilie, H. und Schwarz, E. (1999).** *In vitro* folding of inclusion body proteins on an industrial scale (in: Recombinant proteins, monoclonal antibodies and therapeutic genes). H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler and P. Stadler: 112-123.
- Sahdev, S., Khattar, S. K. und Saini, K. S. (2008).** Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem* 307(1-2): 249-264.
- Sandmann, G. (2001).** Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch Biochem Biophys* 385(1): 4-12.
- Scherzinger, D., Scheffer, E., Bar, C., Ernst, H. und Al-Babili, S. (2010).** The *Mycobacterium tuberculosis* ORF Rv0654 encodes a carotenoid oxygenase mediating central and excentric cleavage of conventional and aromatic carotenoids. *Febs J* 277(22): 4662-4673.
- Schilling, M. (2008).** Gewinnung von Aromastoffen durch enzymatische Spaltung von Carotinoiden mit der rekombinanten Dioxygenase AtCCD1. Dissertation, Technische Universität München, Biotechnologie der Naturstoffe, München
- Schilling, M., Haetzelt, F., Schwab, W. und Schrader, J. (2008).** Impact of surfactants on solubilization and activity of the carotenoid cleavage dioxygenase, AtCCD1, in an aqueous micellar reaction system. *Biotechnol Lett* 30(4): 701-706.
- Schilling, M., Patett, F., Schwab, W. und Schrader, J. (2007).** Influence of solubility-enhancing fusion proteins and organic solvents on the in vitro biocatalytic performance of the carotenoid cleavage dioxygenase AtCCD1 in a micellar reaction system. *Appl Microbiol Biotechnol* 75(4): 829-836.

- Schmid, R. D. (2006).** Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley-VCH, Weinheim
- Schmidt, H., Kurtzer, R., Eisenreich, W. und Schwab, W. (2006).** The carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* is a dioxygenase. J Biol Chem 281(15): 9845-9851.
- Schmidt, H. K. (2001).** Das Sol-Gel-Verfahren. Chemie in unserer Zeit 35(3): 176-184.
- Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., Sandmann, G. und Schrader, J. (2011).** Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. Appl Microbiol Biotechnol 89(3): 555-571.
- Schwartz, S. H., Qin, X. und Loewen, M. C. (2004).** The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. J Biol Chem 279(45): 46940-46945.
- Schwartz, S. H., Qin, X. und Zeevaart, J. A. (2001).** Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. J Biol Chem 276(27): 25208-25211.
- Sharma, V. K. und Kalonia, D. S. (2004).** Polyethylene glycol-induced precipitation of interferon alpha-2a followed by vacuum drying: Development of a novel process for obtaining a dry, stable powder. AAPS J 6(1): 31-44.
- Sheldon, R. A. (2007a).** Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. Biochem Soc Trans 35(6): 1583-1587.
- Sheldon, R. A. (2007b).** Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. Adv Synth Catal 349(8-9): 1289-1307.
- Singh, S. M. und Panda, A. K. (2005).** Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. J Biosci Bioeng 99(4): 303-310.
- Siurkus, J., Panula-Perala, J., Horn, U., Kraft, M., Rimseliene, R. und Neubauer, P. (2010).** Novel approach of high cell density recombinant bioprocess development: optimisation and scale-up from microliter to pilot scales while maintaining the fed-batch cultivation mode of *E. coli* cultures. Microb Cell Fact 9: 35.
- Smith, D. B. (2000).** Generating fusions to glutathione S-transferase for protein studies. Methods Enzymol 326: 254-270.
- Sorensen, H. P. und Mortensen, K. K. (2005).** Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Microb Cell Fact 4(1): 1.

- Stanley, A. M. und Fleming, K. G. (2008).** The process of folding proteins into membranes: challenges and progress. *Arch Biochem Biophys* 469(1): 46-66.
- Stefer, B. (2004).** Bioprozesstechnische Charakterisierung eines organophilen Pervaporation-Bio-Hybridreaktors am Beispiel einer Aromabiosynthese. Inaugural-Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, Hohe Landwirtschaftliche Fakultät, Bonn
- Stürken, K. (1994).** Organophile Pervaporation : ein Membranverfahren zur Aufarbeitung verdünnter wässrig-organischer Lösungen. GKSS, Geesthacht
- Sun, Z., Gantt, E. und Cunningham, F. X., Jr. (1996).** Cloning and functional analysis of the beta-carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 271(40): 24349-24352.
- Suthersan, S. S. (2001).** Natural and enhanced remediation systems. Taylor & Francis
- Tan, B.-C., Joseph, L. M., Deng, W.-T., Liu, L., Li, Q.-B., Cline, K. und McCarty, D. R. (2003).** Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* 35(1): 44-56.
- Tan, B. C., Schwartz, S. H., Zeevaart, J. A. D. und McCarty, D. R. (1997).** Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12235-12240.
- Trappler, E. (2004).** Lyophilization equipment (in: Lyophilization of biopharmaceuticals). H. R. Costantino and M. J. Pikal: 3-42.
- Valdez-Cruz, N. A., Ramirez, O. T. und Trujillo-Roldan, M. A. (2011).** Molecular responses of *Escherichia coli* caused by heat stress and recombinant protein production during temperature induction. *Bioeng Bugs* 2(2): 105-110.
- Vogel, J. T., Tan, B. C., McCarty, D. R. und Klee, H. J. (2008).** The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *J Biol Chem* 283(17): 11364-11373.
- von Lintig, J. und Vogt, K. (2000).** Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *J Biol Chem* 275: 11915-11920.
- Waché, Y., Bosser-De Ratuld, A. und Belin, J.-M. (2001).** Production of aroma compounds by enzymatic cooxidation of carotenoids (in: Carotenoid-derived aroma compounds). American Chemical Society. 802: 102-113.
- Walter, M. H., Floß, D. S. und Strack, D. (2009).** Die facettenreiche Welt der Apocarotinoide. Farben, Düfte, Aromen und Hormone. *Biologie in unserer Zeit* 39(5): 336-344.

- Wang, W. (2000).** Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 203(1-2): 1-60.
- Wang, Y., Liang, Z.-H., Zhang, Y.-S., Yao, S.-Y., Xu, Y.-G., Tang, Y.-H., Zhu, S.-Q., Cui, D.-F. und Feng, Y.-M. (2001).** Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnol Bioeng* 73(1): 74-79.
- Winterhalter, P. (1996).** Carotenoid-derived aroma compounds: biogenetic and biotechnological aspects (in: *Biotechnology of improved foods and flavors*). G. R. Takeoka, R. Teranishi, P. J. Williams and A. Kobayashi. Washington, American Chemical Society: 295-308.
- Winterhalter, P. und Rouseff, R. (2001).** Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. (in: *Carotenoid-derived aroma compounds*). American Chemical Society. 802: 1-17.
- Wittung-Stafshede, P. (2002).** Role of cofactors in protein folding. *Acc Chem Res* 35(4): 201-208.
- Wöltinger, J., Drauz, K. und Bommarius, A. S. (2001).** The membrane reactor in the fine chemicals industry. *Appl Catal A: General* 221(1-2): 171-185.
- Wöltinger, J., Karau, A., Leuchtenberger, W. und Drauz, K. (2005).** Membrane reactors at Degussa. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 92: 289-316.
- Wu, Z. und Robinson, D. S. (1999).** Co-oxidation of beta-carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenase. *J Agric Food Chem* 47: 4899-4906.
- Yashroy, R. C. (1990).** Lamellar dispersion and phase separation of chloroplast membrane lipids by negative staining electron microscopy. *J Biosci* 15(2): 93-98.
- Yee, L. und Blanch, H. W. (1992).** Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology (NY)* 10(12): 1550-1556.
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M. und Berger, R. G. (2003a).** Cleavage of β -carotene to flavor compounds by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 26(4): 331-336.
- Zorn, H., Langhoff, S., Schreiber, M., Nitz, M. und Berger, R. G. (2003b).** A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β -carotene to flavor compounds. *Biol Chem* 384: 1049-1056.

8.1.2 pGEX-4T

