

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Biokatalytische Herstellung von Cholsäurederivaten mit Hydroxysteroiddehydrogenasen

Michael G. Braun

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wilfried Schwab
3. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Rolf D. Schmid (em.),
Universität Stuttgart

Die Dissertation wurde am 10.05.2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 11.10.2011
angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit umfasst die Ergebnisse, welche während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München erarbeitet wurden. Dabei konnte ich im ersten Jahr meiner praktischen Arbeiten auf die hervorragende Ausstattung der Labore des Instituts für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, zurückgreifen. Ab dem zweiten Jahr standen mir die ausgezeichneten technischen Möglichkeiten des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München zur Verfügung.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen, denen ich an dieser Stelle ganz herzlich danken möchte.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die ausgezeichnete Betreuung und die Möglichkeiten bedanken, an einem äußerst vielseitigen, anwendungsorientierten und interdisziplinären Thema promovieren zu können. Seine unterstützenden und kreativen Worte, konstruktive Diskussionen und das vertrauensvolle Einräumen von Freiheiten haben diese Arbeit wesentlich gefördert.

Bei Herrn Professor Dr. rer. nat. Rolf Schmid möchte ich mich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen im ersten Jahr meiner Promotion, die stetige Begeisterung an meiner Arbeit und die Bereitschaft, als Drittprüfer zu fungieren, bedanken. Seine motivierenden Worte haben meine Arbeiten stets unterstützt.

Beim Koreferenten Herrn Professor Dr. rer. nat. Wilfried Schwab (Fachgebiet Biotechnologie der Naturstoffe, Technische Universität München) und beim Prüfungsvorsitzenden Herrn Professor Dr. Andreas Kremling (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Fachgebiet für Systembiotechnologie, Technische Universität München) bedanke ich mich für die Übernahme ihrer jeweiligen Aufgaben.

Bei Frau Professor Dr. rer. nat. Vlada Urlacher (Lehrstuhl für Biochemie II, Universität Düsseldorf) danke ich für die hilfreichen Vorschläge und Diskussionen.

Bei Herrn Professor Dr. rer. nat. Jürgen Pleiss und Herrn Dr. rer. nat. Michael Knoll (Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) für das Homologiemodell der 12 α -HSDH und die Unterstützung bei verschiedenen PC-Rechenaufgaben.

Der Firma PharmaZell GmbH, Raubling, für die Unterstützung. Herrn Arno Aigner und Frau Ute Reichert danke ich für die aufgeschlossene Kooperation und das rege Interesse an meiner Arbeit.

Bei der Bayerischen Forschungsförderung für die Finanzierung des Projekts „ECSO – Enzyme Catalyzed Steroid Oxidation“ (AZ-777-07).

Bei all meinen Studenten Phillip Scheller, Boqiao Sun, Katharina Lachmann, Andrea Weber, Tobias Gebhardt, Christoph Loderer, Katharina Köhler und Christina Kantzow.

Bei meinen Wissenschaftlichen Hilfskräften Lorena Rodriguez, Juliane Weigend, Lena Stachorski, Johanna Sonntag, Tobias Klaus, Sven Bresch und Christina Pfaffinger für die Unterstützung.

Den (ehemaligen) Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung, sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre: Dr. Thomas Reichert, Dr. Sabine Eiben, Holger Beuttler, Danni Liu, Dr. Kyoko Momoi, Dr. Luo Liu, Victoria Bulling, Luam Ghebreghiorghis, Kristina Knösche, Susanne Münch, Beate Rössle-Lorch, Marco Girhard, Matthias Gunne, Björn Mückschel, Katja Koschorrek, Anna Romankiewicz, Evelyne Weber, Matthias Dietrich.

Den (ehemaligen) Mitarbeitern und Kollegen des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik für die angenehme Zusammenarbeit und Unterstützung: Irma Einsle, Markus Amann, Norbert Werth, Georg Kojro, Dr. Dariusch Hekmat, Dominik Maslak, Michael Hofinger, Andrea Vester, Gabi Gebhardt, Tanja Kurzrock, Michael Finke, Stefanie Brüning, Ralf Hortsch, Clara Delhomme, Christoph Bendig, Torben Höfel, Martin Demler, Eva Gross, Peter Riedlberger, Georg Faust, Nils Janzen, Bernd Anselment, Yilei Fu, Kathrin Hölsch, Stefan Bräutigam, Danielle Dennewald, Dirk Hebel, Benjamin Smejkal, Harald Krispin, Michael Schmidt.

Bei Herrn Dr. Ing. Hannes Link für die Modellierungsarbeiten.

Bei Michael Weiner und Boqiao Sun für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei meinen Eltern und meiner Familie für den Rückhalt und die Abwechslung in allen Lebenslagen.

Bei meiner Frau für ihre Geduld während meiner Promotion und das Wichtigste überhaupt.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	3
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	7
3.1	Gallensäuren	7
3.1.1	Steroide	7
3.1.2	Struktur der Gallensäuren	8
3.1.3	Galle und enterohepatischer Kreislauf	9
3.1.4	Gallensteine und deren Behandlung	10
3.1.5	Mikrobielle Umwandlungen von Gallensäuren	11
3.1.6	Nutzen der Gallensalzbiotransformationen für Bakterien	12
3.1.7	Wirkung von Gallensalzen auf Mikroorganismen	13
3.2	Ursodesoxycholcholsäure	14
3.2.1	Medizinische Anwendung	14
3.2.2	Chemische Synthese von Ursodesoxycholsäure	15
3.2.3	Biokatalytische Darstellung von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure und Ursodesoxycholsäure	16
3.3	Hydroxysteroiddehydrogenasen	18
3.3.1	Mikrobielle Hydroxysteroiddehydrogenasen	18
3.3.2	Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen	19
3.3.3	Wichtige Hydroxysteroiddehydrogenasen zur biokatalytischen Synthese von Ursodesoxycholsäure	21
3.4	Enzymatische Synthesen	24
3.4.1	Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese	24
3.4.2	Vorteile von enzymbasierten Synthesen	25
3.4.3	Nachteile von enzymbasierten Synthesen	26
3.4.4	Verwendung isolierter Enzyme oder ganzer Zellen	28
3.4.5	Veränderung von Enzymeigenschaften mittels <i>Protein Engineering</i>	29
3.5	Kofaktorregenerierung	32
3.5.1	Substratgekoppelter Ansatz	33
3.5.2	Enzymgekoppelter Ansatz	34
3.5.3	Formiatdehydrogenasen	35
3.5.4	Alkoholdehydrogenasen	36
3.5.5	Glutamatdehydrogenasen	36

3.5.6	Lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenasen	37
3.5.7	Zellmetabolismus	38
3.6	Reaktionskinetik enzymatischer Umsetzungen	39
3.6.1	Modelle zur Beschreibung von Enzymkinetiken	39
3.6.2	Mechanismus der 12 α -HSDH.....	41
3.6.3	Stoffbilanzen des idealen Rührkesselreaktors	43
3.6.4	Prozessmodelle	45
4	MATERIAL UND METHODEN	47
4.1	Allgemeines Material	47
4.2	Spezielles Material	47
4.2.1	Vektoren	47
4.2.2	Vektorkonstrukte	48
4.2.3	<i>Escherichia coli</i> - Stämme	49
4.3	Mikrobiologische Methoden.....	49
4.3.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	49
4.3.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> im 7,5 L-Rührkesselreaktor.....	50
4.3.3	Stammhaltung	52
4.3.4	Zellaufschluss von <i>Escherichia coli</i>	52
4.3.5	Wachstumsversuche	53
4.4	Molekularbiologische Methoden	54
4.4.1	Isolation genomischer DNA.....	54
4.4.2	Polymerasekettenreaktion.....	54
4.4.3	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese	54
4.4.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelextraktion.....	55
4.4.5	Restriktion mit Endonukleasen.....	55
4.4.6	Ligation von DNA-Fragmenten.....	55
4.4.7	Positionsgerichtete Mutagenese	55
4.4.8	Zufallsmutagenese mittels <i>error-prone</i> -Polymerasekettenreaktion	56
4.4.9	Sättigungsmutagenese.....	57
4.4.10	Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen.....	57
4.4.11	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	57
4.4.12	Herstellung von elektro-kompetenten Zellen.....	58
4.4.13	Plasmidkonstruktion mittels <i>Recombineering</i>	58
4.4.14	Plasmidisolierung mittels Minipräparation	59

4.4.15	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	59
4.4.16	Kolonie-Polymerasekettenreaktion	59
4.4.17	Sequenzierung von plasmidischer DNA	60
4.4.18	Spezifisches Ausschalten von chromosomalen Genen	60
4.5	Methoden für die Hochdurchsatzdurchmusterung	61
4.5.1	Pipettieren von Lösungen	61
4.5.2	Picken von Kolonien	61
4.5.3	Heterologe Proteinexpression in Mikrotiterplatten	62
4.5.4	Aktivitätsassay zur Auslese in der Mikrotiterplatte	63
4.6	Proteinbiochemische Methoden	63
4.6.1	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i> im Schüttelkolben	63
4.6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay	63
4.6.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
4.6.4	Bestimmung von Aktivitäten im Küvetten-Photometer	64
4.6.5	Bestimmung von Enzymkinetiken im Mikrotiterplatten-Photometer	66
4.6.6	Verlaufskurvenanalyse zur Identifikation kinetischer Parameter.....	68
4.6.7	Proteinaufreinigung.....	68
4.7	Stereoselektive Reaktionen an Cholsäure	70
4.7.1	Darstellung von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure mit isolierten Enzymen.....	70
4.7.2	Vorbereitung der Biokatalysatoren für die Biotransformation.....	70
4.7.3	Ganzzellbiotransformationen mit rekombinanten <i>E. coli</i>	70
4.7.4	Ganzzellbiotransformationen mit rekombinanten <i>E. coli</i> im Zulaufverfahren	71
4.7.5	Ganzzellbiotransformationen mit rekombinanten <i>E. coli</i> im Parallelbioreaktorührsystem	71
4.7.6	Immobilisierung von Biokatalysatoren in Alginat.....	73
4.7.7	Ganzzellbiotransformationen im Satzverfahren mit immobilisierten Zellen.....	73
4.8	Enantio- und regioselektive Reduktionen an Dehydrocholsäure	74
4.8.1	Darstellung von 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure mit rekombinanten <i>E. coli</i>	74
4.8.2	Darstellung von 12-Keto-Ursodesoxycholsäure mit rekombinanten <i>E. coli</i>	74
4.9	Analytische Methoden	75
4.9.1	Glucosekonzentrationsbestimmung.....	75
4.9.2	Qualitative Dünnschichtchromatografie	75
4.9.3	Probenvorbereitung für die hochauflösende Flüssigkeitschromatographie	76
4.9.4	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	76
4.9.5	HPLC-Kalibrierung	78

4.10 Computerbasierte Methoden	79
4.10.1 Künstliche neuronale Netzwerke zur Modellierung des Zulaufverfahrens.....	79
4.10.2 Parameteridentifikation von mechanistischen Modellen.....	80
4.10.3 Optimierung mit statistischen Modellen.....	83
5 VERBESSERUNG WICHTIGER HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASEN MITTELS PROTEIN ENGINEERING	85
5.1 Erhöhung der Aktivität der 12α-HSDH in Anwesenheit von 12-Keto- Chenodesoxycholsäure.....	85
5.1.1 Durchmusterung einer zufallsbasierten Mutantenbibliothek.....	85
5.1.2 Sequenzanalyse.....	86
5.1.3 Charakterisierung.....	86
5.1.4 Sättigungsmutagenese.....	88
5.1.5 Durchmusterung der Sättigungsmutagenese-Bibliothek.....	90
5.1.6 Sequenzanalyse.....	90
5.1.7 Charakterisierung.....	91
5.1.8 Einsatz der Enzymmutanten in der Biokatalyse mit isolierten Enzymen.....	91
5.2 Änderung der Kofaktorspezifität der 12α-HSDH.....	92
5.2.1 Mutagenese der Position 38 und 39.....	93
5.2.2 Modifikation des Glycin-reichen, kofaktorbindenden Motives.....	96
5.2.3 Erhöhung der NAD ⁺ -Konzentrationen.....	98
5.3 Erhöhung der Aktivität der 12α-HSDH.....	99
5.3.1 Vergleich der NADP ⁺ -Aktivitäten der 12 α -HSDH-Einzelmutanten.....	99
5.3.2 Charakterisierung der 12 α -HSDH-Varianten mit gesteigerten Aktivitäten.....	99
5.4 Verminderung der Substratinhibierung der 7β-HSDH.....	100
5.5 Diskussion.....	104
6 MODELLGESTÜTZTE PROZESSOPTIMIERUNG DER 12-KETO- CHENODESOXYCHOLSÄURE-PRODUKTION MIT ISOLIERTEN ENZYMEN	107
6.1 Kinetisches Modell der 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Produktion mit 12α-HSDH und der Alkoholdehydrogenase aus <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> JW200.....	107
6.2 Unabhängige Parameteridentifikation.....	108
6.2.1 Verlaufskurvenanalyse der 12 α -HSDH.....	108
6.2.2 Verlaufskurvenanalyse der Alkoholdehydrogenase von <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	111
6.3 Validierung des kinetischen Prozessmodells.....	114
6.4 Biokatalytische Prozessmodellierung nach erneuter Parameteridentifikation.....	116

6.5	Prozessoptimierung	119
6.6	Diskussion	121
7	STEROIDOXIDATION MITTELS GANZER ZELLEN	123
7.1	Stammentwicklung	123
7.1.1	Wahl des Organismus.....	123
7.1.2	Beseitigung von Nebenprodukten mittels genetischer Modifikation.....	124
7.1.3	Vektorkonstrukte	127
7.1.4	Stammdurchmusterung bei verschiedenen Bedingungen	128
7.2	Herstellung des Biokatalysators im Zulaufverfahren	132
7.3	Prozessentwicklung und reaktionskinetische Betrachtungen	135
7.3.1	Alternative Kosubstrate.....	135
7.3.2	Reaktionskinetischer Einfluss der Kosubstrate	136
7.3.3	Biokatalysatorkonzentration	137
7.3.4	Zellaggregatbildung	138
7.4	Satzverfahren mit immobilisierten Zellen	141
7.4.1	Charakterisierung.....	141
7.4.2	Vergleich von freien und immobilisierten Zellen	141
7.5	Modellgestützte Prozessoptimierung des Satzverfahrens	143
7.5.1	Modellierung mittels empirischen Polynomansatzes	143
7.5.2	Identifikation optimaler Betriebspunkte und Validierung des Modells.....	146
7.5.3	Steroidoxidation im 200 mL- und 1000 mL-Maßstab	148
7.6	Biotransformation mit modellbasiertem Substratzulaufverfahren	149
7.6.1	Zulaufverfahren mit wiederholter Substratzugabe	149
7.6.2	Parallelbetriebene Biotransformationen im Zulaufverfahren.....	150
7.6.3	Erstellung eines Prozessmodells des Zulaufverfahrens mittels künstlichen neuronalen Netzwerks	154
7.6.4	Optimierung und Validierung	158
7.6.5	Steroidoxidation im 200 mL-Maßstab	160
7.7	Diskussion	162
8	ASYMMETRISCHE STEROIDREDUKTION MITTELS GANZER ZELLEN	164
8.1	Stammentwicklung und Wachstumsversuche	164
8.1.1	Wachstumsversuche.....	164
8.1.2	Vektorkonstrukte	166
8.2	Prozessentwicklung	167

8.2.1	Formiatkonzentration.....	167
8.2.2	Biomassekonzentration	169
8.2.3	Reaktionsbedingungen.....	170
8.2.4	Durchmusterung verschiedener <i>E. coli</i> -Stämme	172
8.2.5	Einfluss des pH	174
8.3	Modellgestützte Prozessoptimierung	176
8.3.1	Empirischer Polynomansatz.....	176
8.3.2	Modellvalidierung	180
8.3.3	Maßstabsvergrößerung	181
8.4	Ganzzellbiotransformationen mit rekombinanter 7β- und 3α-HSDH.....	183
8.5	Diskussion.....	184
9	DISKUSSION DER UNTERSUCHTEN PROZESSSTRATEGIEN.....	186
9.1	Prozessstrategien zur Produktion von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure	186
9.1.1	Modelloptimierte Synthese mit isolierten Enzymen	186
9.1.2	Synthese mit ganzen Zellen	188
9.1.3	Vergleich der untersuchten Prozessstrategien mit ganzen Zellen	189
9.2	Bewertung der Steroidoxidation und -reduktion für die Ursodesoxycholsäure-Synthese	190
10	ZUSAMMENFASSUNG.....	192
11	AUSBLICK	197
12	LITERATURVERZEICHNIS	198
13	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
14	ANHANG	IV
A.1	Tabellen.....	IV
A.2	Vorversuche zur RSM-Modellierung der Ganzzelloxidation im Satzverfahren	VI
A.3	Geräte.....	VII
A.4	Verbrauchsmaterialien.....	X
A.5	Chemikalien	X
A.6	Oligonukleotide	XII
A.7	Kitsysteme und Standards.....	XV
A.8	Stammlösungen.....	XV
A.9	Medien und Zusätze	XVII
A.10	Enzyme für molekularbiologische Arbeiten.....	XIX
A.11	Software und Datenbanken	XIX

1 Einleitung

Ein beträchtlicher Anteil von 10 - 15 % der erwachsenen Bevölkerung westlicher Industrienationen trägt Gallensteine. Die daraus resultierenden Gallensteinerkrankungen verursachen jährliche Kosten von 6,5 Milliarden Dollar in den USA (Shaffer, 2006). Meist stellt ein chirurgischer Eingriff die Therapieform der Wahl dar, wenn die Gallensteine in der Gallenblase zu finden sind (Lee & Kim, 2009). Allerdings sind auch nicht-invasive Behandlungsformen bekannt, wie die medikamentöse Lyse von Cholesterolsteinen mithilfe der Gallensäuren Chenodesoxycholsäure und Ursodesoxycholsäure (Gleeson *et al.*, 1990).

Gallensäuren werden der Stoffklasse der Steroide zugeordnet, wobei die Cholansäure die gemeinsame Grundstruktur darstellt. Gallensäuren unterscheiden sich in Anzahl, Stereo- und Regiochemie der Substituenten. Auf Grund ihres amphiphilen Charakters sind sie im Intestinaltrakt an der Emulsion von Lipiden beteiligt. Während der Passage im Darm können Gallensäuren von Mikroorganismen metabolisiert werden, wodurch sich deren physiologische Eigenschaften ändern (Armstrong & Carey, 1982).

Oxidationen und Reduktionen von Gallensäuren werden im Intestinaltrakt von mikrobiellen Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDH) katalysiert. Aufgrund ihrer Eigenschaften bieten sie sich zum Einsatz in regioselektiven und asymmetrischen Syntheseverfahren von Gallensalzderivaten an, welche über elf Chiralitätszentren verfügen.

Chirale Moleküle verhalten sich wie Bild und Spiegelbild und können durch beliebige Drehung des Moleküls nicht zur Deckung gebracht werden. Die Stereoisomere chemischer Verbindungen, die in Summenformel und Verknüpfung der Atome übereinstimmen, werden Enantiomere genannt. In der Natur sind viele chirale Moleküle zu finden, wie beispielsweise Aminosäuren, Zucker und Nukleinsäuren. Häufig ist jedoch nur ein Enantiomer von physiologischer Bedeutung. So sind etwa natürliche Proteine nur aus L-Aminosäuren aufgebaut. In Abbildung 1.1 ist die Struktur der Aminosäuren L-Alanin und D-Alanin dargestellt. Während L-Alanin eine proteinogene Aminosäure darstellt, wird D-Alanin von einigen Mikroorganismen zum Aufbau der Zellwand verwendet.

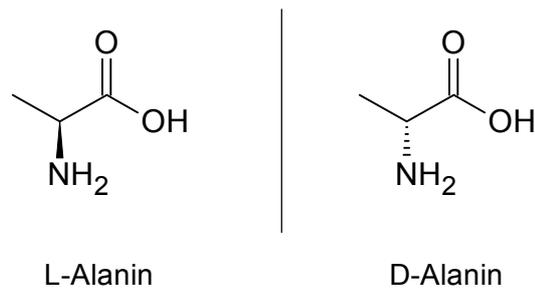


Abbildung 1.1: Chemische Struktur des L-Alanins und D-Alanins.

Enantiomere und Diastereomere unterscheiden sich daher auch in ihren Wechselwirkungen mit biologischen Systemen. Viele Medikamente besitzen ein oder mehrere Chiralitätszentren, so dass ihre Auswirkungen auf den menschlichen Organismus verschieden ausfallen können. Ein bekanntes Beispiel stellt das Schlafmittel Contergan[®] dar, welches als racemisches Gemisch in den Handel gelangte. Während (*R*)-Thalidomid den gewünschten, beruhigenden Effekt erbrachte, wirkte sich (*S*)-Thalidomid teratogen aus und führte zur „Contergan-Katastrophe“. In Folge dessen wurden die Anforderungen an die Untersuchung und enantiomerenreine Produktion chiraler Medikamente stark verschärft (Food & Drug Administration, 1992).

Die Biokatalyse bietet eine wertvolle Alternative in der Erzeugung enantiomerenreiner Produkte zu klassischen, chemischen Verfahren auf Grund des Einsatzes enantio- und regioselektiver Enzyme. Die Biokatalyse ist ein Teilbereich der weißen Biotechnologie, welcher sich mit der industriellen Anwendung biotechnologischer Verfahren zur Herstellung von Fein- und Grundchemikalien aus erneuerbaren Quellen befasst. Für diesen Zweck können Mikroorganismen, Enzyme oder Zellen angewendet werden.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Während die Behandlung von Gallensteinen zumeist chirurgisch erfolgt, existieren medikamentöse Alternativen, um Gallensteine aufzulösen. Einige Gallensalze werden bereits seit Jahrzehnten erfolgreich zur Lyse von Gallensteinen eingesetzt. Ursodesoxycholsäure erweist sich dabei als besonders geeignet, da es eine gute Wirksamkeit bei geringen Nebenwirkungen aufweist (Gleeson *et al.*, 1990). Weitere Einsatzmöglichkeiten der Ursodesoxycholsäure sind die Behandlung der primär sklerosierenden Cholangitis (Beuers *et al.*, 1992), sowie der primären biliären Zirrhose (Nguyen *et al.*, 2010) und der akuten viralen Hepatitis (Galský *et al.*, 1999).

Ursodesoxycholsäure wird bisher in einem siebenstufigen, chemischen Verfahren aus dem Naturstoff Cholsäure hergestellt (siehe Abbildung 2.1 A). Ein Problem stellt die komplexe Regio- und Stereochemie der Gallensäuren dar, so dass die Synthese mehrere Schritte der Schutzgruppenchemie erfordert, ebenso wie eine chemisch schwer zu realisierende Epimerisierung an C-7 (Samuelsson *et al.*, 1960; Hofmann, 1963). Auf Grund der hohen Anzahl komplexer chemischer Schritte und der geringen Ausbeute von weniger als 30 % (Hofmann, 1963; Liu *et al.*, 2011), sowie dem Einsatz großer Mengen Lösungsmittel und umweltschädigender Chemikalien, wurden bereits verschiedene Alternativen diskutiert.

Die Biokatalyse bietet für diesen Zweck geeignete Werkzeuge, chemische Teilschritte zu ersetzen. Abbildung 2.1 B und C geben zwei Syntheserouten wieder, bei denen die Anzahl der Syntheseschritte durch den Einsatz von Hydroxysteroiddehydrogenasen deutlich reduziert werden kann (Sutherland *et al.*, 1982; Carrea *et al.*, 1992). Als Folge kann auf die umfangreiche Schutzgruppenchemie verzichtet werden, die zu hohen Ausbeuteverlusten und großen Abfallmengen führt.

Ein Problem der in der Literatur beschriebenen biokatalytischen Verfahren zur Herstellung von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure (Abbildung 2.1 B) stellen die hohen Kosten für die benötigten Enzyme und die unvollständigen Umsätze dar. Fossati *et al.* (2006) erarbeiteten ein Verfahren mit integrierter Kofaktorregenerierung unter Verwendung einer Aceton-abhängigen Alkoholdehydrogenase mit teilweise aufgereinigten Enzymen. Die Optimierung einer solchen Zwei-Enzym-katalysierten Reaktion mit zwei Substraten / Produkten bedarf eines hohen experimentellen Aufwands, da eine Vielzahl an Variablen zu berücksichtigen sind. Der Aufwand ist umso

größer, je mehr Ziele bei der Prozessentwicklung verfolgt werden. Des Weiteren müssen bei Änderungen der Prozessziele oft neue Versuchsreihen durchgeführt werden.

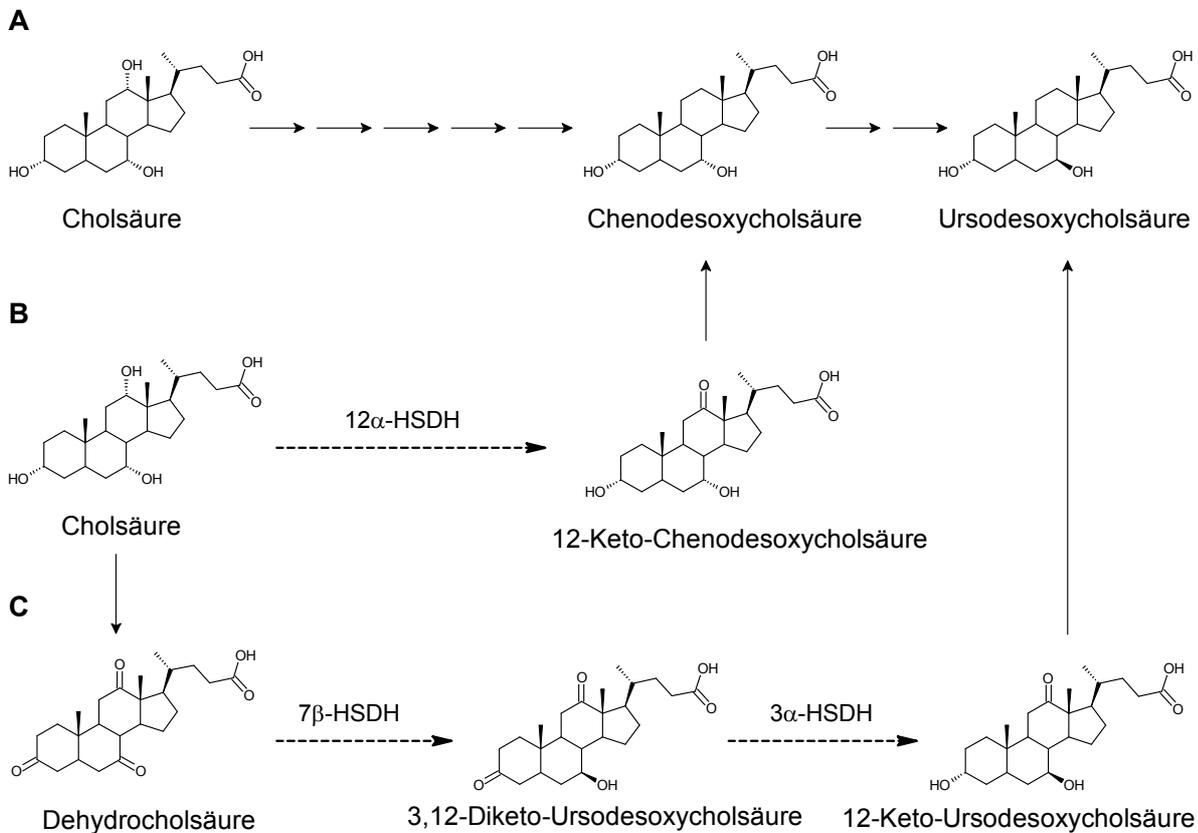


Abbildung 2.1: Synthesewege von Cholsäure zu Ursodesoxycholsäure (nach Sutherland *et al.*, 1982; Carrea *et al.*, 1992). A zeigt schematisch den aktuellen, chemischen Prozess, B und C stellen chemoenzymatische Alternativen dar. Chemische Schritte (—→) und enzymatische (- - -→) Schritte sind gekennzeichnet.

Kinetische Modelle können helfen, zahlreiche reale Experimente durch *in silico* Experimente zu ersetzen, wodurch sich Zeit und Kosten sparen lassen. Außerdem können sie zu Optimierung verschiedener Ziele eingesetzt werden, wie beispielsweise die Reduzierung von Enzymkosten. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit ein kinetisches Prozessmodell zu erstellen, welches die biokatalytische Synthese von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure unter Verwendung der $12\alpha\text{-HSDH}$ und der Aceton-abhängigen Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* simulieren kann. Ein solches Modell kann anschließend zur Optimierung des Gesamtprozesses genutzt werden.

In den Arbeiten von Fossati *et al.* (2006) konnten jedoch keine vollständigen Umsätze erzielt werden. Carrea *et al.* (1985) hingegen erreichten zwar vollständige Umsetzungen, jedoch war die Zugabe einer teuren, kommerziell erhältlichen Glutamatdehydrogenase zur Kofaktorregenerierung notwendig. Außerdem wurden die Enzyme zuvor koimmobilisiert,

wodurch weitere Kosten entstehen. In beiden Studien führte auch der teure Kofaktor NADP⁺ zu hohen Kosten.

Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit einen Stamm zur Ganzzellbiokatalyse zu entwickeln, um Kosten bei der Biokatalysatorherstellung senken und auf den teuren Kofaktor verzichten zu können. Der Stamm soll hohe Substratkonzentrationen umsetzen können und dabei möglichst keine Nebenprodukte bilden.

Bei einer Prozessentwicklung gibt es verschiedene Herausforderungen. Einerseits sollen hohe Umsätze und hohe Produktkonzentrationen erhalten werden, andererseits sollen dabei die eingesetzten Ressourcen möglichst effizient genutzt werden. Daneben können auch Einflüsse von Substrat und Produkt auf den Biokatalysator eine Rolle spielen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, Prozessstrategien unter Verwendung des erstellten Stamms zur biokatalytischen Herstellung von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure zu untersuchen.

Die Biokatalyse bietet mit der in Abbildung 2.1 C dargestellten Syntheseroute eine weitere Alternative im Herstellungsprozess von Ursodesoxycholsäure. Carrea *et al.* (1992) nutzten eine 7 β -HSDH und eine 3 α -HSDH, um Dehydrocholsäure zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure zu reduzieren. Dabei stellt die Gewinnung und Aufreinigung der 7 β -HSDH aus *Clostridium absonum* eine Herausforderung dar, da das Enzym von der ebenfalls vorhandenen 7 α -HSDH getrennt werden muss. Ein weiteres Problem stellt die Verwendung von drei verschiedenen Enzymen dar, die individuell hergestellt und aufbereitet werden müssen. Außerdem erhöhen die notwendigen Kofaktoren NADH und NADPH die Prozesskosten zusätzlich. Die umgesetzte Dehydrocholsäure-Konzentration von 12,4 mM ist zudem für einen ökonomischen Prozess zu gering.

Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den neuen rekombinanten Zugang zu einer 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* für die Erstellung eines Stamms zur Ganzzellbiokatalyse zu nutzen. Anschließend sollte eine 3 α -HSDH zusätzlich in den Stamm eingebracht werden, um die zweistufige Reduktion von Dehydrocholsäure zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure in einem Schritt zu erreichen, wodurch die gesamte Synthese von Cholsäure zu Ursodesoxycholsäure auf drei Schritte reduziert werden könnte.

Oft unterliegen Enzyme in biokatalytischen Prozessen Inhibierungen, beispielsweise hervorgerufen durch hohe Substrat- oder Produktkonzentrationen. Dadurch wird deren Einsatz in biokatalytischen Prozessen erschwert. Von der 12 α -HSDH sind Aktivitätsverluste durch das Produkt 12-Keto-Chenodesoxycholsäure beschrieben (Fossati *et al.*, 2006). Die NADP⁺-Abhängigkeit der 12 α -HSDH stellt zudem eine Schwierigkeit dar, da NADPH weniger stabil und teurer als NADH ist (Chenault & Whitesides, 1987). Ein zusätzliches Ziel dieser Arbeit war es daher, auftretende Inhibierungen der beiden Enzyme 12 α -HSDH und 7 β -HSDH mittels

verschiedener Methoden des *Protein Engineering* zu verringern. Des Weiteren sollte mit Hilfe des Rationalen Protein Designs eine Änderung der Kofaktorspezifität der 12 α -HSDH erreicht werden.

Um diese Ziele zu erreichen, waren folgende Arbeitsschritte geplant:

- Enzymoptimierung einer 12 α -HSDH und 7 β -HSDH:
 - Verringerung einer Produktinhibierung einer 12 α -HSDH
 - Änderung der Kofaktorspezifität einer 12 α -HSDH
 - Kinetische Analyse einer 7 β -HSDH und anschließende Enzymentwicklung
 - Verbesserung der spezifischen Aktivität
- Beschreibung der Reaktionskinetik der Oxidation von Cholsäure mit isolierten Enzymen:
 - Identifikation kinetischer Modellparameter für die 12 α -HSDH und einer Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus*
 - Entwicklung eines Prozessmodells zur Produktion von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure mit integrierter Kofaktorregenerierung im Satzverfahren
 - Anwendung des Prozessmodells zur Optimierung
- Oxidation von Cholsäure zur Produktion von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure im Ganzzellansatz mit integrierter Kofaktorregenerierung:
 - Stammentwicklung mit Kofaktorregenerierung und Charakterisierung
 - Reaktionsbedingungen
 - Reaktionstechnische Analyse
 - Entwicklung und Etablierung geeigneter Prozessstrategien
- Reduktion von Dehydrocholsäure mit 7 β -HSDH und 3 α -HSDH zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure im Ganzzellansatz:
 - Stammentwicklung und Charakterisierung
 - Reaktionsbedingungen
 - Reaktionstechnische Analyse
 - Zusätzliche Koexpression einer 3 α -HSDH

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Gallensäuren

3.1.1 Steroide

Steroide werden zu der Stoffklasse der Lipide gezählt und bestehen aus einem Grundgerüst des Cyclopentanoperhydrophenanthren (Steran). In der Natur erfüllen diese Moleküle verschiedene Aufgaben beispielsweise als Steroidhormone, Vitamine und Gallensalze. Auf Grund ihrer starren Molekülgestalt und der daraus resultierenden, guten Kristallisierbarkeit leitet sich der Name vom Griechischen *stereó*: „das Feste, Starre, Solide“ ab. Steroide werden biosynthetisch aus Squalenoxid und dem Triterpen Squalen abgeleitet, wobei Mevalonsäure als Vorstufe dient. Die Kohlenstoffatome stammen dabei von Acetat (Ponticorvo *et al.*, 1949, Cornforth *et al.*, 1953). Bei Tieren entsteht in der Biosynthese aus Lanosterol das wichtige Steroid Cholesterol, welches als Vorstufe für weitere Steroidbiosynthesen dient (Bishop & Yokota, 2001).

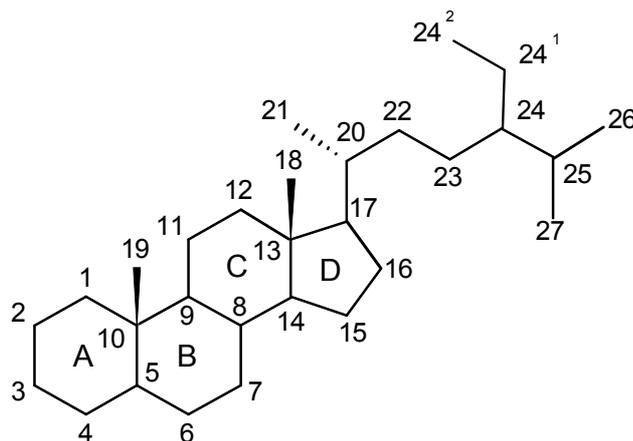


Abbildung 3.1: Struktur von Steroiden.

Das Ringsystem der Steroide wird nach der IUPAC- Nomenklatur mit den Buchstaben A, B, C und D benannt (International Union of Biochemistry, 1989). Zusätzlich werden die Kohlenstoffatome ohne Buchstabenzusatz beziffert und wie in Abbildung 3.1 durchnummeriert.

Beim tetracyclischen Gonan sind die Ringe B- und C-, sowie C- und D-*trans*-verknüpft. Bei beliebiger Stereochemie spricht man von einem Steran. In der Natur vorkommende Steroide zeigen *trans*- und *cis*-Verknüpfungen der A- und B-Ringe und stets *trans*-Verknüpfungen der B- und C-Ringe. C- und D-Ringe sind dabei meist *trans*-verknüpft.

Eine Unterscheidung der Positionierung der Substituenten wird in Bezug auf die Ringebene, analog zur Darstellung in Abbildung 3.1, vorgenommen. Steht der Substituent oberhalb der Zeichenebene, wird dieser mit „ β “ gekennzeichnet, unterhalb stehende Substituenten werden mit „ α “ angegeben.

3.1.2 Struktur der Gallensäuren

Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterol in einem multienzymatischen Prozess synthetisiert. Dabei wird einerseits die Cholesterolseitenkette oxidativ abgespalten, so dass der Isooktanrest zu einem Isopentansäurerest umgewandelt wird, sowie andererseits Hydroxylgruppen an das Grundgerüst angefügt (Begley *et al.*, 2005). Die Cholansäure stellt ihre gemeinsame Struktur dar. Gallensäuren sind daher durch eine Carboxylgruppe an der C-17-Seitenkette sowie ein bis drei Hydroxylgruppen in 3-, 7- und/oder 12-Position, meist α -konfiguriert, beschrieben. In Säugetieren liegt zumeist eine *cis*-Verknüpfung des A- und B-Rings vor. Gallensalzmoleküle besitzen elf chirale Kohlenstoffatome, sind in etwa 20 Å lang und weisen einen Radius von ca. 3,5 Å auf (Monte, 2009).

Durch diesen Aufbau erhalten die Gallensalze grenzflächenaktive Eigenschaften, wobei die Hydroxylgruppen unterhalb der Zeichenebene (α -Konfiguration) und die Carboxylgruppe den hydrophilen Part ergeben. Die hydrophoben Methylgruppen an C-18 und C-19 sind hingegen oberhalb der Zeichenebene (β -Seite) gelegen und bilden den hydrophoben Bereich (Hofmann, 1999). Die hydrophilen und -phoben Eigenschaften variieren in Abhängigkeit der Substituenten.

In wässrigen Lösungen bilden Gallensäuren daher Micellen von etwa 4 – 50 Molekülen, wenn eine kritische Konzentration (*critical micellar concentration*, CMC) überschritten wird (Begley *et al.*, 2005). Dadurch erhalten sie eine ihrer physiologischen Eigenschaften, indem sie die Emulsion von Fetten bei der Verdauung, sowie die Aufnahme einiger Vitamine und Arzneimittel erleichtern. Gallensäuren werden nach der Produktion in der Leber mit der Gallenflüssigkeit in den Zwölffingerdarm sekretiert (Silbernagl & Agamemnon, 2003).

Es wird eine Unterteilung in primäre und sekundäre Gallensalze auf Grund ihrer Biosynthese vorgenommen. In die Gruppe der primären Gallensäuren werden die natürlichen, aus Cholesterol in der Leber synthetisierten Gallensalze eingeordnet. In menschlicher Galle sind dies Cholsäure und Chenodesoxycholsäure (CDCS). Gallensäuren, die durch Bakterien vor

allein mittels Oxidation und 7-Dehydroxylierung modifiziert wurden, werden als sekundäre Gallensäuren bezeichnet (Hofmann, 1999). Zu ihnen gehören beispielsweise die Lithocholsäure und die Desoxycholsäure. In der Galle kommen Gallensäuren größtenteils als Säureamid an der Carboxylgruppe der C-17-Seitenkette mit Glycin (zum Beispiel Glycocholsäure) oder Taurin (zum Beispiel Taurocholsäure) gebunden und als Natriumsalze vor (Bortolini *et al.*, 1997). Die N-Acyamidierung der konjugierten Gallensäuren erfolgt in der Leber, wodurch sich deren pKs verringert (Hofmann & Roda, 1984; Hofmann & Mysels, 1992; Ridlon *et al.*, 2006). Gallensäuren liegen unter physiologischen Bedingungen ionisiert und daher als Salz vor. In Abbildung 3.2 sind ausgewählte Gallensäuren dargestellt.

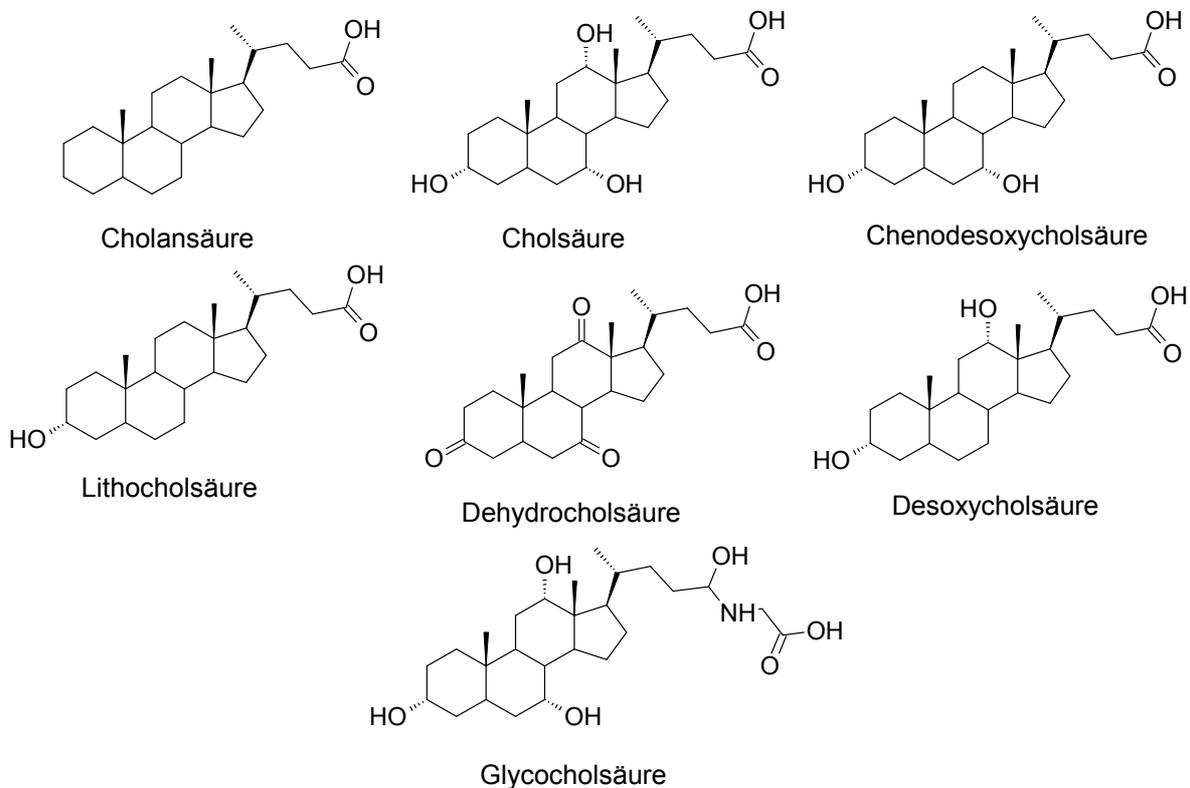


Abbildung 3.2: Strukturen von Cholansäure und verschiedener Gallensäuren.

3.1.3 Galle und enterohepatischer Kreislauf

Die Gallenflüssigkeit wird in den perizentralen Hepatozyten der Leber produziert, ist zäh und wird in der Gallenblase gespeichert. Bilirubin und Biliverdin färben die Flüssigkeit gelblich bis grünlich. Nach Sekretion in den Zwölffingerdarm ist sie an der Emulsion von Lipiden und lipophilen Stoffen beteiligt und trägt zur Neutralisation des Speisebreis bei.

Die Galle besteht größtenteils aus Wasser (82 %), in dem die Elektrolyte Natrium (145 mM), Chlorid (90 mM) und Kalium (4 mM), sowie 40 mM Gallensalze gelöst sind. Des Weiteren

liegen auch Enzyme wie die Alkalische Phosphatase, Lecithin und andere Phospholipide, Cholesterin und Metabolite aus der Leber vor (Löffler & Petrides, 1998, Begley *et al.*, 2005). Änderungen des Mischungsverhältnisses von Gallensäuren, Lecithin und Cholesterin kann die Ausfällung von Cholesterin bewirken, was zu Gallensteinen (3.1.4) führt (Silbernagl & Agamemnon, 2003).

Innerhalb des enterohepatischen Kreislaufs zirkulieren Stoffe, wie Gallensäuren und Medikamente, mehrfach zwischen Darm, Leber und Gallenblase (Silbernagl & Agamemnon, 2003; Ridlon *et al.*, 2006). Über die Nahrung aufgenommene Stoffe werden, abhängig von ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften, im Darm resorbiert, über den Blutkreislauf und die Pfortader zur Leber transportiert und dort zwecks Entgiftung metabolisiert. Beispielsweise wird die Hydrophilie mittels Konjugation erhöht. Anschließend erfolgt eine Sekretion über die Galle in den Darm, wo die Stoffe wieder abhängig von ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften erneut resorbiert werden können.

Ein physiologischer Vorteil ergibt sich dabei für körpereigene, komplexe Moleküle, wie beispielsweise Gallensäuren, Bilirubin und Vitamin B₁₂. Gallensäuren werden aktiv im distalen Ileum absorbiert (Alrefai & Gill, 2007). Der menschliche Organismus besitzt einen sogenannten Gallensäurepool von 2 - 4 g, wobei täglich nur max. 600 mg ausgeschieden werden (Silbernagl & Agamemnon, 2003).

3.1.4 Gallensteine und deren Behandlung

Jährlich verursachen die Folgen von Gallensteinen Kosten von 6,5 Milliarden Dollar in den USA, wobei dort 20 – 25 Millionen Menschen von Gallensteinen betroffen sind (Shaffer, 2006). Gallensteinerkrankungen stellen den Hauptgrund für stationäre Krankenhauseinweisungen wegen gastrointestinaler Probleme dar (Russo *et al.*, 2004).

Ungleichgewichte der in der Galle gelösten Stoffe begünstigen die Bildung von Gallensteinen, welche mit Entzündungen oder Behinderungen des Gallenflusses in den Gallenwegen einhergehen. Bei einem Ungleichgewicht von Gallensäuren / Lecithin und Calciumcarbonat handelt es sich um Calcium- beziehungsweise Bilirubinsteine. Von Cholesterinsteinen, welche mit 90 % den am häufigsten diagnostizierten Stein darstellen, spricht man bei einem Ungleichgewicht von Cholesterin und Gallensäuren (Paumgartner & Sauerbruch, 1991). Ein Cholesterinstein ist in Abbildung 3.3 im Querschnitt abgebildet.

Bei der Entstehung sind drei Faktoren entscheidend: Übersättigung, Nukleation und Stase. Bei einer Übersättigung der Gallenflüssigkeit mit Cholesterin oder Bilirubin, beziehungsweise seltener einer zu geringen Konzentration von Gallensäuren, wirken Calciumionen und Glycoproteine des Gallenblasenschleims als Kristallisationskeime, wodurch es zur Ausfällung

kommt. Dies kann bei längerer Verweildauer in den Gallengängen zu Konkrementen führen (Paumgartner & Sauerbruch, 1991; Dowling, 2000).



Abbildung 3.3: Querschnitt eines reinen Cholesterinsteins (Kim *et al.*, 2003).

Zur Entfernung von Gallensteinen ist meist ein chirurgischer Eingriff die Methode der Wahl, wenn die Steine in der Gallenblase lokalisiert sind (Lee & Kim, 2009). Befinden sich die Gallensteine im Gallengang, kann eine Dehnung der Vaterschen Papille am Zwölffingerdarm ausreichen. Außerdem kann eine Stoßwellentherapie zur Zertrümmerung der Steine durchgeführt werden. Eine medikamentöse Alternative stellt die Lyse mithilfe der Gallensäuren Ursodesoxycholsäure (UDCS) oder Chenodesoxycholsäure (CDCS) dar, wobei der Einsatz von Ursodesoxycholsäure gegenüber der nebenwirkungsreichen Chenodesoxycholsäure bevorzugt wird (Igimi & Carey, 1981; Gleeson *et al.*, 1990).

3.1.5 Mikrobielle Umwandlungen von Gallensäuren

Gallensäuren können während des Durchganges durch den Darm von Mikroorganismen der Darmflora metabolisiert werden, wobei der menschliche Darm von bis zu 1000 verschiedenen Bakterienspezies mit einer Zelldichte von 10^{11} Zellen pro mL besiedelt wird (Flint *et al.*, 2010). Die beträchtliche mikrobielle Biotransformation lässt sich beim Vergleich der Gallensalzzusammensetzung in der Gallenblase und des Faeces in Abbildung 3.4 betrachten.

Die wichtigsten Biotransformationen an Gallensalzen sind die Dekonjugation, Oxidation der Hydroxylgruppen an C-3, C-7 und C-12, sowie die $7\alpha/\beta$ -Dehydroxylierung (Ridlon *et al.*, 2006). Die Dekonjugation mittels Spaltung der Peptidbindung an C-24 wird von Gallensalzhydrolasen (*bile salt hydrolases*, BSH) katalysiert und führt zu freien Gallensäuren (Lundeen & Savage, 1990; Christiaens *et al.*, 1992; De Smet *et al.*, 1995; Grill *et al.*, 1995). Dadurch steigen ihre Hydrophobizität und damit ihre Aufnahmewahrscheinlichkeit im enterohepatischen Kreislauf. Durch die $7\alpha/\beta$ -Dehydroxylierung entsteht aus Cholsäure die Desoxycholsäure und aus Chenodesoxycholsäure die Lithocholsäure (Doerner *et al.*, 1997; Wells & Hylemon, 2000).

Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDH) bilden die jeweiligen 3 α -, 7 α - und 12 α -Ketoderivate der Gallensalze (Ridlon *et al.*, 2006). Ketogruppen können wiederum in α - oder β -Hydroxylgruppen umgewandelt werden (Hirano & Masuda, 1982; Batta *et al.*, 1985; Batta *et al.*, 1991). Fakultativ-anaerobe Mikroorganismen wie *E. coli* und anaerobe Mikroorganismen wie *Bacteroides fragilis* können die 7 α -Hydroxylgruppe oxidieren, wohingegen die Oxidation der 12 α -Hydroxylgruppen nur von wenigen Organismen wie *Clostridium perfringens* und *Clostridium* group P, strain C 48–50 vollzogen werden (Mahony *et al.*, 1977; Prabha & Ohri, 2005).

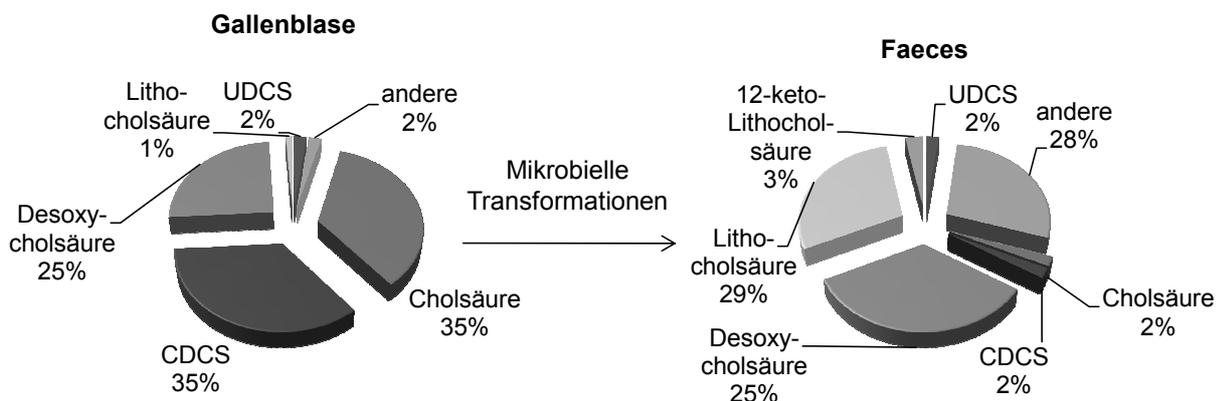


Abbildung 3.4: Zusammensetzung von Gallensalzen in der Gallenblase und des Faeces von gesunden Menschen (nach Ridlon *et al.*, 2006). Keto- und 3 β -hydroxyl-Derivate von sekundären Gallensalzen sind unter "andere" zusammengefasst. UDCS: Ursodesoxycholsäure; CDCS: Chenodesoxycholsäure.

3.1.6 Nutzen der Gallensalzbiotransformationen für Bakterien

Der Vorteil von Gallensalzhydrolasen für Mikroorganismen ist noch nicht vollständig verstanden. Einerseits wird eine Entgiftung vorgeschlagen (De Smet *et al.*, 1995). Des Weiteren stellen Gallensalzhydrolasen Virulenzfaktoren für *L. monocytogenes* dar (Dussurget *et al.*, 2002) und versorgen einige Bakterien mit Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel (Van Eldere *et al.*, 1996).

Der Stoffwechselweg der 7 α / β -Dehydroxylierung besteht aus mehreren oxidativen und reduktiven Schritten, welche in einer Zwei-Elektronen-Reduktion resultiert. Das sekundäre Gallensalz wird anschließend aus der Bakterienzelle transportiert und könnte dann dazu dienen, einen Selektionsvorteil gegenüber sensitiven Bakterien zu schaffen (Ridlon *et al.*, 2006).

Bei der Oxidation von Hydroxylgruppen an C-3, C-7 und C-12 von Gallensalzen entstehen Reduktionsäquivalente, welche einerseits für die anabole Biosynthese als auch für die oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung dienen. In *Bacteroides thetaiotaomicron* wird vermutet, dass die reduzierten Pyridinnukleotide zur ATP-Gewinnung mittels Cytochrom-

Transportkette genutzt werden (Sherrod & Hylemon, 1977). Des Weiteren hat die Stereochemie der Gallensalze erhebliche Auswirkung auf deren physiologischen Eigenschaften, so dass beispielsweise die Epimerisierung der 7 α -Hydroxylgruppe der Chenodesoxycholsäure die Hydrophobizität und Toxizität senken (Armstrong & Carey, 1982; Heuman *et al.*, 1991). Daher wird davon ausgegangen, dass mittels Hydroxysteroiddehydrogenasen neben der Energiegewinnung eine geringere Konzentration hydrophoberer Gallensalze als Schutzfaktor erreicht werden soll (Ridlon *et al.*, 2006).

3.1.7 Wirkung von Gallensalzen auf Mikroorganismen

Auf Grund ihres amphiphilen Charakters wirken sich Gallensalze negativ auf die Membranintegrität und –permeabilität von Zellmembranen aus (Albalak *et al.*, 1996; De Boever *et al.*, 2000). Mithilfe von Enzymassays konnte ein Austreten der intrazellulären Bestandteile gezeigt werden (Noh & Gilliland, 1993; Fujisawa & Mori, 1996). Dabei bestimmen verschiedene Faktoren die Wirkung von Gallensalzen auf die Zellmembranen wirken. Beispielsweise führen hohe Gallensalzkonzentrationen zum Auflösen von Membranlipiden und zur Dissoziation von integralen Membranproteinen, wodurch die Zellen schnell lysieren, auslaufen und abgetötet werden (Coleman *et al.*, 1980; Heuman *et al.*, 1996). Die Hydrophobizität des Gallensalzes spielt bei der Bindung an Membranproteinen eine wichtige Rolle (Schubert *et al.*, 1983; Hofmann *et al.*, 2001). Konjugierte Gallensalze sind bei physiologischen Bedingungen deprotoniert und bleiben daher außerhalb der Membranen. Unkonjugierte Gallensalze hingegen können mittels Flip-Flop-Aufnahme die Membran überwinden und ins Zellinnere gelangen, wobei die Anzahl der Hydroxylgruppen entscheidend ist (Cabral *et al.*, 1987; Ridlon *et al.*, 2006). Auch geringe Gallensalzkonzentrationen wirken sich schädlich auf die Membranintegrität aus, wobei hier die Gründe in der Änderung der Membranpermeabilität und –eigenschaften zu suchen sind (Noh & Gilliland, 1993; Fujisawa & Mori, 1996; Heuman *et al.*, 1996).

Neben der zellmembranschädigenden Wirkung sind ebenfalls auch andere Effekte bekannt, da Gallensalze ebenfalls mit anderen Makromolekülen interagieren können. Beispielsweise sind Reaktionen auf die Sekundärstrukturbildung von Ribonukleinsäure (RNA), fehlerhafte Proteinfaltungen, sowie Schädigungen der DNA bekannt, wobei die Apoptose der Zellen induziert werden kann (Kandell & Bernstein, 1991; Bernstein *et al.*, 1999; Powell *et al.*, 2001; Leverrier *et al.*, 2003; Ridlon *et al.*, 2006). Des Weiteren spielen die Absenkung des intrazellulären pH nach Dissoziation und osmotische Effekte eine Rolle (De Smet *et al.*, 1995), sowie die Komplexbildung von Gallensalzen mit Calcium und Eisen (Rajagopalan & Lindenbaum, 1982; Sanyal *et al.*, 1991).

In Anwesenheit von Galle bilden viele Mikroorganismen Biofilme aus. Verschiedene *Salmonella* besiedeln beispielsweise Gallensteine und produzieren Galle-abhängig einen schützenden Biofilm (Prouty *et al.*, 2002; Crawford *et al.*, 2008). Biofilme sind in extrazelluläre Matrices eingebettete Bakteriengemeinschaften (Costerton, Stewart, & Greenberg, 1999; Jefferson, 2004). *Vibrio cholerae* zeigt in Anwesenheit von Gallensalzen ebenfalls eine Biofilmbildung und die Induktion entsprechender Gene, wodurch eine erhöhte Resistenz gegenüber Gallensalzen erreicht wird (Hung *et al.*, 2006). Auch von *Bacteroides fragilis* ist bekannt, dass Gallensalze die bakterielle Koaggregation, Adhäsion an Darmepithelzellen und Biofilmbildung begünstigen (Pumbwe *et al.*, 2007). Enteropathogene *E. coli* wiesen eine verstärkte Adhäsion an Epithelzellen bei Stress durch Gallensalze auf (de Jesus *et al.*, 2005).

3.2 Ursodesoxycholsäure

3.2.1 Medizinische Anwendung

Die sekundäre Gallensäure Ursodesoxycholsäure besitzt zwei Hydroxylgruppen und stellt ein Epimer der Chenodesoxycholsäure dar. Die Hydroxylgruppe an C-3 liegt dabei in α -Konfiguration und an C-7 in β -Konfiguration vor. Der Name leitet sich vom Lateinischen (*ursus*, „der Bär“) ab, da Ursodesoxycholsäure in der Gallenflüssigkeit vieler Bären in hohen Konzentrationen zu finden ist.

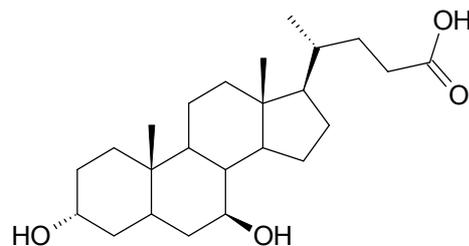


Abbildung 3.5: Strukturformel der Ursodesoxycholsäure.

Bei der Ursodesoxycholsäure handelt sich um eine nicht-toxische, industriell bedeutsame Gallensäure, die als Pharmazeutikum vielfältige Anwendung findet (Ward *et al.*, 1984). Sie wird zum einen bei der medikamentösen Auflösung von Cholesteroll-Gallensteinen eingesetzt (Stiehl *et al.*, 1978; Salen *et al.*, 1980; Igimi & Carey, 1981). In diesem Zusammenhang konnte eine Hemmung der *in vitro* Kristallisation von Cholesteroll gezeigt werden (Nishioka *et al.*, 1999). Zum Anderen vermindert die Einnahme von Ursodesoxycholsäure die Sekretion verschiedenen Gallenbestandteile, die an Bildung von Kristallisationskeimen beteiligt sein sollen (Kano *et al.*, 1998).

Ursodesoxycholsäure wird ebenfalls zur Behandlung der primär sklerosierenden Cholangitis (Beuers *et al.*, 1992), einer chronischen Entzündung der Gallenwege verwendet. Auch bei der primären biliären Zirrhose wird mit Ursodesoxycholsäure behandelt (Nguyen *et al.*, 2010). Weitere Anwendungsfelder sind die akute virale Hepatitis (Galský *et al.*, 1999) und Prevention von Darmkrebs (Khare *et al.*, 2003; Im & Martinez, 2004).

Ursodesoxycholsäure wird einzeln (Cholofalk[®], Ursochol[®], Cholit-Ursan[®]) als auch mit Chenodesoxycholsäure gemischt (Lithofalk[®]) eingesetzt. Im Gegensatz zur Einnahme von Chenodesoxycholsäure ist Ursodesoxycholsäure nahezu frei von größeren Nebenwirkungen (Maton *et al.*, 1982; Meredith *et al.*, 1982; Gleeson *et al.*, 1990).

3.2.2 Chemische Synthese von Ursodesoxycholsäure

Ursodesoxycholsäure wird in der Gallenflüssigkeit von Bären in hoher Konzentration gefunden, weshalb diese direkt in der traditionellen chinesischen Medizin zum Einsatz kommt. Die Gewinnung in sogenannten Bärenfarmen führte unter anderem dazu, dass viele Bären heute zu den gefährdeten Tieren zählen (Feng *et al.*, 2009).

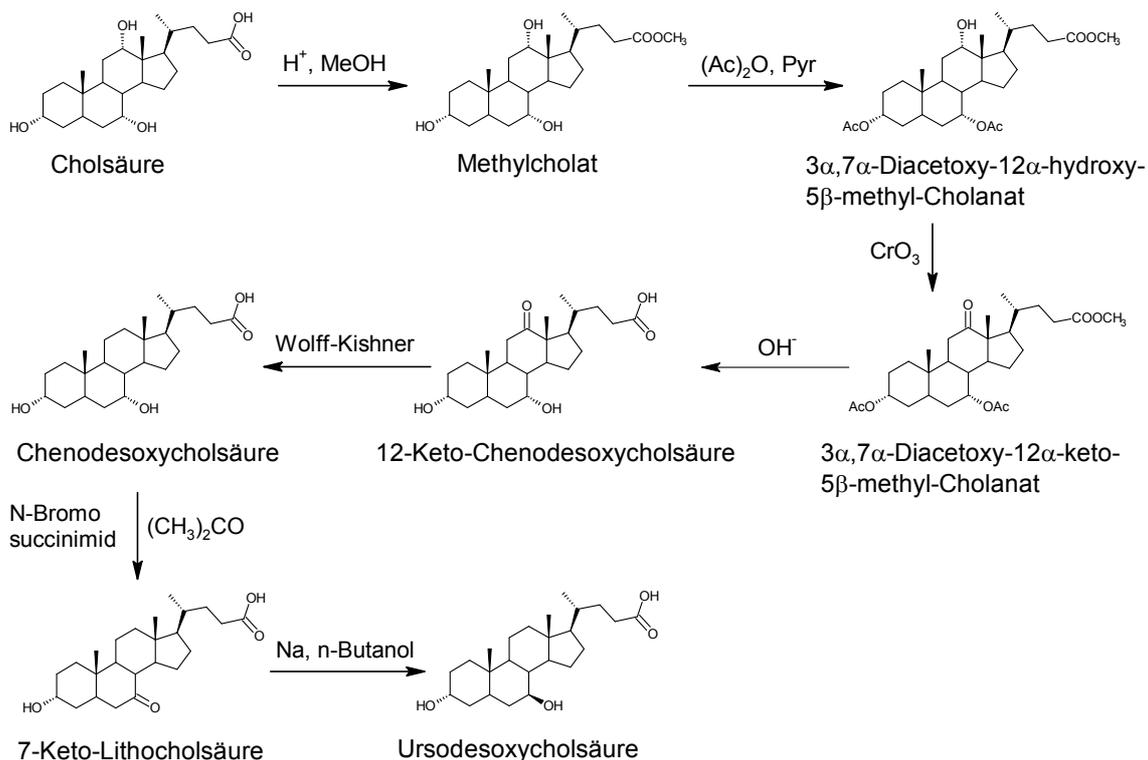


Abbildung 3.6: Chemischer Synthesewege der Ursodesoxycholsäure (nach Hofmann, 1963; Sawada *et al.*, 1982). Cholsäure wird zunächst methyliert und dann an Hydroxylgruppen an C-3 und C-7 mit Schutzgruppen versehen. Anschließend erfolgt eine Oxidation an C-12. Nach Entfernung der Schutzgruppen erhält man 12-Keto-Chenodesoxycholsäure, welche mittels Wolff-Kishner-Reaktion zu Chenodesoxycholsäure umgesetzt wird. Anschließend wird die Hydroxylgruppe in zwei Schritten an C-7 epimerisiert, wodurch Ursodesoxycholsäure entsteht.

Auf chemischen Weg wird UCDS seit vielen Jahrzehnten aus dem Ausgangsstoff Cholsäure hergestellt. Zunächst erfolgen fünf Schritte hin zum Intermediat Chenodesoxycholsäure, wobei auf Grund der komplexen Stereo- und Regioselektivität eine aufwändige Schutzgruppenchemie zum Einsatz kommen muss (Hofmann, 1963). Anschließend erfolgt die Epimerisierung der Hydroxylgruppe an C-7 zu Ursodesoxycholsäure, wie in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt ist.

Bedingt durch die Anzahl von sieben chemischen Stufen und die schwierige Stereochemie während der Reaktionen, wird nur eine geringe Ausbeute von weniger als 30 % erhalten (Hofmann, 1963; Liu *et al.*, 2011). Ein weiterer Nachteil des chemischen Verfahrens besteht in der großen Menge an Lösungsmitteln und gefährlichen Chemikalien, die für die einzelnen Reaktionen benötigt werden.

3.2.3 Biokatalytische Darstellung von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure und Ursodesoxycholsäure

Auf Grund der vielen Nachteile des chemischen Synthesewegs wurden in der Literatur bereits einige Versuche beschrieben, diesen mittels biotechnologischer Alternativen zu verkürzen. Beispielsweise kann die Epimerisierung von Chenodesoxycholsäure zu Ursodesoxycholsäure mittels Einsatz von 7α - und 7β -HSDH vollzogen werden (Medici *et al.*, 2002).

Sutherland *et al.* (1982) beschreiben weitere biokatalytische Syntheserouten, wie sie in Abbildung 3.7 zu sehen sind. Basierend auf dem Ausgangsstoff Cholsäure wird eine enzymatische Oxidation an C-12 mittels 12α -HSDH zur 12-Keto-Chenodesoxycholsäure und Epimerisierungen an C-7 mittels 7α - und 7β -HSDH durchgeführt. Die Entfernung der Keto-Gruppe an C-12 erfolgt jeweils mittels Wolff-Kishner-Reduktion. Bei dieser Reaktion werden Ketone und Aldehyde zu Alkanen unter Verwendung von Hydrazin bei hohen Temperaturen und hohem pH reduziert.

Auch Monti *et al.* (2009) untersuchten die direkte Umsetzung von Cholsäure zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure mit einem Fünf-Enzyme-System, wobei die Oxidationen von NADH-abhängigen und die Reduktion von NADPH-abhängigen Hydroxysteroiddehydrogenasen katalysiert wurden. Die vollständige Umsetzung wurde durch zwei verschiedene Kofaktorregenerierungssysteme und einem „Teebeutelverfahren“, bei dem sich die Enzyme zur Oxidation und Reduktion in getrennten Dialysebeuteln befinden, erreicht. Für die präparative Umsetzung wurden dabei 12,5 mM Cholsäure eingesetzt. Auch ausgehend von anderen Substraten wurde ebenfalls Ursodesoxycholsäure hergestellt, wie beispielsweise aus Lithocholsäure mit *Fusarium equiseti* M41 in einem Ganzzellprozess mit einer Ausbeute von 35 % (350 mg L^{-1}) (Sawada *et al.*, 1982).

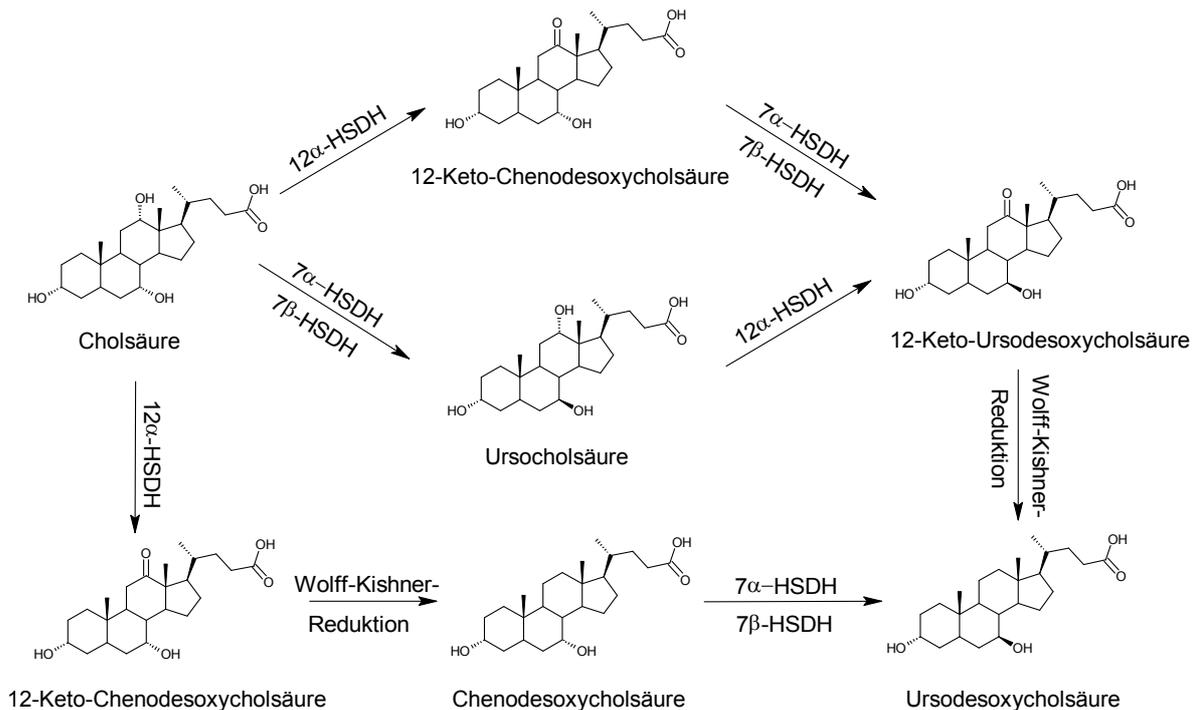


Abbildung 3.7: Schema zur chemo-enzymatischen Synthese von Ursodesoxycholsäure nach Sutherland *et al.* (1982).

Die einzelnen Reaktionsschritte aus Abbildung 3.7 sind Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Die Herstellung von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure ist dabei besonders interessant, da der Einsatz einer 12 α -HSDH auf Grund der hohen Regioselektivität drei schutzgruppenchemische Schritte einsparen kann (Carrea *et al.*, 1985), wodurch sich die Ausbeute deutlich steigern lässt.

Ein Weg zu 12-Keto-Chenodesoxycholsäure beschreibt die biokatalytische Reduktion von Dehydrocholsäure mittels 3 α - und 7 α -HSDH (Carrea *et al.*, 1984). Am häufigsten ist hingegen die Verwendung von Cholsäure als Ausgangssubstrat und einer NADPH-abhängigen 12 α -HSDH aus *Clostridium* group P, strain C 48-50 als Biokatalysator beschrieben (Carrea *et al.*, 1984; Carrea *et al.*, 1985; Fossati *et al.*, 2006). Die 12 α -HSDH wurde jeweils als isoliertes Enzympräparat, gewonnen aus dem Zelllysat von *Clostridium* group P, strain C 48-50, eingesetzt. Neben der Zugabe des teuren Kofaktors mussten zur Kofaktorregenerierung zusätzlich Glutamatdehydrogenasen beziehungsweise Aceton-abhängige Alkoholdehydrogenasen samt der entsprechenden Kosubstrate zugegeben werden. Dabei wurden 98 mM Cholsäure vollständig innerhalb von vier Tagen bei Verwendung einer Glutamatdehydrogenase umgesetzt (Carrea *et al.*, 1985), beziehungsweise 92 % von 98 mM Substrat mit einer Alkoholdehydrogenase und 25 % (v/v) Aceton (Fossati *et al.*, 2006). Das Reaktionsvolumen betrug 10 - 70 mL.

3.3 Hydroxysteroiddehydrogenasen

Hydroxysteroiddehydrogenasen bilden eine Gruppe innerhalb der Oxidoreduktasen. Oxidoreduktasen katalysieren die Übertragung von Reduktionsäquivalenten zwischen zwei Redoxsystemen und werden von der „International Union of Biochemistry“ zur Enzymklasse 1 gezählt. Die Alkoholdehydrogenasen (ADH) bilden eine Untergruppe der Oxidoreduktasen und finden sich unter der *Enzyme Commission* Nummer EC 1.1.x.x und katalysieren sowohl die Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden beziehungsweise Ketonen, als auch die Rückreaktion.

Es könnte eine Systematik für „Short Chain“-, „Medium Chain“- und „Long Chain“-Dehydrogenasen / Reduktasen aufgestellt werden, welche auf unterschiedlichen Sequenzmotiven, der Sequenzlänge, mechanistischer Eigenschaften und strukturellen Vergleichen beruht (Persson *et al.*, 1991; Jörnvall *et al.*, 1995; Nordling *et al.*, 2002; Kavanagh *et al.*, 2008).

3.3.1 Mikrobielle Hydroxysteroiddehydrogenasen

Hydroxysteroiddehydrogenasen katalysieren die Reduktion und Oxidation von Hydroxyl- und Ketogruppen an Steroiden. Diese können sich am Grundgerüst oder an der Seitenkette befinden, so dass Hydroxysteroiddehydrogenasen eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Steroidhormonen einnehmen (Lax, 1987). Sie sind in der Natur weitverbreitet und unterscheiden sich in pH-Optima für Oxidation und Reduktion, Kofaktorspezifität, Molmasse und der Genregulation (Ridlon *et al.*, 2006).

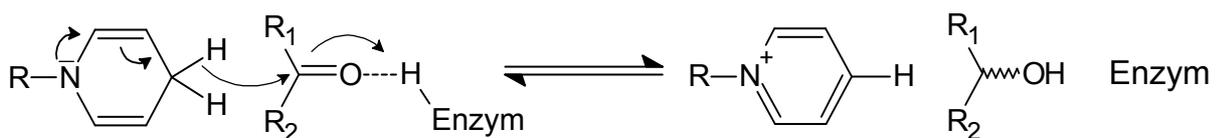


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung einer HSDH-katalysierten Reaktion. Gestrichelte Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar.

Im Gastrointestinaltrakt katalysieren mikrobielle Hydroxysteroiddehydrogenasen von Darmbewohnern die Oxidation und Epimerisierung der Hydroxylgruppen an C-3, C-7 und C-12 des Steroidgerüsts, wie es in Abbildung 3.8 schematisch dargestellt ist. Abhängig vom Redoxpotential der Umgebung überwiegt entweder die Reduktions- oder Oxidationsreaktion, da eine Sauerstoffzufuhr ins Medium zur Akkumulation von Keto-Gallensäuren führt (Sutherland & Macdonald, 1982).

3.3.2 Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen

Mikrobielle Hydroxysteroiddehydrogenasen lassen sich meist in die Familie der Short Chain Dehydrogenase / Reduktasen (SDR) einordnen, in der Vertreter verschiedener EC-Klassen (Oxidoreduktasen, Lyasen und Isomerasen) zu finden sind. Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen zeigen ein vielfältiges Substratspektrum wozu beispielsweise Zucker, Steroide, sowie Xenobiotika und anderen aromatischen Verbindungen zählen (Persson *et al.*, 2003).

Verschiedene Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen zeigen in paarweisen Vergleichen nur eine geringe Sequenzidentität von 15 – 30 % auf, wobei sie jedoch ein sehr ähnliches α / β - Faltungsmuster aufweisen. Gemeinsam ist ihnen eine Rossmann-Faltung, welche aus einem zentralen β -Faltblatt und angrenzenden α -Helices besteht (Rao & Rossmann, 1973; Oppermann *et al.*, 2003). Das Nukleotidbindungsmotiv T-G-X₃-G-X-G im variablen N-terminalen Bereich ist stark konserviert, welches wichtig für die Struktur des zentralen β -Faltblatts ist (Filling *et al.*, 2002). Weitere, wichtige konservierte Sequenzmotive der Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Konservierte Sequenzmotive in der klassischen Short Chain Dehydrogenase / Reduktasen-Familie (nach Persson *et al.*, 2003). Die Darstellung erfolgt im Einbuchstabencode (

Tabelle 14.3). Kleinbuchstaben geben Aminosäuregruppen verschiedener Eigenschaften an mit g: geladen, h: hydrophob, p: polar und x: beliebig. Mögliche Alternativen sind in Klammern angegeben.

Sekundäres Strukturelement	Klassisches SDR-Motiv	Vermutete Funktion
$\beta 1 + \alpha 1$	TGxxxGhG	Strukturgebende Funktion in der Kofaktorbinderegion
$\beta 3 + \alpha 3$	Dhx[gp]	Bindung des Adeninrings des Kofaktors
$\beta 4$	GxDhhhNNAGh	Strukturgebende Funktion zur Stabilisierung des zentralen β -Faltblatts
$\alpha 4$	hNhxG	Katalytisches Zentrum
$\beta 5$	GxhhxhSSh	Katalytisches Zentrum
$\alpha 5$	Yx[AS][ST]K	Katalytisches Zentrum
$\beta 6$	h[KR]h[NS]xhxPGxxxT	Strukturgebende Funktion

Proteine der Short Chain Dehydrogenase / Reduktasen-Familie können in verschiedene Unterfamilien einsortiert werden, wobei die Gruppen der „klassischen“ und „erweiterten“ den größten Anteil aufweisen. Eine Unterscheidung erfolgt größtenteils anhand der Proteinsequenzlänge von typischerweise 250 beziehungsweise 350 Aminosäuren (Jörnvall *et al.*, 1995). Häufig bilden sie multimere Komplexe aus (Kallberg *et al.*, 2002).

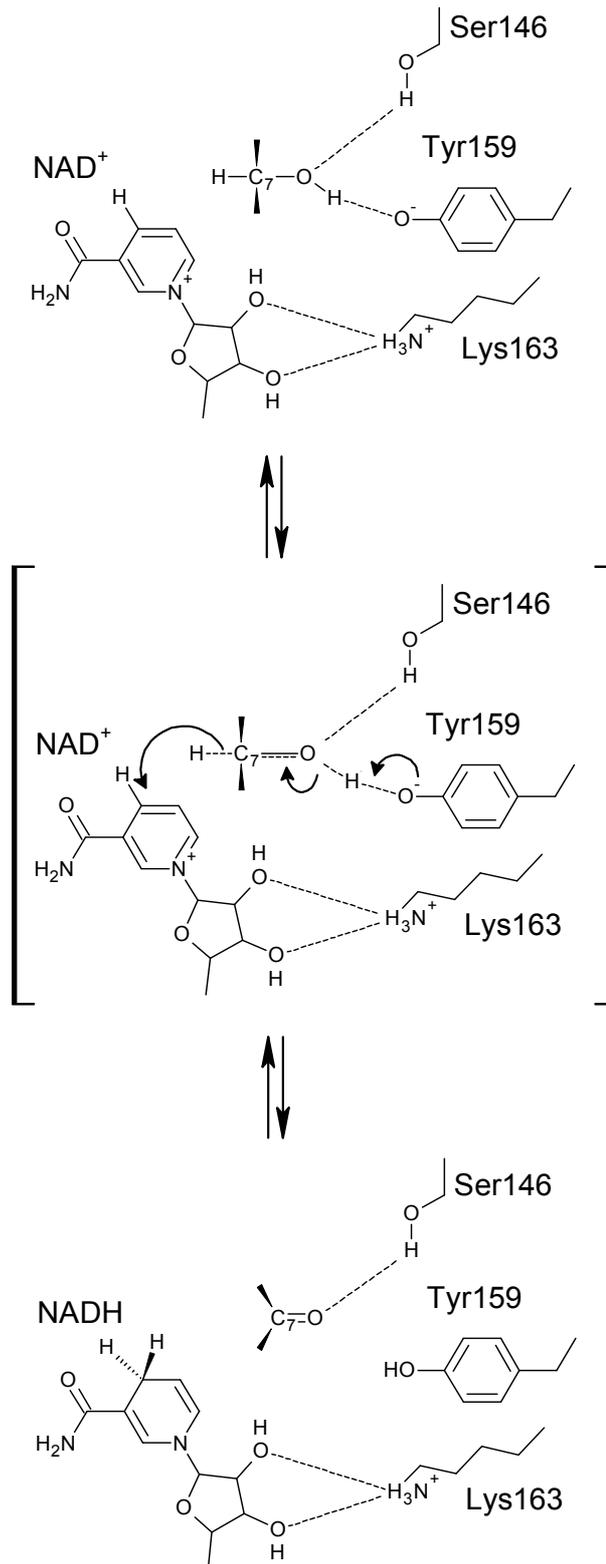


Abbildung 3.9: Postulierter Katalysemechanismus der 7 α -Dehydrogenisierung durch die 7 α -HSDH von *E. coli* (nach Tanaka *et al.*, 1996).

Der katalytische Mechanismus der Short Chain Dehydrogenase / Reduktasen wird durch eine katalytische Triade bestehend aus den Aminosäuren Serin, Tyrosin und Lysin beschrieben,

welche sich im Bereich des β 5-Stranges und der α 5-Helix befinden (Ghosh *et al.*, 1994; Oppermann *et al.*, 1997). Der Katalysemechanismus einer 7α -HSDH aus *E. coli* ist in Abbildung 3.9 dargestellt, wie er von Tanaka *et al.* (1996) basierend auf einer Kristallstruktur und gerichteter Mutagenese der Aminosäuren des aktiven Zentrums postuliert wurde. Die Bindung des Gallensalzes führt zu einer Konformationsänderung im C-terminalen Bereich. Anschließend wird vermutet, dass Tyr159 als katalytische Base den Wasserstoff der Hydroxylgruppe an C-7 entfernt, wobei die Wasserstoffbrücke über Ser146 zur Stabilisierung des Zwischenprodukts dient. Der Katalysator wird anschließend wiederhergestellt, indem das Hydrid auf Lys163 und dann NAD^+ übertragen wird. Zusätzlich ist Lys163 an der Bindung von NAD^+ beteiligt (Tanaka *et al.*, 1996; Ridlon *et al.*, 2006).

Außerdem wird bei Short Chain Dehydrogenase / Reduktasen häufig ein konservierter Asparaginrest in der α 4-Helix gefunden, welcher an der katalytischen Aktivität beteiligt ist. Deshalb wird auch von einer katalytischen Tetrade ausgegangen (Oppermann *et al.*, 2003).

Eine Unterscheidung lässt sich zudem in NADH- und NADPH-abhängige Short Chain Dehydrogenase / Reduktasen vornehmen. Sequenzvergleiche zeigen am C-terminalen Bereich des β 2-Stranges oder kurz dahinter bei NADH-abhängigen Enzymen meist eine saure Aminosäure, vor allem Aspartat und Glutamat. Bei NADPH-abhängigen Short Chain Dehydrogenase / Reduktasen lässt sich direkt nach dem β 2-Strang meist eine basische Aminosäure wie Arginin oder Lysin finden (Persson *et al.*, 2003).

3.3.3 Wichtige Hydroxysteroiddehydrogenasen zur biokatalytischen Synthese von Ursodesoxycholsäure

Im Folgenden sollen Hydroxysteroiddehydrogenasen beschrieben werden, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind. Nach Sutherland *et al.* (1982) und Monti *et al.* (2009) können mittels Einsatz verschiedener Hydroxysteroiddehydrogenasen Teilschritte der chemischen Synthese von Ursodesoxycholsäure ersetzt werden.

3 α -Hydroxysteroiddehydrogenasen

Die Oxidation beziehungsweise Reduktion an Position 3 des Steroidgrundgerüsts werden von 3α -HSDH katalysiert. Sie können beispielsweise in *Clostridium perfringens* (Macdonald *et al.*, 1976), *Peptostreptococcus productus* (Edenharder *et al.*, 1989) gefunden werden, wurden aber auch aus dem nicht im Darm lebenden *Comamonas testosteroni* isoliert (Skålhegg, 1974). Sie nutzen NADH als Kofaktor mit wenigen Ausnahmen wie der 3α -HSDH aus *Clostridium perfringens* (Macdonald *et al.*, 1976). 3α -HSDH werden entweder konstitutiv oder

nach Induktion mittels primärer Gallensalze wie Cholsäure oder Chenodesoxycholsäure exprimiert (Gopal-Srivastava *et al.*, 1990; Ridlon *et al.*, 2006).

Die 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni* konnte bereits erfolgreich heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Dabei zeigte das Enzym ein breites Substratspektrum, einerseits von natürlich vorkommenden Steroiden, als auch nicht-steroidalen Carbonylkomponenten (Maser *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte die Kristallstruktur dieses Enzymes im binären Komplex mit NAD⁺ aufgeklärt werden (Grimm *et al.*, 2000).

7 α -Hydroxysteroiddehydrogenasen

7 α -HSDH oxidieren reversibel α -Hydroxylgruppen an C-7 am Steroidgrundgerüst. Sie sind weitverbreitet unter den Bacteroiden und Clostridien, als auch in *E. coli* und *Ruminococcus* sp. (Macdonald *et al.*, 1976; Yoshimoto *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 2003). Oft ist die 7 α -HSDH-Genregulation wachstumsabhängig und mithilfe von Gallensalzen induzierbar. Bei *E. coli* hingegen erfolgt die Expression konstitutiv und nicht gallensalzabhängig (Prabha *et al.*, 1989). Zur Biokatalyse nutzen sie im Allgemeinen NADPH als Kofaktor mit wenigen Ausnahmen wie beispielsweise der 7 α -HSDH aus *E. coli* (Prabha *et al.*, 1989). 7 α -HSDH weisen meist eine höhere Affinität für Dihydroxyl- gegenüber Trihydroxylgallensalze auf (Ridlon *et al.*, 2006).

Die Kristallstruktur des binären und ternären Komplexes einer 7 α -HSDH aus *E. coli* mit gebundenem NADH und 7-Ketoglyco-Chenodesoxycholsäure konnte aufgeklärt werden. Dabei wurde auch ein Mechanismus für die 7 α -Dehydrogenisierung vorgeschlagen, welcher bereits in Abbildung 3.9 vorgestellt wurde (Tanaka *et al.*, 1996).

7 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen

Die Oxidation von 7 β -Hydroxylgruppen, sowie die Reduktion von 7-Keto-Gruppen am Steroidgrundgerüst, werden von 7 β -HSDH katalysiert, wobei sie hauptsächlich NADPH als Kofaktor nutzen. Vertreter der 7 β -HSDH lassen sich beispielsweise in *Peptostreptococcus productus* und *Collinsella aerofaciens* finden (Hirano & Masuda, 1982; Edenharder *et al.*, 1989). In *Xanthomonas maltophilia* wurde ein NADH-abhängiger Vertreter entdeckt (Medici *et al.*, 2002). Oft kommen 7 β -HSDH gemeinsam mit 7 α -HSDH vor, so dass diese Mikroorganismen die Epimerisierung von Hydroxylgruppen an C-7 durchführen können. Dies ist beispielsweise für die Stämme *Clostridium limosum* (Sutherland & Williams, 1985) und *Clostridium absonum* (Macdonald & Roach, 1981) beschrieben.

Kürzlich konnte erstmals die Sequenz einer 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* DSM 3979 aufgeklärt und das Genprodukt heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Es wird eine Zugehörig-

keit auf Grund von Sequenzvergleichen zu der Short Chain Dehydrogenase / Reduktasen-Familie vermutet. Die Oxidation von Ursodesoxycholsäure zu 7-Keto-Lithocholsäure, als auch die Rückreaktion konnte in Anwesenheit von NADP(H) gezeigt werden (Liu *et al.*, 2011).

12 α -Hydroxysteroiddehydrogenasen

12 α -HSDH katalysieren die Oxidation von 12 α -Hydroxylgruppen am Steroidgrundgerüst, sowie deren Rückreaktion. 12 α -HSDH gehören der Enzymklasse EC 1.1.1.176 an und werden hauptsächlich in der Gattung *Clostridium* gefunden (Ridlon *et al.*, 2006). Es wurden sowohl NADP⁺- (Harris & Hylemon, 1978), als auch NAD⁺-abhängige Vertreter (Macdonald *et al.*, 1977) beschrieben.

Clostridium group P, strain C 48–50 stellt einen seltenen Organismus dar, der eine hohe 12 α -HSDH-Aktivität in Abwesenheit anderer Hydroxysteroiddehydrogenasen aufweist (Macdonald *et al.*, 1979). Aus diesem Grund wurde dieser Organismus als Wildtyp-Produzent von 12 α -HSDH eingesetzt. Hierfür ist jedoch eine anspruchsvolle, anaerobe Fermentation mit kostenintensivem Medium nötig. Letzteres konnte allerdings durch Hefeautolysat ersetzt werden (Braun *et al.*, 1991). In diesen Arbeiten wurde die 12 α -HSDH aufgereinigt und genauer charakterisiert. Braun *et al.* (1991) konnten mittels nativer und SDS-PAGE, isoelektrischer Fokussierung und Elektronenmikroskopie zeigen, dass die 12 α -HSDH als Homotetramer vorliegt, deren Untereinheit 26 kDa aufweist. Das pH-Optimum wurde bei pH 8,5 – 9,5 festgestellt und die N-terminale Sequenz mittels Edman-Abbau bestimmt. Die 12 α -HSDH aus *Clostridium* group P, strain C 48–50 wurde bereits zur Synthese von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure eingesetzt, wobei eine Inhibition durch das Produkt beobachtet wurde (Fossati *et al.*, 2006). In Abbildung 3.10 wird der Einsatz einer 12 α -HSDH zur Synthese von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure dargestellt. Der biokatalytische Weg spart drei Verfahrensschritte in der Synthese von Ursodesoxycholsäure ein.

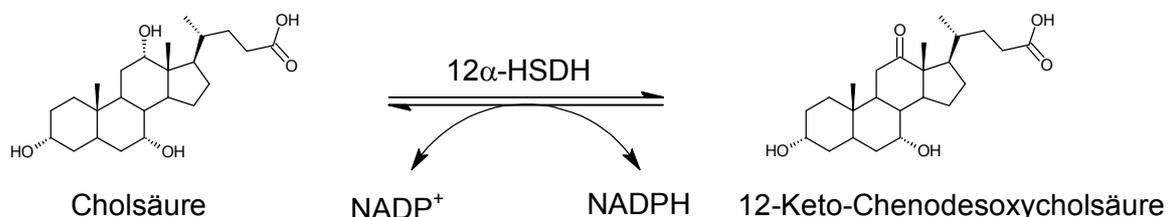


Abbildung 3.10: 12 α -HSDH-katalysierte Umsetzung von Cholsäure zu 12-Keto-Chenodesoxycholsäure.

Kürzlich konnte die vollständige Nukleotid- und Proteinsequenz der 12 α -HSDH aufgeklärt, sowie erstmals eine rekombinante Herstellung des Enzyms in *E. coli* realisiert werden (Braun, 2008). Auf diese Weise kann die aufwändige Kultivierung des Ausgangsstamms umgangen werden.

3.4 Enzymatische Synthesen

Der Einsatz von biokatalytischen Prozessen zur Synthese von Naturprodukten, pharmazeutischen Wirkstoffen und anderen organischen Stoffen hat die Akzeptanz von Enzymen in der organischen Chemie erhöht. Daher lassen sie sich bei verschiedenen industriellen Anwendungen finden (Aehle, 2004).

3.4.1 Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese

Enzyme finden seit mehr als hundert Jahren Anwendung in der organischen Synthese, da sie als umweltfreundliche und sichere Alternative zu chemischen Prozessen gesehen werden (Buchholz *et al.*, 2005). Dank der Identifikation immer neuerer Biokatalysatoren und deren Charakterisierung, sowie der Fortschritte auf dem Gebiet der rekombinanten DNA-Technologie, des *Protein Engineering* und *Enzyme Engineering* erfährt die Biokatalyse einen Aufschwung in der industriellen Anwendung (Schmid *et al.*, 2001; Aehle, 2004). Des Weiteren bieten Durchmusterungen im Hochdurchsatzverfahren eine effiziente Methode zur Verbesserung von Enzymen (Aehle, 2004).

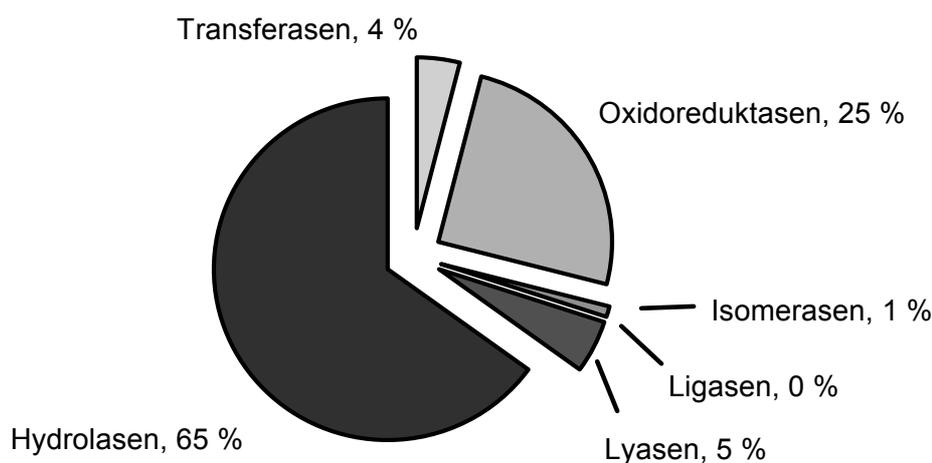


Abbildung 3.11: Verteilung der in der organischen Synthese eingesetzten Enzymklassen (nach Jeromin & Bertau, 2005).

Die wichtigste Rolle bei industriellen Enzymprozessen spielen Hydrolasen, welche beispielsweise zum Abbau von Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten eingesetzt werden (Liese *et al.*, 2006), da sie ohne den Zusatz von teuren Kofaktoren auskommen. Oxidoreduktasen sind an 25 % der organischen Synthesen beteiligt, wie in Abbildung 3.11 dargestellt ist (Jeromin & Bertau, 2005).

3.4.2 Vorteile von enzymbasierten Synthesen

Vergleicht man chemische mit biokatalytischen Reaktionen, fällt auf, dass Enzyme bei milden Bedingungen eingesetzt werden können. Sie arbeiten im Gegensatz zu vielen chemischen Katalysatoren in einem Temperaturbereich von 20 – 40 °C in wässrigen Lösungen bei Atmosphärendruck. Der pH liegt meist im neutralen Bereich von 5 – 8 (Aehle, 2004). Dabei können Kosten für Energie und chemische Lösungsmittel eingespart, und die Bildung von Nebenprodukten wie beispielsweise durch Isomerisierungen und Racemisierungen vermieden werden (Faber, 2004; Jeromin & Bertau, 2005). Ist der Einsatz von Lösungsmitteln notwendig oder angebracht, ist die Anwendung von Enzymen nicht ausgeschlossen. Viele Enzyme wurden mittlerweile identifiziert, die organische Lösungsmittel tolerieren und dort völlig neue Reaktionen katalysieren (Klibanov, 2001; Schmid *et al.*, 2001). Bei der chemischen Katalyse werden zudem häufig umweltschädigenden Stoffe wie Schwermetalle benötigt (Jeromin & Bertau, 2005; Liese *et al.*, 2006).

Auf Grund ähnlicher Arbeitsbedingungen für verschiedene Enzyme, können Biokatalysatoren im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren für Multienzymreaktionen im Einschrittverfahren eingesetzt werden, wie es bereits für die Synthese von 12-Keto-Ursodesoxycholsäure gezeigt wurde (Monti *et al.*, 2009). Auch konsekutiv durchgeführte Enzymreaktionen erlauben die sequentielle Umsetzung von Intermediaten, ohne diese zwischenzeitlich aufzureinigen. Außerdem können Enzymreaktionen über Intermediate gekoppelt werden, wodurch ein günstiges thermodynamisches Gleichgewicht der Gesamtreaktion entsteht (Faber, 2004; Liese *et al.*, 2006).

Des Weiteren stellen Enzyme hoch effiziente Katalysatoren dar, die Reaktionen um den Faktor $10^5 - 10^{12}$ gegenüber die nichtkatalysierten Reaktion beschleunigen (Aehle, 2004). Während chemische Katalysatoren häufig einen molaren Anteil von 0,1 – 1 % bei Reaktionen aufweisen, ist dieser Anteil bei der Verwendung von Enzymen deutlich um mehrere Größenordnungen ($10^{-3} - 10^{-4}$ %) reduziert (Faber, 2004).

Ein wichtiger Vorteil von Enzymen besteht darin, dass sie eine hohe Chemoselektivität mit einem breiten Substratspektrum aufweisen (Aehle, 2004). Dabei setzen sie häufig nicht nur ihre natürlichen Substrate, sondern auch nicht-natürliche um (Schoemaker, 2003; Faber,

2004). Zusätzlich offenbaren Enzyme einen hohen Grad an Regio- und Stereoselektivität für die katalysierte Reaktion. Gerade die enantioselektiven Eigenschaften führten zu dem verstärkten Gebrauch von Enzymen in der organischen Synthese (Aehle, 2004).

Auf Grund der hohen Regio- und Stereoselektivität können Enzyme die Anzahl von chemischen Syntheseschritten in Prozessen reduzieren, da auf eine aufwändige Schutzgruppenchemie verzichtet werden kann (Carrea *et al.*, 1985). Neben der Effizienz spielen dabei auch die Umweltaspekte eine Rolle (Petersen & Kiener, 1999). Dabei bietet der Enzymeinsatz Möglichkeiten für Reaktionen, die mittels organischer Chemie nur schwer zu realisieren sind (Petersen & Kiener, 1999).

3.4.3 Nachteile von enzymbasierten Synthesen

Obwohl Enzyme gegenüber chemischen Katalysatoren viele Vorteile aufweisen, werden oft verschiedene Entgegenhaltungen zu deren Verwendung aufgeführt. Ein Gesichtspunkt stellt diesbezüglich die natürliche Herkunft der Enzyme dar. Da in der Natur fast ausschließlich L-Aminosäuren existieren, können nicht einfach Spiegelbilder des Enzymes eingesetzt werden, um ein anderes Enantiomer herzustellen (Faber, 2004). Bei chemischen Katalysatoren ist es hingegen möglich, durch Verwendung einer anderen enantiomeren Form des Katalysators, das entsprechend andere Enantiomer herzustellen (Faber, 2004). Ein Beispiel stellt die Verwendung von 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP) dar. Je nach Wahl von (*R*)- oder (*S*)-BINAP kann ein anderes Enantiomer produziert werden (Wyatt & Warren, 2007). Da bisher kein Zugang zu Enzymen aus D-Aminosäuren besteht, müssen für verschiedene Enantiomere neue Enzyme mit den gegenteiligen stereochemischen Eigenschaften gesucht werden (Faber, 2004). Fortschritte auf dem Gebiet des *Protein Engineering* können jedoch beim Zugang entsprechender Enzyme helfen. Für den Fall einer Hydantoinase konnte mittels Methoden des Protein Engineering die (*R*)-Selektivität in eine (*S*)-Selektivität verändert werden (May *et al.*, 2000).

Ein weiterer Nachteil wird häufig in den eingeschränkten Arbeitsbedingungen gesehen. Enzyme arbeiten zumeist unter milden Bedingungen. Hat eine Reaktion allerdings andere Anforderungen, bieten Enzyme nur einen geringen Spielraum zur Änderung der Parameter. In diesem Zusammenhang wird die eingeschränkte Stabilität von Enzymen gesehen, welche bei erhöhten Temperaturen, extremen pH und hohen Salzkonzentrationen denaturieren (Faber, 2004). Jedoch können bei der Suche neuer Enzyme entsprechende Parameter berücksichtigt werden. Beispielsweise wurden in hyperthermophilen Organismen Proteine identifiziert, die bei über 100 °C aktiv sind (Adams, 1993). Außerdem bieten beispielsweise Methoden des

Protein Engineering (3.4.5) Möglichkeiten an, Prozessstabilitäten von Enzymen zu verbessern, sowie deren pH- und Temperaturoptima zu verändern (Schoemaker, 2003).

Des Weiteren ist die Stabilität von Enzymen in organischen Lösungsmitteln meist deutlich reduziert. Viele Enzyme entfalten ihre Aktivität in wässriger Lösung, die auf Grund ihres hohen Siedepunkts und hohen Dampfdrucks, sowie ungeeigneter Lösungsbedingungen für verschiedene Substrate häufig ungern eingesetzt werden (Faber, 2004). Aber auch für die Anwendung in organischen Lösungsmitteln wurden Enzyme identifiziert, die in nicht-wässrigen oder Lösungen mit geringem Wasseranteil eingesetzt werden (Gupta & Khare, 2009).

Häufig unterliegen Enzyme verschiedenen inhibierenden Effekten. Hierzu zählen beispielsweise Hemmungen der Aktivität durch das Substrat beziehungsweise das entstehende Produkt, weshalb solche Enzyme bei hohen Substrat- beziehungsweise Produktkonzentrationen nur geringe Aktivitäten aufweisen und dadurch einen effizienten Prozess verhindern (Faber, 2004). Substratüberschusshemmungen lassen sich relativ leicht mittels Zudosierungsverfahren umgehen, wodurch die Substratkonzentration im Reaktionsmedium gering gehalten wird. Produktinhibierungen stellen ein schwerwiegenderes Problem dar, welches sich beispielsweise mittels kontinuierlicher Extraktion des Produkts lösen lässt (Faber, 2004).

Die limitierte Anzahl an verfügbaren Biokatalysatoren stellt eine weitere Hemmnis gegenüber der Biokatalyse dar. Zwar steigt die Menge an kommerziell verfügbaren Enzymen stetig an, so dass für jede denkbare Reaktion Enzyme gefunden werden. Jedoch existieren nicht für alle chemischen Umsetzungen geeignete Enzyme (Bommarius & Riebel, 2004). Aus diesem Grund stellt die Erforschung neuer Biodiversitäten beispielsweise mittels Metagenomdurchmusterungen ein wichtiges Werkzeug dar (Ferrer *et al.*, 2010), genauso wie die Entwicklung neuer Enzymvarianten mittels *Protein Engineering*. Auch die bessere Charakterisierung bekannter Enzyme kann katalytische Promiskuitäten aufweisen, und so das Spektrum möglicher Reaktionen erweitern. So konnte beispielsweise die Henry-Reaktion mit einer Hydroxynitrillyase bewerkstelligt werden (Purkarthofer *et al.*, 2006).

Viele Enzymreaktionen sind kofaktorabhängig, welche häufig stöchiometrisch verbraucht werden, wie beispielsweise NAD(P)H bei Dehydrogenasen. Dies macht sich bei der Verteilung verwendeter Enzyme in Abbildung 3.11 bemerkbar, bei denen Hydrolasen am häufigsten Anwendung finden, da sie keine Kofaktoren benötigen. Jedoch wurden auf diesem Gebiet deutliche Fortschritte gemacht, so dass dies zwar eine Herausforderung darstellt, welche aber bereits erfolgreich bewältigt wurde (Bommarius & Riebel, 2004). Kofaktoren können regeneriert werden (van der Donk & Zhao, 2003), was bei Verwendung ganzer Zellen nicht nötig ist (Faber, 2004). Außerdem konnte die Zyklenzahl mittels Molmassenvergrößerung von NADH zu Polyethylenglykol-NADH erhöht werden (Wichmann *et al.*, 1981).

3.4.4 Verwendung isolierter Enzyme oder ganzer Zellen

Enzyme können in verschiedenen Formen eingesetzt werden. Ob Enzyme isoliert, in verschiedenen Reinheitsgraden, oder als Ganzzellensysteme, in freier oder immobilisierter Form, zur Anwendung kommen, hängt von vielen Faktoren ab. Dazu zählen die Art der Reaktion, die Kofaktorabhängigkeit und der Reaktionsmaßstab (Faber, 2004). Einige Vor- und Nachteile zur Entscheidungsfindung sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

In Anbetracht industrieller Interessen stellen das Vorhandensein intrazellulärer Kofaktoren und der Schutz der Enzyme vor extrazellulären Einflüssen gewichtige Vorteile des Ganzzellensystems mit Dehydrogenasen dar (Carballeira *et al.*, 2009). Außerdem werden ganze Zellen gegenüber isolierten Enzymen bei der Entwicklung multienzymatischer Prozesse bevorzugt, da Fortschritte in der Selektion, *Metabolic Engineering* und gerichteten Evolution die Erzeugung sogenannter „*Designer Bugs*“ erlauben (Carballeira *et al.*, 2009).

Tabelle 3.2: Vor- und Nachteil von Biotransformationen mit ganzen Zellen oder isolierten Enzymen (nach Peters, 1998)

Merkmal	Ganze Zellen	enzymatisch
Verfügbarkeit	gut	oft limitiert
Reaktionsbedingungen	mild	mild
Enantioselektivität	mittel – hoch	hoch
Reproduzierbarkeit	variabel	konstant
Konkurrierende Enzyme	ja	nein
Nebenprodukte	häufig	selten – keine
Permeabilität/ Stofftransport	limitierend	nicht-limitierend
Effektive Kofaktorkonzentration	unbekannt	definiert
Katalysatorkosten	gering	mittel – hoch
Produktivität	gering	mittel – hoch
Substratkonzentration	gering	mittel – hoch
Produktaufarbeitung	erschwert	einfach
Kompatibilität mit organischen Lösungsmitteln	evtl. zytotoxisch	evtl. denaturierend

3.4.5 Veränderung von Enzymeigenschaften mittels *Protein Engineering*

Mit Hilfe der verschiedenen Methoden des *Protein Engineering* ist es möglich, jede Aminosäure der Proteinsequenz gegen eine andere Aminosäure auszutauschen, welche sich in ihren Charakteristika unterscheiden. Auf diese Weise können verschiedene Eigenschaften des Proteins verändert werden, wie beispielsweise die Stabilität, das Substratspektrum oder sogar die Enantioselektivität.

Das *Protein Engineering* lässt sich in zwei prinzipielle Strategien unterteilen: das Rationale Protein Design und die gerichtete Evolution. Während bei beiden Methoden Mutationen in die entsprechenden Gensequenzen eingeführt werden, entscheiden verschiedene Kriterien über den Einsatz der jeweiligen Strategie. Diese hängen hauptsächlich von der Laborausstattung und dem Wissen über das untersuchte Enzym ab (Liese *et al.*, 2006). Beide Methoden sind in Tabelle 3.3 gegenübergestellt

Rationales Proteindesign

Wie in Tabelle 3.3 beschrieben, werden beim Rationalen Protein Design Informationen über die Proteinstruktur benötigt. Die mittels Röntgenbeugung oder NMR-Spektroskopie aufgeklärten Protein- und Peptidstrukturen erreichte Mai 2005 eine Anzahl von 30800, wodurch das Wissen über den Aufbau und Funktionalität der Enzyme beträchtlich angestiegen ist (Liese *et al.*, 2006). Viele dieser Strukturen sind im Internet verfügbar (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (Berman *et al.*, 2000).

Der gezielte Austausch einzelner Aminosäuren wird positionsgerichtete Mutagenese genannt. Hierfür kommen hauptsächlich Polymerasekettenreaktion- Methoden zum Einsatz, um die gewünschte Mutation in die Gensequenz einzubauen (Bommarius & Riebel, 2004).

Mithilfe des Rationalen Protein Designs kann beispielsweise die Substratselektivität eines Enzyms verändert werden. So wurde eine Lactatdehydrogenase durch drei Aminosäuresubstitutionen zu einer hochaktiven Malatdehydrogenase umfunktioniert, wobei Kenntnisse über die Proteinstruktur vorlagen und *in silico* Modellierungen der Substrat und Koenzymbindung durchgeführt wurden (Wilks *et al.*, 1988).

Die Serinprotease Subtilisin wird häufig wegen ihrer breiten Substratspezifität als Waschmittelprotease eingesetzt. Das in Waschmitteln eingesetzte Wasserstoffperoxid zur oxidativen Bleichung führt jedoch zu einer Denaturierung des nativen Subtilisins (Bommarius & Riebel, 2004). Mittels positionsgerichteter Mutagenese der Aminosäure Met222 zu Alanin oder Serin, konnte eine erhöhte Oxidationsstabilität erreicht werden (Estell *et al.*, 1985).

Tabelle 3.3: Gegenüberstellung des rationalen Proteindesigns und der gerichteten Evolution (nach Liese *et al.*, 2006)

Kriterium	Rationales Proteindesign	Gerichtete Evolution
Anforderungen	<ul style="list-style-type: none"> • 3D-Struktur oder Strukturmodell, Alignments • Kenntnis des Reaktionsmechanismus und beteiligter Aminosäuren • Modell der Enzym-Substratinteraktion 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine oder wenige Informationen über Struktur oder Reaktionsmechanismus notwendig • Hochdurchsatzverfahren oder Selektionsmöglichkeit zur Analyse der Proteineigenschaften notwendig
Experimentelle Methoden	Positionsgeschichtete Mutagenese	Nicht-rekombinante oder rekombinante Zufallsmutagenese
Benötigte Diversität	Gering	Hoch

Auch die Kofaktorspezifität von Dehydrogenasen ist im Fokus des Rationalen Protein Designs, da es einige Vorteile gibt, mit NAD(H)-abhängigen Enzymen zu arbeiten, gegenüber denjenigen, welche NADP(H) benötigen. Hierzu zählen die höheren Kosten von NADP⁺, welche um eine Größenordnung höher liegen als für NAD⁺, sowie die höhere Stabilität von NAD⁺ gegenüber NADP⁺ bei gleichen pH (Chenault & Whitesides, 1987; Bommarius & Riebel, 2004). Das Redesign von NADP(H)- zu NAD(H)-abhängigen Dehydrogenasen wurde in der Literatur für eine Glutathion- (Scrutton *et al.*, 1990) und eine Isocitratdehydrogenase (Yaoi *et al.*, 1996) beschrieben, wobei die Aktivitäten reduziert wurden. Persson *et al.* (2003) gehen davon aus, dass bei klassischen Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen die Anwesenheit von Aspartat am Ende des β 2-Stranges über die Kofaktorpräferenz entscheidet. Die Umstellung von NAD(H) auf NADP(H) ist hingegen häufiger erfolgreich, wie es für eine Laktatdehydrogenase und eine Leucindehydrogenase durchgeführt werden konnte (Galkin *et al.*, 1997; Holmberg *et al.*, 1999; Bommarius & Riebel, 2004).

Zufallsmutagenese und gerichtete Evolution

Evolution bedeutet nach dem Darwin-Konzept die Variation von Individuen und anschließende natürliche Auslese. Im Labor kann diese Prozedur *in vitro* zur Optimierung von bekannten Enzymen nachempfunden werden, wobei der Zeitraum von Millionen Jahren auf wenige Monate oder Wochen reduziert werden kann (Liese *et al.*, 2006). Dabei handelt es sich um die Erstellung molekularer Diversität, beispielsweise durch Mutantenbibliotheken, und anschließende Selektion verbesserter Enzymvarianten, welche wiederum als Ausgangspunkt erneuter

Variation dienen. Mehrmaliges Durchlaufen dieses Prozesses resultiert in immer weiter optimierten Enzymvarianten (Carballeira *et al.*, 2009), wie es typischerweise in Abbildung 3.12 dargestellt ist. Von „gerichteter“ Evolution spricht man deshalb, weil die Auslese nicht natürlich erfolgt, sondern festgelegt ist.

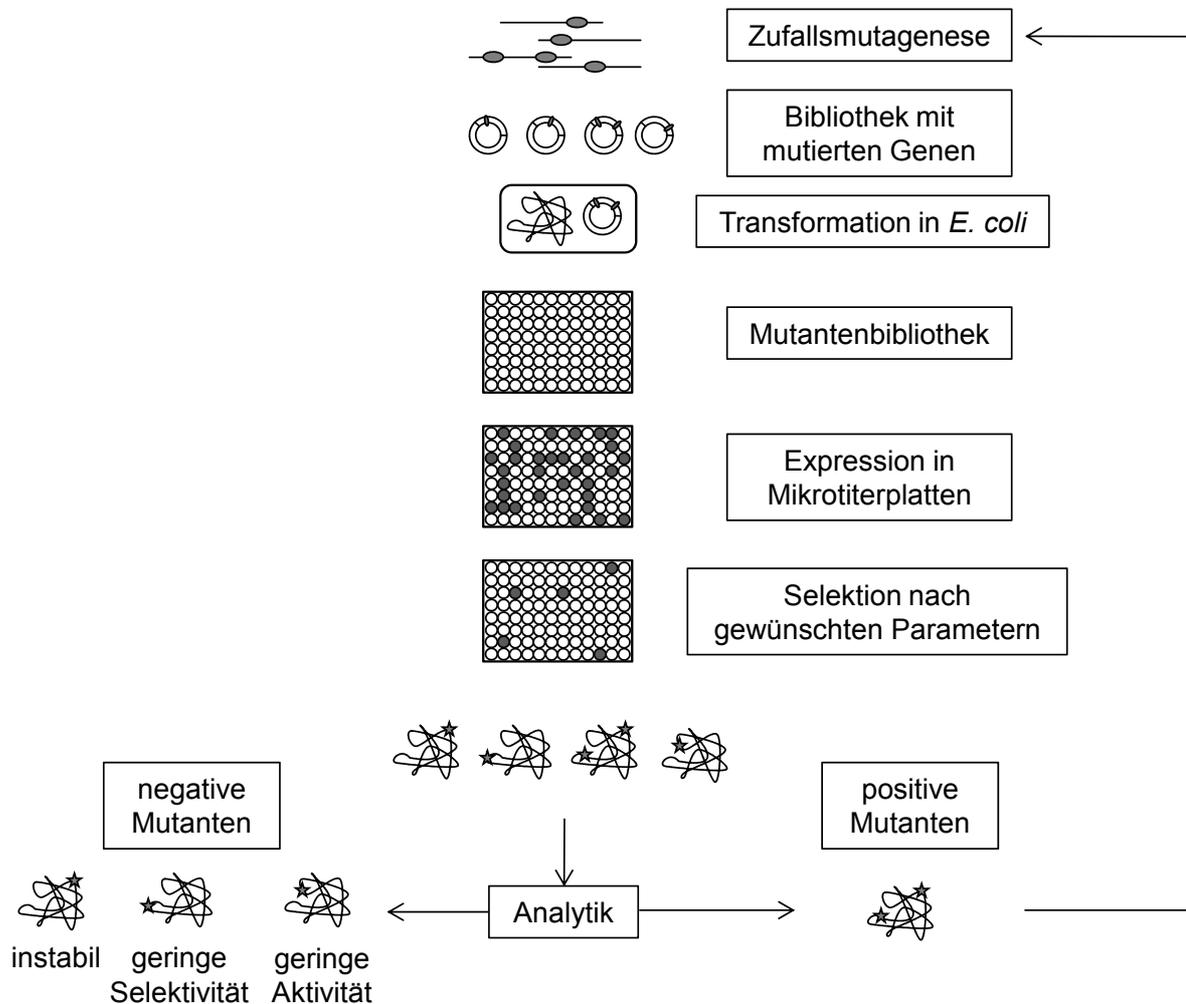


Abbildung 3.12: Zyklus der gerichteten Evolution (nach Bornscheuer & Pohl, 2001). Mittels Zufallsmutagenese erzeugte Genvarianten werden in Vektoren eingebracht, welche in *E. coli* zur Erzeugung einer Mutantenbibliothek transformiert werden. Nach Expression der Enzymvarianten in Mikrotiterplatten erfolgt eine Selektion nach gewünschten Eigenschaften. Ausgewählte Mutanten werden anschließend genauer analysiert, wobei positive Mutanten erneut dem Prozess zugeführt werden.

Es existieren verschiedene Möglichkeiten zufällige Mutationen in eine Gensequenz einzubringen, die in nicht-rekombinante und rekombinante Methoden eingeteilt werden können (Carballeira *et al.*, 2009). Nicht-rekombinante Methoden werden in der Regel dann eingesetzt, wenn nur geringfügige Änderungen am Protein erfolgen sollen. Die Einführung von Punktmutationen kann dabei mittels fehlerbehafteter PCR (*error-prone* PCR, epPCR) erfolgen. Hierbei wird das PCR-Protokoll zur Amplifikation so verändert, dass die Fehlerrate der PCR-

Polymerase zusätzlich zur fehlenden Korrekturlesefunktion erhöht ist, was beispielsweise mithilfe von Mangan- statt Magnesiumionenzugabe als PCR-Polymerase-Aktivatoren bewerkstelligt werden kann (You & Arnold, 1996; Bommarium & Riebel, 2004). Über die Mn^{2+} -Konzentrationen kann die Fehlerrate je nach Wunsch zwischen 0 – 10 % eingestellt werden (Vartanian *et al.*, 1996).

Rekombinante Mutageneseverfahren führen in der Regel zu stark veränderten Gensequenzen. Beim DNA *Shuffling* werden mehrere verwandte DNA-Sequenzen an einigen Positionen zufällig mittels DNaseI geschnitten. Die Fragmente werden anschließend *in vitro* zur Ausgangslänge mittels PCR rekombiniert (Stemmer, 1994; Liese *et al.*, 2006). Neben dem DNA *Shuffling* existieren weitere effiziente rekombinante Methoden, die beispielsweise mit einer geringeren Sequenzidentität auskommen (Zhao *et al.*, 1998; Kurtzman *et al.*, 2001).

In der Literatur sind vielfältige erfolgreiche Beispiele der gerichteten Evolution beschrieben (Bommarium & Riebel, 2004; Böttcher & Bornscheuer, 2010). So konnte beispielsweise die spezifische Aktivität einer Alkoholdehydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* mittels epPCR zur Produktion von (2S, 5S)-Hexandiol bei moderaten Temperaturen um das 10-fache gesteigert werden (Machielsen *et al.*, 2008). Ebenso führte die Verknüpfung von positionsgerichteter Mutagenese und Zufallsmutagenese zu einer 11,4-fach höheren Expression einer Laccase in *E. coli*, sowie zu einer Steigerung ihrer Aktivität (Koschorreck *et al.*, 2009). Auch die Enantioselektivität einer Baeyer-Villiger Monooxygenase konnte mittels epPCR und anschließender positionsgerichteter Mutagenese verbessert werden (Kirschner & Bornscheuer, 2008).

3.5 Kofaktorregenerierung

Für ihre katalytische Aktivität benötigen Oxidoreduktasen im Gegensatz zu Hydrolasen, Transferasen, Isomerasen und Lyasen verschiedene Kofaktoren zum Transport von Hydridionen, wie NADH oder NADPH. Oxidoreduktasen katalysieren dabei den Übergang eines Hydridions des Nikotinamid-Kofaktors auf einen Carbonylkohlenstoff des Substrats. Der Kofaktor wird dabei oxidiert und steht nicht mehr für weitere Reduktionen zur Verfügung. Da NAD(P)H jedoch komplex, instabil und sehr teuer sind, können diese Kofaktoren aus ökonomischen Gründen nicht in stöchiometrischen Verhältnissen eingesetzt werden (Chenault & Whitesides, 1987). Daher ist es für industrielle Einsätze erforderlich, diese Kofaktoren *in situ* zu regenerieren. Für diesen Zweck sind mehrere Verfahren etabliert worden (van der Donk & Zhao, 2003; Wichmann & Vasic-Racki, 2005).

Die Verfahren wurden von Chenault & Whitesides (1987) in diverse Kategorien eingeteilt:

- biologisch
- enzymatisch

- elektrochemisch
- chemisch
- photochemisch.

Die Bewertung eines Verfahrens zur Kofaktorregenerierung erfolgt vor allem anhand der Anzahl, wie viele Moleküle des Produkts pro Molekül des eingesetzten Kofaktors hergestellt werden können (*total turnover number*, TTN). Für technische Prozesse sind dabei $TTN > 100 - 10000 \text{ mol mol}^{-1}$ notwendig (van der Donk & Zhao, 2003).

Chemische Kofaktorregenerierungssysteme benötigen kein zusätzliches Enzym zur Regenerierung, sondern im Allgemeinen günstige und kommerziell verfügbare Chemikalien, wie $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (Jones *et al.*, 1972; Wichmann & Vasic-Racki, 2005). Ebenfalls werden photo- und elektrochemische Methoden untersucht (Julliard & Le Petit, 1982; Obon *et al.*, 1997; van der Donk & Zhao, 2003; Wichmann & Vasic-Racki, 2005). Nachteilig wirken sich jedoch die geringe Selektivität, komplexen Apparaturen, geringen $TTN \leq 1000 \text{ mol mol}^{-1}$ und die limitierte Kompatibilität mit biologischen Systemen aus (Wichmann & Vasic-Racki, 2005).

In Ganzzellsystemen ist die zellinterne Kofaktorregeneration bei der asymmetrischen Reduktion von Ketonen in *Saccharomyces cerevisiae* bekannt (Crocq *et al.*, 1997). Dieser Weg zeichnet sich durch geringe Kosten, breite Substratazeptanz und konstante Qualität aus. Allerdings werden nachteilig geringe Produktivitäten, geringere Enantiomerenreinheiten und die Anfälligkeit des biologischen Systems gegenüber chemischen und biochemischen Reagenzien angeführt (Wichmann & Vasic-Racki, 2005).

Gegenüber den genannten Verfahren sind enzymatische Regenerierungsmethoden im Vergleich effizienter, hochselektiv und kompatibel mit enzymkatalysierten Synthesen, weshalb diese sehr häufig eingesetzt werden (Kroutil *et al.*, 2004a; Wichmann & Vasic-Racki, 2005). Der enzymatische Ansatz kann in zwei Gruppen, die substrat- und die enzymgekoppelte Methode, untergliedert werden.

3.5.1 Substratgekoppelter Ansatz

Bei der substratgekoppelten Regenerierung wird nur ein Enzym eingesetzt, welches sowohl die Haupt- als auch die Regenerationsreaktion übernimmt, wie in Abbildung 3.13 zu sehen ist. Als Substrat zur Regenerierung werden meistens organische Lösungsmittel eingesetzt. Die Wahl ist jedoch durch die Substratspezifität des Enzyms stark eingeschränkt. Das thermodynamische Gleichgewicht wird mittels Zugabe eines großen Überschusses des Kosubstrats in Richtung des Produkts verschoben, was jedoch zu einer Produktinhibierung führen kann (Kroutil *et al.*, 2004b).

Des Weiteren liegt das thermodynamische Gleichgewicht meist auf der Seite der Reduktionsreaktion (Faber, 2004). Dennoch wurde beispielsweise eine Pferdeleber-ADH und eine Alko-

Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* erfolgreich angewendet (Schubert *et al.*, 2002; Eckstein *et al.*, 2004).

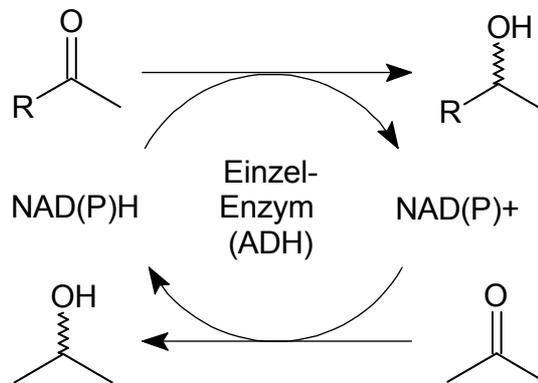


Abbildung 3.13: Substratgekoppelter Ansatz zur Kofaktorregenerierung von NAD(P)H. ADH: Alkoholdehydrogenase

3.5.2 Enzymgekoppelter Ansatz

Bei der enzymgekoppelten Regenerierung wird das Kosubstrat über ein zusätzliches Enzym umgesetzt und so der benötigte Kofaktor regeneriert, wie in Abbildung 3.14 dargestellt ist. Voraussetzung ist, dass die eingesetzten Enzyme verschiedene Substratspektren besitzen, so dass beide Reaktionen unabhängig voneinander ablaufen können (Faber, 2004). Diese Strategie ist beispielsweise gut für NADH-Regenerierung mit Formiatdehydrogenasen (FDH, EC 1.2.1.2), Glucosedehydrogenasen (GDH, EC 1.1.1.47), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasen (G6PDH, EC 1.1.1.49) und Phosphitdehydrogenasen (PTDH, EC 1.20.1.1) beschrieben (van der Donk & Zhao, 2003; Faber, 2004; Wichmann & Vasic-Racki, 2005).

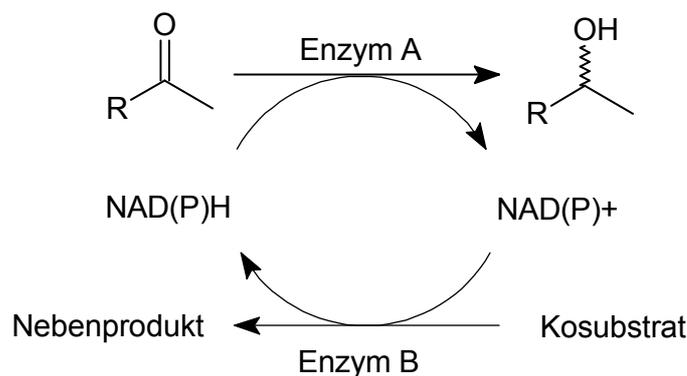


Abbildung 3.14: Enzymgekoppelter Ansatz zur Kofaktorregenerierung von NAD(P)H.

Im Allgemeinen sind mehr Systeme zur Regeneration von NADH im Gegensatz von NADPH bekannt (Faber, 2004). Des Weiteren ist die Regeneration von NADP⁺ gegenüber von NADPH

erschwert, da das Gleichgewicht von Nikotinamid-Kofaktor-abhängigen Dehydrogenasen auf der Seite der Reduktion liegt (Kroutil *et al.*, 2004a).

Nachteilig wirkt sich zum einen der Einsatz des zweiten Enzyms in der Weise aus, dass sich die Arbeitsbedingungen beider Enzyme womöglich signifikant unterscheiden. Des Weiteren sind diese Zwei-Enzym-Kinetiken komplizierter (Kroutil *et al.*, 2004a), wodurch eine kinetische Beschreibung eines solchen Prozesses deutlich erschwert wird.

3.5.3 Formiatdehydrogenasen

Der Einsatz von Formiatdehydrogenasen stellt den Goldstandard unter den enzymgekoppelten Ansätzen dar (van der Donk & Zhao, 2003). Sie katalysieren, wie in Abbildung 3.15 schematisch dargestellt, die Oxidation von kostengünstigem Formiat zu Kohlendioxid, welches entweicht und so die Reaktion in Richtung des Produkts treibt als auch den Prozess irreversibel macht. Zudem haben Formiat als auch das gebildete Nebenprodukt keine schädigenden Auswirkungen auf die eingesetzten Enzyme (van der Donk & Zhao, 2003). Aus diesen Gründen wird die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* bereits in der industriellen Produktion von L-*tert*-Leucin eingesetzt (Bommarius *et al.*, 1998).

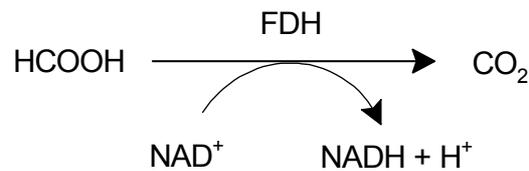


Abbildung 3.15: Formiatdehydrogenase (FDH)-katalysierte Reaktion zur Kofaktorregenerierung.

Als Nachteile werden die geringe spezifische Aktivität (Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*: 6,0 U mg⁻¹ Protein für NAD⁺ und Formiatdehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* N10: 10,0 U mg⁻¹ Protein für NAD⁺), sowie deren strenge NAD⁺-Präferenz und ihre chemische Sensitivität genannt (Slusarczyk *et al.*, 2000; van der Donk & Zhao, 2003; Tishkov & Popov, 2004). Deshalb sind Formiatdehydrogenasen Gegenstand viele Mutagenesestudien, um deren kinetischen Eigenschaften, chemische und thermische Stabilität, sowie Expression in *E. coli* zu verbessern (Tishkov & Popov, 2006). Obwohl native Formiatdehydrogenasen keine NADP⁺-Aktivität aufweisen, konnten mittels *Protein Engineering* Enzymvarianten der Formiatdehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas* sp. 101 und *Mycobacterium vaccae* N10 erzeugt werden, welche den Einsatz von Formiatdehydrogenasen zur Regenerierung von NADPH ermöglichen (Seelbach *et al.*, 1996; Serov *et al.*, 2002; Gebhardt, 2006). Die Enzymvariante der Formiatdehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* N10 weist die Mutation D221G auf, wodurch eine spezifische Aktivität zur Oxidation von

NADP⁺ erhalten wurde, die etwa 10 % der Wildtyp-Aktivität zu NAD⁺ erreicht. Zudem akzeptiert sie weiterhin NAD⁺ als Substrat (Gebhardt, 2006).

3.5.4 Alkoholdehydrogenasen

Auch Alkoholdehydrogenasen können zur enzymgekoppelten Regenerierung von NADP(H) eingesetzt werden. Die Isopropanol / Aceton-abhängigen Alkoholdehydrogenasen stammen beispielsweise aus *Lactobacillus brevis* (ADH-LB) und *Thermoanaerobium brockii* (ADH-TB) (Hummel, 1999; Kroutil *et al.*, 2004a; Wichmann & Vasic-Racki, 2005). Wie in Abbildung 3.16 zu erkennen ist, können je nach Wahl des Substrats entweder NADPH oder NADP⁺ regeneriert werden. Zumeist wird dieses System zur Regenerierung im substratgekoppelten Ansatz verwendet (Peters, 1998; Eckstein *et al.*, 2004).

Fossati *et al.* (2006) untersuchten den Einsatz verschiedener Alkoholdehydrogenasen zur Regeneration von NADP⁺, um mittels 12 α -HSDH 12-Keto-Chenodesoxycholsäure herzustellen. Unter Verwendung von 25 % (v/v) Aceton konnte eine TTN von etwa 1000 mol mol⁻¹ erreicht werden.

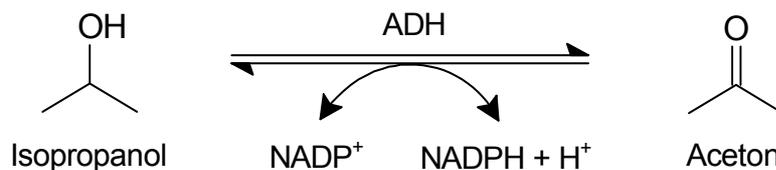


Abbildung 3.16: Alkoholdehydrogenase (ADH)-katalysierte Reaktion zur Regenerierung von NADP(H).

3.5.5 Glutamatdehydrogenasen

Die am meisten angewandte Methode zur Regenerierung von NADP⁺ umfasst den Einsatz der Glutamatdehydrogenase, welche die thermodynamisch günstige, reduktive Aminierung von 2-Oxoglutarat zu L-Glutamat katalysiert, wie sie in Abbildung 3.17 dargestellt ist (Faber, 2004). 2-Oxoglutarat und Glutamat sind unschädlich für die beteiligten Enzyme. Ebenfalls kann 2-Oxadipat als Substrat eingesetzt werden, wobei L- α -Aminoadipat entsteht. Kommerziell erhältliche Glutamatdehydrogenasen akzeptieren sowohl NADH, als auch NADPH und Polyethylenglykol-gebundene Kofaktoren, und weisen eine hohe spezifische Aktivität von 40 U mg⁻¹ Protein auf (Peters, 1998). Prinzipiell können Glutamatdehydrogenasen in NADPH- und NADH-abhängige Enzyme, sowie in solche, die beide Kofaktor akzeptieren, eingeteilt werden (Valle *et al.*, 1984). Glutamatdehydrogenasen wurden bereits zur Kofaktorregenerierung bei der Umsetzung von Cholsäure zu 12-Keto-Chenodesoxycholsäure eingesetzt (Carrea *et al.*, 1984; Carrea *et al.*, 1985).

Die NADPH-abhängige Glutamatdehydrogenase aus *E. coli* ist ein Hexamer aus sechs identischen Untereinheiten mit jeweils 48,6 kDa und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von anorganischem Stickstoff (Sakamoto *et al.*, 1975; Valle *et al.*, 1984; Sharkey & Engel, 2008). Dieser Stoffwechselweg wird bei hohen Ammoniumkonzentrationen gegenüber der ATP-abhängigen Glutamatsynthetase, welche einen niedrigen K_m für Ammonium aufweist, bevorzugt (Lengeler *et al.*, 1999). Kinetische Untersuchungen von Sharkey & Engel (2008) wiesen eine leicht negative Kooperativität der Glutamatdehydrogenase mit L-Glutamat und NADP^+ auf, sowie eine Substratüberschusshemmung von 2-Oxoglutarat und Ammonium. Für die reduktive Aminierung wurde ein optimaler pH von 8 ermittelt.

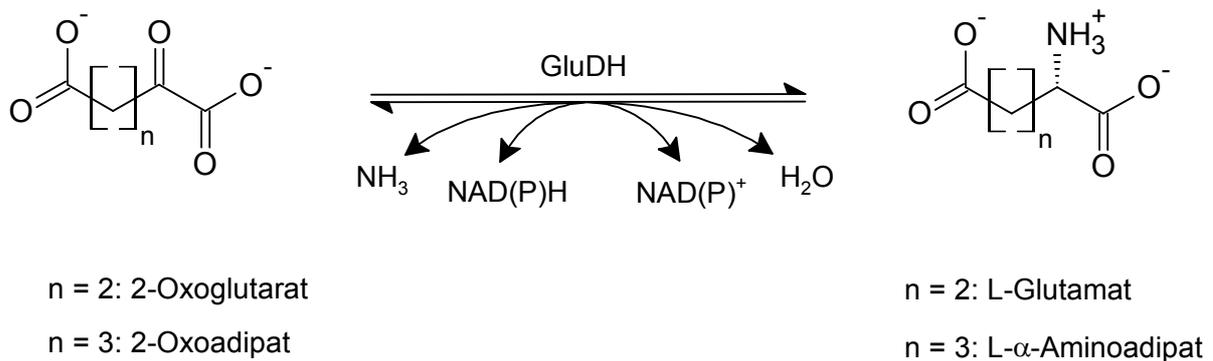


Abbildung 3.17: Glutamatdehydrogenase (GluDH)-katalysierte Reaktion zur Kofaktorregenerierung (nach Faber, 2004).

3.5.6 Lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenasen

Eine interessante Entwicklung auf dem Gebiet der Nikotinamid-Kofaktorregenerierung besteht aus dem Einsatz einer löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase (*soluble pyridine nucleotide transhydrogenase*, STH) (van der Donk & Zhao, 2003). Transhydrogenasen katalysieren den Transfer von Reduktionsäquivalenten zwischen den intrazellulären NADH- und NADPH-Pools, wie in Abbildung 3.18 schematisch dargestellt ist. Das Verhältnis von NADH zu NADPH wird vom Zellmetabolismus über ein großes Netzwerk biochemischer Reaktionen perfekt ausbalanciert, woran Transhydrogenasen beteiligt sind (Fuhrer & Sauer, 2009).



Abbildung 3.18: Transhydrogenase-katalysierte Reaktion zur Kopplung der Reduktionsäquivalente des NADH- und NADPH-Pools.

Transhydrogenasen können in membran-gebundene, protonenpumpende und lösliche Proteine unterteilt werden, die unterschiedliche physiologische Aufgaben erfüllen. Lösliche Pyridin-

Nukleotid-Transhydrogenasen wurden in *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii* und *E. coli* gefunden (Voordouw *et al.*, 1983; Boonstra *et al.*, 1999).

Bei der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase handelt es sich um ein Flavoprotein, das nicht energieabhängig ist. Sie wird jedoch von NADP^+ inhibiert, weshalb ihre physiologische Aufgabe in der Umwandlung von NADPH zu NADH zur Energiegewinnung gesehen wird (Voordouw *et al.*, 1983). Die Untereinheit des Enzyms aus *Pseudomonas aeruginosa* hat eine Masse von ca. 54 kDa, wobei die Monomere lange Polymere bilden, so dass die minimale aktive Form ca. 1,6 MDa beträgt (Wermuth & Kaplan, 1976).

Die lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* wurde heterolog in *E. coli* exprimiert (French *et al.*, 1997) und zur gekoppelten Kofaktorregenerierung bei der Synthese von Hydromorphon aus Morphin eingesetzt. Dabei werden die Reduktionsäquivalente der NADP^+ -abhängigen Morphindehydrogenase mit denen der NADH -abhängigen Morphinonreduktase in einem fein ausbalancierten System gekoppelt (Boonstra *et al.*, 2000; van der Donk & Zhao, 2003). Boonstra *et al.* (2000) konnten auch einen verbesserten Ganzzellbiokatalysator unter Verwendung der rekombinanten löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase erzeugen und auch in diesem System die mögliche Kofaktorregenerierung demonstrieren, wenn Enzyme unterschiedlicher Kofaktorspezifitäten an einem Prozess beteiligt sind.

3.5.7 Zellmetabolismus

Die Funktionen von NADH und NADPH im Zellmetabolismus können physiologisch voneinander getrennt werden. Bei aeroben Verhältnissen wird NADH zur ATP-Gewinnung mittels oxidativer Phosphorylierung genutzt, wohingegen NADPH für anabole Reaktionen verwendet wird (Berg *et al.*, 2003). Während des Wachstums auf Glucose wird NADPH hauptsächlich über den Pentosephosphatweg und den Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg gebildet (Berg *et al.*, 2003).

Für eine Aufrechterhaltung des Primärstoffwechsels ist daher ein konstant niedriges Verhältnis von NAD^+ zu NADH notwendig. Lebende Zellen streben daher nach einer niedrigen katabolen Reduktionskraft (catabolic reduction charge, CRC), entsprechend Gleichung 3.1 (Lengeler *et al.*, 1999):

$$CRC = \frac{[\text{NADH}]}{[\text{NAD}^+] + [\text{NADH}]} \approx \frac{1}{20} \quad 3.1$$

mit $[\text{NADH}]$ Konzentration von NADH [mol L^{-1}]

[NAD⁺] Konzentration von NAD⁺ [mol L⁻¹]

Zellen besitzen ein komplexes Netzwerk aus biochemischen Mechanismen, um die katabole Bildung von NADPH mit dem anabolen Bedarf zu koppeln, die im wesentlichen aus membran- gebundenen oder löslichen Transhydrogenasen, NAD(H)-Kinasen und biochemische Redoxzyklen bestehen (Fuhrer & Sauer, 2009). Damit für reduktive Biosynthese eine ausreichende Energiebereitstellung über NADPH gewährleistet wird, liegt die anabole Reduktionskraft (anabolic reduction charge, ARC), entsprechend Gleichung 3.2, höher als die katabole:

$$ARC = \frac{[NADPH]}{[NADP^+] + [NADPH]} \approx \frac{1}{2} \quad 3.2$$

mit [NADPH] Konzentration von NADPH [mol L⁻¹]
 [NADP⁺] Konzentration von NADP⁺ [mol L⁻¹]

Andersen & von Meyenburg (1977) zeigten konstante katabole und anabole Reduktionskräfte bei *E. coli*, unabhängig von den Wachstumsbedingungen. Eine Verringerung der anabolen Reduktionskraft wurde dabei unter Hungerbedingungen festgestellt.

Ganze Zellen bringen daher, neben den intrazellulären Kofaktoren, auch die notwendigen Stoffwechselwege mit, diese zu regenerieren. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird schon seit langem zur asymmetrischen Reduktion von Ketonen eingesetzt (Faber, 2004).

3.6 Reaktionskinetik enzymatischer Umsetzungen

Oftmals werden Reaktionsbedingungen empirisch optimiert, indem die Konzentrationen von Reaktanten und Enzymen getrennt voneinander variiert werden, um hohe Ausbeuten bei geringen Kosten zu erhalten. Solche Experimente sind dabei oft zeit- und kostenintensiv und geben nur einen kleinen Einblick in den biokatalytischen Prozess. Im Gegensatz dazu können kinetische Modelle helfen, enzymatische Prozesse *in silico* zu beschreiben. Anschließend kann der Prozess nach verschiedenen Zielgrößen optimiert werden.

3.6.1 Modelle zur Beschreibung von Enzymkinetiken

Eine einfache Art der Betrachtung von enzymkinetischen Reaktionen stellt die Umsetzung von einem Ausgangsstoff zu einem Produkt dar. Bei der Annahme einer irreversiblen Reaktion kann das Reaktionsschema aus Abbildung 3.19 angenommen werden.

Für die Erstellung eines kinetischen Modells zur Beschreibung dieses Reaktionsmechanismus wurden von Michaelis & Menten (1913) verschiedene Annahmen getroffen, dass unter anderem jeweils nur ein Substrat- und Enzymmolekül einen aktivierten Substrat-Enzymkomplex bilden, welcher sich Fließgleichgewicht ($\frac{d[ES]}{dt}=0$) befindet. Außerdem wird von einer fehlenden Rückreaktion ausgegangen, da die Reaktion weit vom thermodynamischen Gleichgewicht stattfindet, was für die Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten gilt, wenn noch kein Produkt gebildet wurde. Des Weiteren wird die Dissoziation des Produkts (k_2) als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt angesehen.

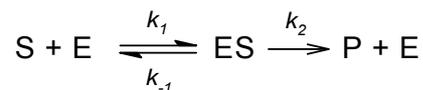


Abbildung 3.19: Schema einer Ein-Substrat-Reaktion unter der Annahme von Irreversibilität. Ein-Substrat (S) bindet reversibel an das Enzym (E) und bildet einen Substrat-Enzymkomplex (ES), welcher wieder zu freiem Enzym und Produkt (P) dissoziieren kann. Die Geschwindigkeitskonstanten k_i beschreiben die Teilreaktionen.

Basierend auf diesen Annahmen lässt sich die Michaelis-Menten-Kinetik herleiten. Die Reaktionsgeschwindigkeit v kann dabei über Gleichung 3.3 berechnet werden:

$$v = v_{max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad 3.3$$

mit:

v	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante [mol s ⁻¹]
v_{max}	Maximale Geschwindigkeit [mol s ⁻¹]
[S]	Substratkonzentration [mol L ⁻¹]
K_m	Michaelis-Konstante [mol L ⁻¹]

Die Michaelis-Konstante, welche auch Halbsättigungskonstante genannt wird, beschreibt die Substratkonzentration, bei welcher die halb-maximale Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet wird. Sie kann aus den einzelnen Geschwindigkeitskonstanten k_i errechnet werden:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad 3.4$$

Das Michaelis-Menten-Modell geht von einer Ein-Substrat-Ein-Produkt-Reaktion aus, jedoch katalysieren Enzyme häufig Reaktionen, an denen zwei oder mehrere Substrate und Produkte beteiligt sind. Beispielsweise katalysiert die in dieser Arbeit betrachtete 12 α -HSDH eine Reaktion mit zwei Substraten A und B, bei der wiederum zwei Produkte P und Q entstehen:



Wenn zwei Substrate wie in Gleichung 3.5 berücksichtigt werden sollen, werden zwei Reaktionsterme miteinander verknüpft, wie in Gleichung 3.6 dargestellt (Liese *et al.*, 2006):

$$v_{hin} = \frac{v_{max}^{hin} [A][B]}{(K_{mA} + [A])(K_{mB} + [B])} \quad 3.6$$

Für die Rückreaktion kann dies analog durchgeführt werden. Aus der Massenbilanz kann eine Verknüpfung abgeleitet werden:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = v_{hin} - v_{rück} \quad 3.7$$

Um eine Zwei-Substrat-Zwei-Produkt-Reaktion zu beschreiben, stellen die Gleichungen 3.6 und 3.7, welche auf der Michaelis-Menten-Kinetik basieren, die einfachste Möglichkeit dar (Liese *et al.*, 2006). Daraus resultiert jedoch der Nachteil, dass die Hin- und Rückreaktion als zwei voneinander unabhängige Reaktionen betrachtet werden (Liese *et al.*, 2006).

Die Nomenklatur für die Beschreibung von Mehrsubstrat-Reaktionen wurde vor allem von Cleland (1963) eingeführt. Abhängig von der Anzahl der Substrate in der Vorwärts- und der Produkte in der Rückreaktion werden die Begriffe *uni*, *bi* oder *ter* verwendet. Enzymreaktionen, bei welchen sämtliche Substrate erst binden bevor eine Konversion stattfindet, werden „sequentiell“ gekannt. Dabei unterscheidet man, ob die Reihenfolge „zufällig“ oder „geordnet“ ist. Wenn ein Produkt das Enzym bereits verlässt, bevor alle Substrate gebunden sind, handelt es sich um einen Ping-Pong-Mechanismus. Solche Modelle sind zwar mechanistisch korrekt für die Beschreibung von gesamten Reaktionen, jedoch sind diese deutlich komplexer. Der Vorteil solcher komplexen Modelle besteht in der genauen Anwendbarkeit zur Beschreibung individueller Gleichgewichte (Liese *et al.*, 2006).

3.6.2 Mechanismus der 12 α -HSDH

Mittels Produktinhibitionsstudien konnte in den Arbeiten von Braun *et al.* (1991) ein geordneter *bi-bi* Mechanismus für die 12 α -HSDH aus *Clostridium* group P, strain C 48–50 ermittelt werden. Dabei bindet zuerst das Substrat NADP⁺ (A) an das freie Enzym, bevor Cholsäure (B) binden kann. Nach Bildung eines ternären Komplexes verlässt zuerst das Produkt 12-Keto-Chenodesoxycholsäure (P) und anschließend NADPH (Q) das Enzym, wie es in Abbildung 3.20 dargestellt ist (Braun *et al.*, 1991).

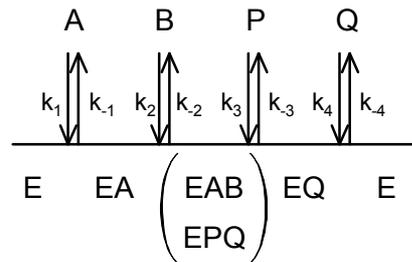


Abbildung 3.20: Schematische Beschreibung des geordneten *bi-bi* Mechanismus (nach Cleland 1963a,b,c).

Jeder mikrokinetische Schritt ist mit zwei Mikroreaktionskonstanten verknüpft. k_{1-4} und $k_{-(1-4)}$ sind dabei die Geschwindigkeitskonstanten für die Vor- und Rückreaktion. Entsprechend der Methode von King & Altman (1956) kann die mechanistische Geschwindigkeitsgleichung wie folgt ausgedrückt werden (Bisswanger, 2002):

$$v = \frac{V_1 V_2 ([A][B] - \frac{[P][Q]}{K_g})}{K_{iA} K_{mB} V_2 + K_{mB} V_2 [A] + K_{mA} V_2 [B] + \frac{K_{mQ} V_1 [P]}{K_g} + \frac{K_{mP} V_1 [Q]}{K_g} + V_2 [A][B] + \frac{K_{mQ} V_1 [A][P]}{K_{iA} K_g} + \frac{K_{mA} V_2 [B][Q]}{K_{iQ}} + \frac{V_1 [P][Q]}{K_g} + \frac{V_2 [A][B][P]}{K_{iP}} + \frac{V_1 [B][P][Q]}{K_{iB} K_g}} \quad 3.8$$

Für den geordneten *bi-bi* Mechanismus werden die kinetischen Parameter, wie in Tabelle 3.4, definiert.

Tabelle 3.4: Definitionen der kinetischen Parameter des geordneten *bi-bi* Mechanismus (Bisswanger, 2002).

Parameter	Bedeutung	Definition
V_1	Maximalgeschwindigkeit, Hinreaktion	$\frac{k_3 k_4 [E]}{k_3 + k_4}$
V_2	Maximalgeschwindigkeit, Rückreaktion	$\frac{k_{-1} k_{-2} [E]}{k_{-1} + k_{-2}}$
K_{mA}	Michaelis-Konstante, Substrat A	$\frac{k_3 k_4}{k_1 (k_3 + k_4)}$
K_{mB}	Michaelis-Konstante, Substrat B	$\frac{k_4 (k_{-2} + k_3)}{k_2 (k_3 + k_4)}$
K_{mP}	Michaelis-Konstante, Produkt P	$\frac{k_{-1} (k_{-2} + k_3)}{k_{-3} (k_{-1} + k_{-2})}$
K_{mQ}	Michaelis-Konstante, Produkt Q	$\frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_{-4} (k_{-1} + k_{-2})}$
K_{iA}	Inhibierungskonstante, Substrat A	$\frac{k_{-1}}{k_1}$
K_{iB}	Inhibierungskonstante, Substrat B	$\frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_2}$
K_{iP}	Inhibierungskonstante, Produkt P	$\frac{k_3 + k_4}{k_{-3}}$
K_{iQ}	Inhibierungskonstante, Produkt Q	$\frac{k_4}{k_{-4}}$
K_g	Gleichgewichtskonstante	$\frac{k_1 k_2 k_3 k_4}{k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4}}$

3.6.3 Stoffbilanzen des idealen Rührkesselreaktors

Das Modell des idealen Rührkesselreaktors geht von isothermen und isobaren Bedingungen, sowie einer durch Rühren ideal durchmischten Gas- Flüssigkeitsphase aus. Dadurch herrschen im Reaktionsraum keine räumlichen Unterschiede der Prozessvariablen (Schügerl & Bellgardt, 2000). Zu den Prozessvariablen zählen Konzentrationen, Reaktionsgeschwindigkeiten, Turbulenzen und physikalische Eigenschaften des Reaktionsmediums. Zeitlich können sich die Prozessvariablen jedoch ändern, wobei verschiedene Betriebsweisen (Satz-, Zulauf- oder kontinuierliches Verfahren), sowie der Verbrauch und die Bildung von Stoffen zu berücksichtigen sind. Über einen festgelegten Bilanzraum können die zeitlichen Änderungen bilanziert werden. Für einen idealen Rührkesselreaktor gilt folgender Zusammenhang in Gleichung 3.9:

$$\frac{d(c_i \cdot V_R)}{dt} = \dot{V}_{ein} \cdot c_{i,ein} - \dot{V}_{aus} \cdot c_{i,aus} + r_i \cdot V_R \quad 3.9$$

mit:

c_i	Konzentration der Komponente i [g L ⁻¹]
$c_{i,ein}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf [g L ⁻¹]
$c_{i,aus}$	Konzentration der Komponente i im Ablauf [g L ⁻¹]
V_R	Reaktionsvolumen [L]
\dot{V}_{ein}	eingehender Volumenstrom [L h ⁻¹]
\dot{V}_{aus}	ausgehender Volumenstrom [L h ⁻¹]
r_i	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i [mol L ⁻¹ h ⁻¹]

Gleichung 3.9 lässt sich umformen zu:

$$\frac{d(c_i \cdot V_R)}{dt} = \dot{V}_{ein} \cdot c_{i,ein} - \dot{V}_{aus} \cdot c_{i,aus} + r_i \cdot V_R = c_i \cdot \frac{dV_R}{dt} + V_R \cdot \frac{dc_i}{dt} \quad 3.10$$

Im ideal durchmischten Rührkesselreaktor gilt zudem:

$$c_{i,aus} = c_i \quad 3.11$$

Aus den Gleichungen 3.10 und 3.11 folgt:

$$\dot{V}_{ein} \cdot c_{i,ein} - \dot{V}_{aus} \cdot c_i + r_i \cdot V_R = c_i \cdot \frac{dV_R}{dt} + V_R \cdot \frac{dc_i}{dt} \quad 3.12$$

Satzverfahren

Im Satzverfahren werden die Substrate und das Medium in dem Rührkesselreaktor vorgelegt und keine weiteren Komponenten zugeführt oder entnommen. Das Reaktionsvolumen ändert sich über die Reaktionszeit nicht. Auf Grund von zeitlichen Änderungen der Substrat- und Produktkonzentrationen während der Reaktion liegt eine instationäre Betriebsweise vor. Für die Stoffbilanz der Komponente i lässt sich Gleichung 3.12 vereinfachen zu:

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad 3.13$$

Wenn eine oder mehrere Komponenten abreagiert sind oder sich ein Gleichgewichtszustand eingestellt hat, gilt die Reaktion im Satzverfahren als beendet.

Zulaufverfahren

Im Zulaufverfahren werden ein oder mehrere Komponenten kontinuierlich dem Reaktionsmedium zugegeben. Der Zustrom an Edukten kann bereits zu Beginn des Prozesses oder nach einer definierten Satzphase erfolgen, wenn ein Teil der vorgelegten Edukte zu Produkten umgesetzt wurde. Ein Ablauf von Reaktionskomponenten erfolgt nicht. Daher kann die Änderung des Reaktionsvolumens wie folgt wiedergegeben werden:

$$\frac{dV_R}{dt} = \dot{V}_{ein} \quad 3.14$$

Daraus ergibt sich mit Gleichung 3.12 für die Stoffbilanz im Zulaufverfahren:

$$\dot{V}_{ein} \cdot c_{i,ein} + r_i \cdot V_R = c_i \cdot \dot{V}_{ein} + V_R \cdot \frac{dc_i}{dt} \quad 3.15$$

Aufgelöst nach der zeitabhängigen Änderung der Konzentration der Komponente i erhält man:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{\dot{V}_{ein}}{V_R} \cdot (c_{i,ein} - c_i) + r_i \quad 3.16$$

Das Verhältnis

$$\frac{\dot{V}_{ein}}{V_R} = D \quad 3.17$$

wird als Verdünnungsrate D [h⁻¹] bezeichnet.

3.6.4 Prozessmodelle

Prozessmodelle können dazu genutzt werden, bereits existierende oder neue Prozesskonzepte *in silico* zu untersuchen, um den experimentellen Aufwand zu fokussieren und zu reduzieren. Dadurch können Kosten eingespart und der Entwicklungsprozess beschleunigt werden (Sin *et al.*, 2009). Des Weiteren können sie zur Kontrolle und Evaluation von Prozesskontrollstrategien zur Sicherung von Stabilität und Effizienz eingesetzt werden (Sin *et al.*, 2009).

Sin *et al.* (2009) beschreiben einen mehrstufigen, iterativen Prozess zur Erstellung eines mathematischen Modells. Zuerst muss der Anwendungszweck des Prozessmodells definiert werden. Anschließend erfolgt die experimentelle Datengenerierung, wie beispielsweise zur Identifikation des Reaktionsmechanismus und anderer prozessrelevanter Größen. Der Anwendungszweck legt fest, welche Daten erfasst werden sollen, welche Komplexität die Modellstruktur benötigt und welche Methoden dazu angewendet werden sollen. Zur Erfassung kinetischer Daten kann beispielsweise zwischen Anfangsgeschwindigkeiten- oder Verlaufs-

kurvenanalyse gewählt werden. Im nächsten Schritt wird die Modellstruktur entworfen, wobei zum Beispiel Reaktionskinetiken definiert werden. Anschließend erfolgt die Parameteridentifikation mit den experimentellen Daten oder beruhend auf Literaturdaten. Abschließend soll das Modell für den Anwendungszweck eingesetzt und neue Ergebnisse evaluiert werden.

Ein Anwendungszweck von solchen Modellen ist die kinetische Analyse von Enzymen, welche den ersten Schritt in der Bioprozessentwicklung darstellen können (Sin *et al.*, 2009). Zavrel *et al.* (2008) leiteten ein mechanistisches Modell für eine Benzaldehyd-Lyase aus *Pseudomonas fluorescens* ab, welches akkurate kinetische Parameter aufweist und eine präzise Vorhersagekraft für die stereoselektive Kohlenstoff-Kohlenstoff-Kopplung von zwei 3,5-Dimethoxy-Benzaldehyd-Molekülen besitzt. Die dazu verwendete Verlaufskurvenanalyse wurde ebenfalls zur Erstellung eines mechanistischen Modells der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* angewendet, welches dabei helfen kann, die NADH-Regeneration in industriellen, enzymkatalysierten Prozessen vorherzusagen und auf diese Weise Kosten zu reduzieren (Schmidt *et al.*, 2010).

Des Weiteren kann als Anwendungsziel die Prozessanalyse und das Prozessdesign definiert werden. Dabei kann die Leistungsfähigkeit eines Prozesses beurteilt und Limitierungen aufgedeckt werden (Illanes *et al.*, 1999; Willeman *et al.*, 2002; Berendsen *et al.*, 2007; Sin *et al.*, 2009).

4 Material und Methoden

4.1 Allgemeines Material

Sämtliche Materialien, welche üblicherweise für biotechnologische Arbeiten verwendet wurden, sind im Anhang zu finden. Dazu gehören Geräte (Anhang A.3), Verbrauchsmaterialien (Anhang A.4), Chemikalien (Anhang A.5), Oligonukleotide (Anhang A.6), Kitsysteme (Anhang A.7), Stammlösungen (Anhang A.8), sowie Medien und Puffer (Anhang A.9) und Enzyme (Anhang A.10). Software und Datenbanken lassen sich in Anhang A.11 finden.

4.2 Spezielles Material

Materialien, die nicht unter 4.1 fallen und besonders erwähnt werden müssen, sind im Folgenden beschrieben.

4.2.1 Vektoren

Zur Expression sämtlicher Proteine wurden die Vektoren pET21a(+), pET22b(+), pET28a(+) und pCOLADuet1 verwendet. Die Gensequenzen wurden in die vorhandenen *multiple cloning sites* (MCS) kloniert, welche je unter der Kontrolle eines T7-Promotors und T7-Transkriptionsstarts stehen, sowie einen *lac*-Operator und einen T7-Terminator besitzen. Die Expression wird mittels Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Plasmide sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

Der Vektor pCOLADuet1 wurde in der vorliegenden Arbeit eigens modifiziert und anschließend für die Stammentwicklung genutzt (4.4.13). Dabei wurde das ursprüngliche Kanamycin- durch ein Chloramphenicol-Resistenzgen ersetzt. Zur Amplifikation einer Chloramphenicol-Resistenz wurde der Vektor pGT verwendet, welcher freundlicherweise von Kyoko Momoi, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, zur Verfügung gestellt wurde. Anschließend wurde dann, wenn eine Klonierung über *NcoI* in die *multiple cloning sites* 1 erfol-

gen sollte, eine innerhalb der neuen Resistenzgensequenz gelegene *NcoI*-Schnittstelle mittels positionsgerichteter Mutagenese (4.4.7) entfernt. Diese Vektoren werden im Folgenden unter pCOLA(mod) zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Eingesetzte Expressionsvektoren

Plasmid	Herkunft
pET21a(+)	Novagen, San Diego, USA
pET22b(+)	Novagen, San Diego, USA
pET28a(+)	Novagen, San Diego, USA
pCOLADuet1	Novagen, San Diego, USA

4.2.2 Vektorkonstrukte

Für die vorliegende Arbeit standen folgende Vektorkonstrukte zur Verfügung:

pET21a(+)-*fdh*_{D221G}

In den pET21a(+)-Vektor wurde das Gen einer Formiatdehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* N10 einkloniert (Schnittstellen: *NdeI* und *EcoRI*), wobei Aspartat an Position 221 durch ein Glycin mittels positionsgerichteter Mutagenese ersetzt wurde (Gebhardt, 2006). Des Weiteren enthält die Sequenz an Position 1202 eine Basendeletion, wodurch die letzte Aminosäure Valin gegen ein Alanin ausgetauscht und das Stoppcodon deaktiviert wird. Dadurch wird der dahinterliegende His-Tag aktiviert. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Gabi Gebhardt, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität München, zur Verfügung gestellt.

pET22b(+)-7 β -*hsdh*

In den pET22b(+)-Vektor wurde das Gen einer 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 einkloniert (*NdeI* / *HindIII*) (Liu *et al.*, 2011). Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Luo Liu, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt.

pET28a(+)-7 β -*hsdh*

In den pET28a(+)-Vektor wurde das Gen einer 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 einkloniert (*NdeI* / *HindIII*) (Liu *et al.*, 2011). Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Luo Liu, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt.

pET22b(+)-3 α -*hsdh*

In den pET22b(+)-Vektor wurde das Gen einer 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni* einkloniert (*NdeI* / *EcoRI*) (Oppermann & Maser, 1996). Dieser Vektor wurde freundlicherwei-

se von Holger Beuttler, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt.

pET22b(+)-12 α -hsdh

In den pET22b(+)-Vektor wurde das Gen einer 12 α -HSDH aus *Clostridium* group P, strain C48-50 einkloniert (*NdeI* / *BamHI*) (Braun *et al.*, 1991). Dieser Vektor stammt aus eigenen Vorarbeiten (Michael Braun, 2008).

4.2.3 *Escherichia coli*- Stämme

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)-T1 ^R	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) tonA
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) hdhA ⁻ KanR ⁺	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) hdhA ⁻ KanR ⁺
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -
<i>Escherichia coli</i> NovaBlue(DE3)	(F ₋ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG)
<i>Escherichia coli</i> SW102	DH10B[λ cl857(<i>cro</i> - <i>bioA</i>)<> <i>tet</i>] (Warming <i>et al.</i> , 2005)

4.3 Mikrobiologische Methoden

4.3.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Übernachtskulturen

5 mL LB-Medium (A.9) mit den entsprechenden Selektionsantibiotika wurden entweder mit einer *Escherichia coli*-Kolonie von einer LB-Agarplatte oder von einer Kryokultur angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 150 rpm (Exzentrizität: 5 cm) inkubiert.

Vorkulturen

Als Medium für die Vorkulturen zur Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor wurden 200 mL Minimalmedium (A.9) nach Wilms *et al.* (2001) mit $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin und $33 \mu\text{g mL}^{-1}$ Chloramphenicol verwendet. Des Weiteren wurden 300 μL einer steril-filtrierten Spurenelementelösung (A.9) und 200 μL einer steril-filtrierten 1 M Magnesiumsulfat-Lösung hinzugegeben. Zum Animpfen wurde eine LB-Übernachtskultur eingesetzt. Als Kohlenstoffquelle wurde 6 g L^{-1} Glucose zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 16 – 18 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 250 rpm (Exzentrizität: 5 cm).

4.3.2 Kultivierung von *Escherichia coli* im 7,5 L-Rührkesselreaktor

Der Ganzzellbiokatalysator *E. coli* BL21(DE3) $\text{hdhA}^- \text{KanR}^+ \text{pET22b-12}\alpha\text{-hsdh pCOLA(mod)-sth}$ wurde im Rührkesselreaktor ($V = 7,5 \text{ L}$) hergestellt. Hierzu wurde eine 5 mL-LB-Übernacht- und eine 200 mL Minimalmedienkultur im Schüttelkolben ohne Schikanen nacheinander jeweils über Nacht angezogen. Das Minimalmedium wurde daraufhin mit der 200 mL-Kultur inokuliert. Begonnen wurde mit einer kurzen Satzphase, welche nach Verbrauch der Kohlenstoffquelle in ein Zulaufverfahren überging. Die Induktion der rekombinanten Proteinexpression wurde mittels IPTG-Zugabe durchgeführt.

Satzphase

Die Kultivierung des Stamms *E. coli* BL21(DE3) $\text{hdhA}^- \text{KanR}^+ \text{pET22b-12}\alpha\text{-hsdh pCOLA(mod)-sth}$ wurde nach einem modifizierten Protokoll zur Hochzeldichtefermentation durchgeführt (Wilms *et al.*, 2001). Hierzu wurde ein Rührkesselreaktor ($V = 7,5 \text{ L}$) der Firma Infors AG (Infors 3, Bottmingen, Schweiz) mit 3,8 L Minimalmedium (A.9) befüllt, mit 1,5 mL Antischaummittel (Antifoam 204, Sigma-Aldrich, München) versehen und autoklaviert. Nach Polarisierung der Gelöstsauerstoffsonde wurde der Bioreaktor auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert und mit $0,5 \text{ L L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ Luft begast. Ein sechsblättriges Scheiben-Rührorgan wurde anschließend auf 400 rpm eingestellt. Während des Prozesses wurden Temperatur, pH und Sauerstoffpartialdruck erfasst und dokumentiert. 25 % Ammoniak diente zur einseitigen pH-Regelung auf 7,0 und als Stickstoffquelle.

Vor Inokulation wurden Ampicillin (100 mg L^{-1}) und Chloramphenicol (33 mg L^{-1}), sowie 8 mL einer 1 M Magnesiumsulfatlösung, 12,5 mL einer Spurenelementelösung (A.9) und 8 g Glucose zugegeben. Anschließend wurde das Medium mit einer 200 mL Vorkultur (4.3.1) mit einer Biotrockenmasse-Konzentration von $\sim 2,4 \text{ g L}^{-1}$ angeimpft. Für ausreichend Gelöstsauerstoff im Medium sorgte eine Rührerdrehzahlerhöhung bei Unterschreiten eines Schwellenwertes von 30 % Sauerstoffpartialdruck, welche mit Hilfe einer Kontrollsequenz realisiert wurde. Nach Verbrauch der Glucose, welches durch den Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks festgestellt

wurde, wurde die Zulaufphase eingeleitet. Bei einem Biomasseausbeutekoeffizient von $Y_{X,S} = 0,45 \text{ g g}^{-1}$ ist damit in Verbindung mit dem Inokulum eine Biotrockenmasse-Konzentration von ca. 1 g L^{-1} zu erwarten.

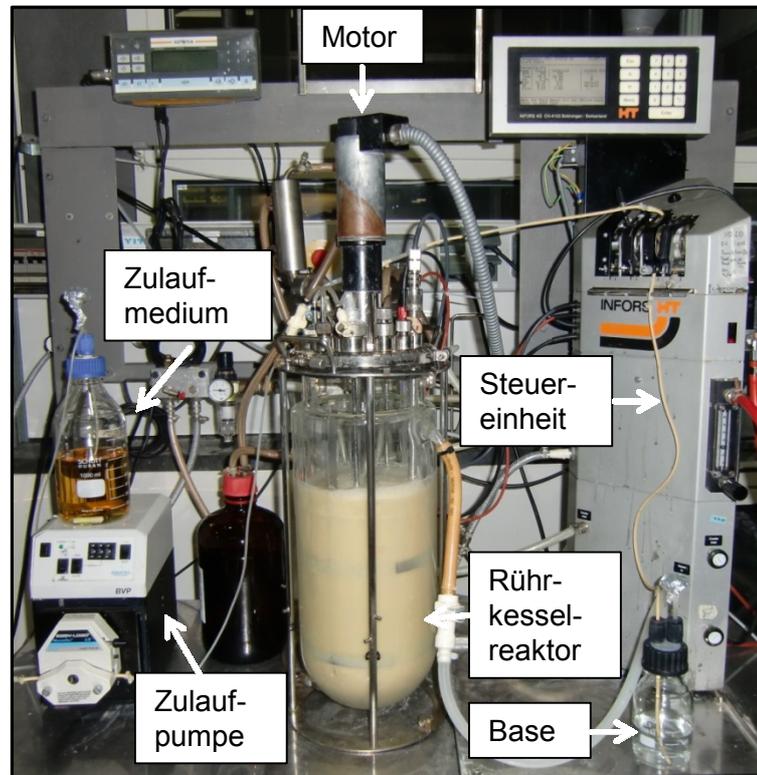


Abbildung 4.1: Rührkesselreaktorsystem (Infors, Labfors, $V = 7,5 \text{ L}$).

Zulaufphase

Nach Verbrauch der Glucose wurde mit der Zulaufphase begonnen. In der Zulaufphase wurde die Begasungsrate auf $1,25 \text{ L L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ erhöht, sowie die Temperatur auf 30 °C reduziert. Der Sauerstoffpartialdruck wurde mittels Rührerdrehzahländerung auf $20 - 40 \%$ eingestellt. Die Wachstumsrate wurde basierend auf Gleichung 4.1 (Jenzsch *et al.*, 2006) auf einen festen Wert zwischen $\mu = 0,15 - 0,19 \text{ h}^{-1}$ eingestellt, so dass zum gewünschten Induktionszeitpunkt eine Zellkonzentration von $\sim 17 - 18 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse erreicht wurde und keine starke Acetatbildung zu erwarten war (Korz *et al.*, 1995; Lee, 1996). Als Biomassekonzentration wurde zu diesem Zeitpunkt ein Wert von 1 g L^{-1} aus dem Glucoseverbrauch angenommen.

$$F(t) = \frac{\mu \cdot V_0 \cdot c_{x0}}{Y_{X,S} \cdot c_s} \cdot e^{\mu t} \quad 4.1$$

mit	F	Zulaufrate [L h^{-1}]
	V_0	Volumen des Mediums zum Zeitpunkt des Zulaufbeginns [L]
	c_{x0}	Biotrockenmasse-Konzentration zum des Zulaufbeginns [g L^{-1}]

$Y_{x,s}$	Substratausbeutekoeffizient [g g^{-1}]
c_s	Glucosekonzentration im Zulaufmedium [g L^{-1}]
μ	Wachstumsrate [h^{-1}]
t	Prozesszeit [h]

Das Zulaufmedium mit 500 g L^{-1} Glucose und 99 g L^{-1} Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP), welche separat autoklaviert und kurz vor Verwendung vereint wurden, wurde mittels Pumpe zugegeben.

Expressionsphase

Bei einer Biotrockenmasse-Konzentration von $\sim 18 \text{ g L}^{-1}$ wurde die Expression mit $0,5 \text{ mM}$ IPTG induziert. Mit Hilfe der Gleichung 4.1 wurde eine Wachstumsrate von $0,06 \text{ h}^{-1}$ realisiert, wobei die Sauerstoffpartialdruckregulierung beibehalten wurde. Nach $6 - 7 \text{ h}$ wurden die Zellen bei einer Biotrockenmasse-Konzentration von ca. 25 g L^{-1} geerntet und bis zum Gebrauch der Zellen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

4.3.3 Stammhaltung

Die Stammhaltung der verwendeten *Escherichia coli*- Stämme erfolgte für kurzfristig benötigte Zellen auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsantibiotika, indem der Stamm mit dem gewünschten Plasmid frisch transformiert wurde (4.4.11).

Alternativ wurden die Stämme als Kryokultur angelegt, in dem $500 \text{ }\mu\text{L}$ einer LB-Medium-Übernachtskultur (4.3.1) zu $500 \text{ }\mu\text{L}$ sterilem $80 \text{ } \%$ (v/v) Glycerin gegeben wurden. Die Zellsuspension wurde anschließend mehrmals invertiert und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ über mehrere Monate gelagert.

4.3.4 Zellaufschluss von *Escherichia coli*

Escherichia coli-Zellen wurden zum Aufschluss pelletiert (3220 g , 10 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und im passenden Reaktionspuffer (4.6.4) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt, um zelleigene Serin- und Cystein-Proteasen zu hemmen.

Zellaufschluss mittels Ultraschall

Das Zellpellet, welches aus einer 200 mL-Schüttelkolbenkultur gewonnen wurde, wurde zunächst in 8 mL Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) resuspendiert, mit 1 mM PMSF versetzt und im Ultraschalldesintegrator der Firma Branson bei einer Intensität von 30 % viermal 1 min mit jeweils 2 min Pause im Eisbad behandelt. Anschließend wurden die Zelltrümmer 1 h bei 4220 g und 4 °C abzentrifugiert.

Zellaufschluss mittels Glasperlen

Eine *E. coli*-Zellsuspension wurde in 2 mL-Reaktionsgefäßen mit 50 % (v/v) Glasperlen, sowie 1 mM PMSF versetzt und anschließend für 6 min in der Schwingarmmühle bei 30 Hz aufgeschlossen. Anschließend wurden Glasperlen und Zelltrümmer abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 4 °C, 17900 g, 30 min).

Zellaufschluss mit Lysozym in Mikrotiterplatten

Um Zellen in Mikrotiterplatten aus Kapitel 4.5.3 aufzuschließen, wurden die bei -80 °C gelagerten Mikrotiterplatten mit 2 mL-Kavitäten in 600 µL Aufschlusspuffer (A.8) resuspendiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend mittels Zentrifugation abzentrifugiert (60 min, 3700 g).

4.3.5 Wachstumsversuche

Um die Empfindlichkeit des Stamms *E. coli* BL21(DE3) pET22b(+)-12 α -*hsdh* auf die Gallensäure Cholsäure zu untersuchen, wurden Zellen unter Vorlage von Cholsäure kultiviert. Dafür wurde eine definierte Menge Cholsäure in 100 mL LB-Medium bei pH 7,5 in einem Schüttelkolben ($V = 500$ mL) gelöst und mit einer bestimmten Menge an einer Übernachtskultur angeimpft. Diese wurde bei 37 °C und 180 rpm (Exzentrizität: 5 cm) inkubiert und das Zellwachstum bei einer optischen Dichte von $\lambda = 600$ nm verfolgt.

Um die Empfindlichkeit des Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ KanR⁺ auf die Substrate Dehydrocholsäure und Formiat zu untersuchen, wurden Zellen in Anwesenheit dieser Substanzen kultiviert. Dafür wurde eine definierte Menge Dehydrocholsäure oder Formiat in 50 mL LB-Medium bei pH 7,5 in einem Schüttelkolben ($V = 250$ mL) gelöst und mit einer bestimmten Menge an einer Übernachtskultur angeimpft. Diese wurde bei 37 °C und 250 rpm inkubiert und das Zellwachstum bei einer optischen Dichte von $\lambda = 600$ nm verfolgt.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Isolation genomischer DNA

Die genomische DNA des Stamms *Pseudomonas fluorescens* pf5, welcher von Jana Hoffmann, Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt wurde, wurde mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kit von QIAGEN (Hilden) isoliert. Hierzu wurden 600 µL einer Übernachtskultur mit einer OD_{600} von ~3 eingesetzt. Die DNA wurde nach Elution bei -20 °C gelagert.

4.4.2 Polymerasekettenreaktion

Zur Klonierung von DNA-Sequenzen wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt, wobei die Primer aus A.6 verwendet wurden. Als Templat diente genomische oder Plasmid-DNA-Lösung, von der 1 µL eingesetzt wurde. Als DNA-Polymerase wurde 1 µL der *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase verwendet. Als Puffer dienten die vom Hersteller empfohlenen Puffer. Es wurden jeweils 1 µL beider Oligonukleotide (10 µM) in einem Reaktionsvolumen von 50 µL eingesetzt, sowie 2 µL Desoxynukleotidtriphosphat-Mischung (20 µM). Bei Verwendung der *Phusion*-DNA-Polymerase wurde ein Reaktionsvolumen von 20 µL verwendet, wobei 4 µL des empfohlenen Puffers, 1 µL Templat, jeweils 1 µL beider Oligonukleotide (10 µM), 0,4 µL Desoxynukleotidtriphosphat-Mischung (10 µM), sowie 0,2 µL Polymerase eingesetzt wurden.

Die Reaktion wurde im Thermocycler der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt, wobei sich die verwendeten Temperaturen und *Annealing*-Zeiten nach den synthetisierten Oligonukleotiden und der eingesetzten Polymerase richteten.

Die Polymerasekettenreaktion wurde ebenfalls zur Deletion von Nukleotiden aus der DNA-Sequenz der 12 α -HSDH durchgeführt. Hierzu wurde sowohl der Bereich vor der gewünschten Deletion und als auch der Bereich hinter der Deletion amplifiziert, wobei die verwendeten Oligonukleotide am Ende der Deletion die gewünschte Deletion als auch einen überlappenden Bereich zu dem anderen Fragment enthielten. Die beiden Fragmente wurden anschließend wieder als Templat für eine Polymerasekettenreaktion eingesetzt, wobei als Oligonukleotide nur die Klonierungsoligonukleotide verwendet wurden.

4.4.3 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente im elektrischen Feld in einer Agarose-Polymermatrix aufzutrennen, wurde 100 mL Agarose in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) aufgeköcht, mit 5 µL Ethidiumbromid-Lösung versetzt und die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Die aufzutrennende

DNA wurde mit 6x Orange G Probenpuffer (A.8) versehen. Des Weiteren wurde ein geeigneter DNA-Längenstandard zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente genutzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 120 V in TAE-Puffer (1x) durchgeführt.

4.4.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelextraktion

Um DNA-Fragmente aufzureinigen, wurden diese mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (4.4.3). Die DNA wurde mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel geschnitten. Die Extraktion erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach dem Protokoll des Herstellers (QIAGEN, Hilden).

4.4.5 Restriktion mit Endonukleasen

Zur Restriktion der PCR-Produkte für die Klonierung, sowie zur Kontrolle der transformierten Vektoren wurden Endonukleasen des Typs II eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 10 - 50 μ L wurde die DNA mit 10 - 20 U des jeweiligen Restriktionsenzym (A.10) unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen versetzt. Es wurde jeweils der Puffer verwendet, der vom Enzymhersteller empfohlen wurde. Die Aufreinigung zur Klonierung bestimmter DNA-Fragmente erfolgte mittels QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN (Hilden).

4.4.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von restringierten PCR-Produkten und Vektoren wurde die T4-DNA-Ligase (A.10) verwendet, die eine Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einem freien 3'-OH-Ende einer Desoxyribonukleinsäure katalysiert. Hierzu wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1: 1,5 – 2:5 eingesetzt. Die DNA-Konzentration wurde vorher photometrisch bestimmt (4.4.15). Es kamen 10 U T4-DNA-Ligase, 1 mM ATP und 10x Ligase-Puffer zum Einsatz. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

4.4.7 Positionsgerichtete Mutagenese

Um gezielt Aminosäuren einer Proteinsequenz auszutauschen, wird die positionsgerichtete Mutagenese angewandt. Dabei nutzt man Oligonukleotide, die komplementär zueinander sind und die gewünschte Mutation tragen. Als Templat dient N⁶-adeninmethylierte, doppelsträngige Plasmid-DNA, die das betreffende Insert enthält. Während eines PCR-Schritts werden die Primer komplementär zum Templat verlängert, wodurch Plasmide mit Strangbruch samt ge-

wünschter Mutation entstehen. Die PCR-Ausbeute steigt bei diesem Verfahren nur linear, da neugebildete DNA-Fragmente nicht als Template dienen können.

Hierzu wurde eine Polymerasekettenreaktion (4.4.1) mit je 2 μL Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 mM), 5 μL *Pfu*-Puffer, 1 μL *Pfu*-Polymerase (A.10), 2 μL Desoxynukleotidtriphosphate-Lösung (20 mM) sowie 2,5 μL Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und mit destilliertem Wasser auf 50 μL aufgefüllt. Als Template diente 1 μL des jeweiligen parentalen Plasmids.

Bei 95 °C wurde die DNA 5 min denaturiert, anschließend folgten 12 - 17 PCR-Zyklen. Jeder Zyklus bestand aus 30 s bei 95 °C, 90 s bei 50 - 60 °C (abhängig von den Oligonukleotiden) und 12,5 min bei 72 °C. Abschließend wurde der Ansatz 15 min bei 72 °C inkubiert. Um anschließend parentale Plasmide zu verdauen, wurde 1 h bei 37 °C mit *DpnI* (A.10) inkubiert.

4.4.8 Zufallsmutagenese mittels *error-prone*-Polymerasekettenreaktion

Für die Erstellung einer zufallsbasierten Enzymvarianten-Bibliothek der 12 α -HSDH wurde die Methode der *error-prone*-PCR (ep-PCR) angewandt. Die Wahl der Polymerase und der PCR-Bedingungen entscheiden über die Anzahl und Verteilung der Mutationen. Das mutierte PCR-Fragment wird anschließend in einen Expressionsvektor kloniert, so dass die entstandene Enzymmutanten-Bibliothek auf veränderte Proteinaktivität untersucht werden kann.

Um eine geeignete Verteilung der Mutationen zu erhalten, wurde das GeneMorph II Random Mutagenesis Kit von Stratagene (La Jolla, CA, USA) angewandt. Während einzelne epPCR-Polymerasen zu bestimmten Mutationen neigen und damit die Vielfalt der Bibliothek verringern, wird bei der verwendeten Methode ein Gemisch zweier Polymerasen verwendet. Dabei kommen die Polymerase Mutazyme I von Stratagene (La Jolla, CA, USA) und eine neue *Taq*-Polymerase zum Einsatz, um ein ausgewogeneres Mutationsspektrum zu erhalten.

Bei der Durchführung der epPCR wurden die Herstellerangaben beachtet. Die Mutationsrate kann dabei über die Menge an Templat-DNA oder die Anzahl an Amplifikationszyklen eingestellt werden. Auf diese Weise wurde eine Mutationsrate von 4,5 Mutationen pro Kilobase durch die Zugabe von 55 ng Templat-DNA berechnet. Als Oligonukleotide wurden die Klonierungsprimer SDRneu2_forward und SDRneu_revers_BamHI aus A.6 verwendet. Die Qualität der epPCR wurde zunächst mittels Sequenzierung von sechs Mutanten geprüft. Nach erfolgreicher Kontrolle wurden die mutagenisierten PCR-Fragmente in den Vektor pET22b(+) ligiert (4.4.6). Die Transformation des Ligationsprodukts erfolgte in chemisch-kompetente *Escherichia coli* Nova-Blue(DE3)-Zellen, wie in Kapitel 4.4.11 beschrieben.

4.4.9 Sättigungsmutagenese

Um die Anzahl der zu durchmusternden Mutanten beim semi-rationalen Protein Design zu minimieren, wurde ein Nukleotidfragment von 325 bp bei der Firma Sloning Biotechnology (Puchheim) bestellt. Der Vorteil dieses Fragments besteht darin, dass nur gewünschte Aminosäuren, die vorher rational ermittelt wurden, an den entsprechenden Positionen vorkommen. Zudem liegen die Codontripletts an den Positionen möglichst gleichverteilt vor, wodurch diese Methode Vorteile gegenüber den klassischen Sättigungsmutageneseverfahren besitzt.

Für die Erstellung der Enzymvariantenbibliothek wurde zuerst die *Bam*HI-Schnittstelle im Vektor pET22b(+)-*12 α -hsdh* mittels positionsgerichteter Mutagenese entfernt, um anschließend an Position 309 eine neue *Bam*HI-Schnittstelle zu erzeugen. Die Schnittstelle wurde so eingefügt, dass das erhaltene Fragment im Leseraster inkloniert werden konnte. Hierzu wurde das Fragment so erstellt, dass es über eine flankierende *Nde*I- und *Bam*HI-Schnittstelle samt Überhang verfügt. Nach Ligation wurde der Vektor in *E. coli* NovaBlue(DE3) transformiert. Die Erstellung der Bibliothek und Durchmusterung sind ab Kapitel 4.5 beschrieben.

4.4.10 Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen wurde eine 5 mL-LB-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm (Exzentrizität: 5 cm) inkubiert. Diese Kultur diente als Inokulum einer 100 mL-LB-Kultur, welche bei 37 °C und 250 rpm (Exzentrizität: 5 cm) solange inkubiert wurde, bis diese eine OD₆₀₀ 0,4 – 0,6 erreicht hatte. Diese wurde anschließend in vorgekühlten 50 mL-Reaktionsgefäßen pelletiert (3220 g, 4 °C, 10 min) und in 40 mL eisgekühltem TfBI-Medium (A.8) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation wurden diese erneut pelletiert (3220 g, 4 °C, 10 min) und in 4 mL TfBII-Medium (A.8) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension zu 200 μ L-Einheiten in 1,5 mL-Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort bei -80 °C eingefroren.

4.4.11 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*-Zellen

Der Prozess, bei dem freie DNA in Bakterien eingebracht wird, wird als Transformation bezeichnet. Hierfür wurden 200 μ L chemisch-kompetente *E. coli* BL21(DE3), DH5 α , NovaBlue(DE3) oder BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ -Zellen mit 1 - 10 μ L DNA-Lösung versetzt. Die Inkubation erfolgte 45 min auf Eis, der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C, was zur Aufnahme der DNA führt. Anschließend wurden die Bakterienzellen mit 600 μ L LB-Medium ohne Antibiotikum 30 min bei 37 °C und 500 rpm im Thermomixer geschüttelt. Daraufhin wurden 200 μ L der Zellen auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht ausgestrichen.

Zur Kotransformation zweier kompatibler Vektoren in *E. coli* BL21 *hdhA*⁻ *KanR*⁺ (DE3)-Zellen wurden zu 50 µL kompetenter Zellen 2 µL beider Plasmide zugegeben. Der Hitzeschock wurde für 90 s durchgeführt. Vor dem Ausstreichen auf Agarplatten wurden die Zellen pelletiert (Tischzentrifuge, 3000 min⁻¹, Raumtemperatur, 1 min), in 150 µL LB-Medium resuspendiert und vollständig ausplattiert.

4.4.12 Herstellung von elektro-kompetenten Zellen

0,5 mL einer 5 mL-LB-Übernachtskultur von *E. coli* SW102, welche bei 30 °C und 250 rpm (Exzentrizität: 5 cm) inkubiert wurde, wurden zu 35 mL LB-Medium in einem 125 mL-Schikanenkolben gegeben. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ 0,4 – 0,5 bei 30 °C und 250 rpm (Exzentrizität: 5 cm) kultiviert. 15 mL dieser Kultur wurde schnell auf 42 °C erwärmt und 15 min bei 200 rpm (Exzentrizität: 5 cm) inkubiert, um die Expression der zur Rekombination notwendigen Proteine einzuleiten. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem Eisbad für 5 – 10 min abgekühlt, abzentrifugiert (4600 g, 7 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde daraufhin in 30 mL eiskaltem Wasser resuspendiert, abermals zentrifugiert (4600 g, 7 min, 4 °C) und in 1 mL eiskaltem Wasser gelöst. Die Zellen wurden nun in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, pelletiert (30 sek, 17900 g, 4 °C), in 200 µL eiskaltem Wasser resuspendiert und bis zur Elektroporation auf Eis gehalten.

4.4.13 Plasmidkonstruktion mittels *Recombineering*

Um Gensequenzen in Plasmiden zu ersetzen, wurde die Methode des *Recombineering* verwendet. Hierzu wurde das einzubauende Fragment mittels Polymerasekettenreaktion (4.4.2) amplifiziert, wobei die Oligonukleotide so erstellt wurden, dass sie einen großen Überhang besitzen, welcher homolog zu dem Randbereich der Plasmidsequenz ist, in welche der Einbau erfolgen soll. Anschließend wurden das lineare PCR-Fragment gemeinsam mit dem Zielplasmid mittels Elektroporation in einen geeigneten Stamm zur Rekombination kotransformiert. Anschließend erfolgte die Selektion. Dieses Verfahren wurde zum Tausch der Antibiotikaresistenz auf dem Vektor pCOLADuet1 von Kanamycin zu Chloramphenicol angewandt. Als Templat zur PCR diente der Vektor pGT, welcher freundlicherweise von Kyoko Momi, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, zur Verfügung gestellt wurde.

Zur Elektroporation wurden elektro-kompetente *E. coli* SW102 nach Abschnitt 4.4.12 vorbereitet und 50 µL der Zellsuspension in vorgekühlte Elektroporationsküvetten der Firma Biorad (Gene Pulser™, München) gegeben. Anschließend wurden 5 µL des einzubauenden PCR-Amplifikats und 5 µL des entsprechenden Vektors zugegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF mit einer konstanten Zeit von 4 ms. Sofort im Anschluss wurde 1 mL

LB-Medium zugegeben. Die Zellen wurden 1 h bei 30 °C und 180 rpm (Exzentrizität: 5 cm) inkubiert und zur Selektion auf LB-Platten mit 33 µg mL⁻¹ Chloramphenicol ausplattiert. Chloramphenicol-resistente Kolonien wurden gepickt und Plasmide isoliert (4.4.14).

4.4.14 Plasmidisolierung mittels Minipräparation

Zur Isolierung der niedermolekularen DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet. Die Präparationen wurden mit dem GeneElute™ Plasmid MiniPrep-Kit der Firma Sigma-Aldrich (München) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei mit 60 µL H₂O eluiert und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren wurde.

4.4.15 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Aromatische Ringe der DNA besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, was zur Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösungen verwendet werden kann. Zur Messung wurden 2 µL DNA-Lösung auf ein Spektralphotometer der Firma PEQLAB Biotechnologie (NanoDrop, Erlangen) gegeben und die optische Dichte (OD) bestimmt. Dabei entspricht eine OD von 1 einer Konzentration von 50 µg µL⁻¹ doppelsträngiger DNA.

Das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 und 280 nm kann die Reinheit bewerten, da Proteine bei 280 nm ihr Absorptionsmaximum haben. Eine reine DNA-Lösung sollte einen Wert von 2,0 erreichen und nicht unter 1,5 liegen.

4.4.16 Kolonie-Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Kolonie-Polymerasekettenreaktion kann der erfolgreiche Einbau eines gewünschten Inserts nach Ligation in den Vektor untersucht werden. Hierzu wurde eine PCR, wie in 4.4.2 beschrieben, durchgeführt, wobei statt Templat-DNA ein Abstrich einer Einzelkolonie auf einer Agarplatte in den PCR-Ansatz im Reaktionsgefäß gerührt wurde. Als Oligonukleotide zur Amplifikation wurden sowohl die zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide verwendet, als auch Oligonukleotide, welche komplementär zu Vektorbereichen vor dem Insert waren. Dadurch können falsch-positive Ergebnisse minimiert werden, da der Ligationsansatz einen Überschuss an dem einzuführenden DNA-Fragment enthielt (Dallas-Yang *et al.*, 1998). Hierzu kamen die vom Vektoranbieter empfohlenen T7-Primer zum Einsatz. Anhand des Nachweises einer Bande, beziehungsweise deren Größe konnte auf ein erfolgreich eingebautes Fragment geschlossen werden.

Die Methode der Kolonie-Polymerasekettenreaktion wurde überdies zur Klonierung der Gensequenz des Steroidtransporters BaiG aus *Clostridium scindens* eingesetzt. Die weiteren Schritte wurden hierbei wie beschrieben ab Kapitel 4.4.3 fortgesetzt.

4.4.17 Sequenzierung von plasmidischer DNA

Sequenzierungen von DNA-Fragmenten wurden von der Firma GATC Biotech, Konstanz, durchgeführt. Hierzu wurden 10 - 15 μL der isolierten Plasmid-DNA (4.4.14) mit VE-H₂O in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß zu einem Gesamtvolumen von 30 μL gemischt, um die vom Anbieter geforderten Konzentrationen zu erreichen. Zur Sequenzierung wurden die Standardprimer des Anbieters verwendet oder Oligonukleotide nach Vorgaben des Anbieters in einem separaten Reaktionsgefäß mitgeschickt.

4.4.18 Spezifisches Ausschalten von chromosomalen Genen

Zum Ausschalten chromosomaler Gene wurden diese durch spezifische Integration von Gruppe II Introns unterbrochen. Gegenüber gewöhnlicher Transposon-Mutagenese ist dieses Verfahren positionsspezifisch und nicht zufällig. Dabei wird ein RNA-Protein-Komplex auf einem Plasmid mittels PCR zur spezifischen Insertion programmiert. Dabei verhalten sich Gruppe II Introns analog wie programmierbare Restriktionsenzyme.

Die Herstellung der Knockout-Mutante *Escherichia coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ KanR⁺ wurde mit Hilfe des Kits TargeTron™ Gene Knockout System von Sigma Aldrich (München) durchgeführt. Zuerst wurden nach Herstellerangaben passende Zielbereiche im gewünschten Gen gesucht. Hierbei weisen 1 kb Gene ca. 5 – 11 mögliche Gruppe II Intron Insertionsbereiche auf. Ein Algorithmus des Kit-Anbieters errechnet Oligonukleotide zur Mutagenese des Introns, welches darauf in einen linearisierten Vektor ligiert wird. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter A.6 aufgeführt und wurden passend zur Gensequenz, welche für eine 7 α -HSDH kodiert (*hdhA*), erstellt. Nach Transformation und Induktion des Systems können Stämme mit zerstörten Genen mit Hilfe einer Kanamycin-Resistenz selektioniert werden, welcher erst beim Einbau ins Chromosom aktiviert wird.

Bei der Durchführung wurden die Herstellerangaben beachtet, wobei zur PCR-Produkt-Aufreinigung der QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN (Hilden) genutzt wurde. Des Weiteren wurde die Ligation des *Hind*III / *Bsr*GI-verdauten Intron-PCR-Produkts, wie unter 4.4.6 beschrieben, durchgeführt, wobei 2 μL des linearisierten pACD4K-C Vektors und 6 μL des *Hind*III / *Bsr*GI-verdauten Intron-PCR-Produkt eingesetzt wurden. 5 μL dieses Ansatzes wurden anschließend zu 200 μL chemisch kompetenten *E. coli* BL21(DE3) gegeben.

Das erfolgreiche Ausschalten des gewünschten Gens *hdhA* wurde mittels Selektion auf LB-Agar mit Kanamycin ($33 \mu\text{g mL}^{-1}$) nachgewiesen.

Um anschließend den pACD4K-C-Vektor, welcher die Sequenzen für den RNA-Protein-Komplex zum Einbau des Gruppe II Introns und einer Chloramphenicol-Resistenz trägt, aus den Zellen zu entfernen, wurde eine erhaltene Kolonie über mehrere Nächte in 5 mL LB-Übernacht-Kulturen mit Kanamycin ($33 \mu\text{g mL}^{-1}$) überimpft. Abschließend wurde eine 200 mL LB-Kultur mit Kanamycin ($33 \mu\text{g mL}^{-1}$) mit einer LB-Übernachtkultur angeimpft und für 5 h bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur für 1 h auf 42°C erhöht. Mit dieser Kultur wurde eine 5 mL LB-Übernacht-Kulturen mit Kanamycin ($33 \mu\text{g mL}^{-1}$) angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 180 rpm wurde die Kultur auf einer LB-Agar-Platte mit $33 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin ausgestrichen. Nach Übernacht-Inkubation bei 37°C wurden Kolonien gepickt und auf einer LB-Agar-Platte mit Kanamycin ($33 \mu\text{g mL}^{-1}$) und Chloramphenicol ($34 \mu\text{g mL}^{-1}$) ausgestrichen. Nach Übernacht-Inkubation bei 37°C wurden Chloramphenicol-sensitive Mutanten gefunden und weitergehend untersucht.

4.5 Methoden für die Hochdurchsatzdurchmusterung

4.5.1 Pipettieren von Lösungen

Für die in der Hochdurchsatzdurchmusterung benötigten Pipettierschritte wurde für eine höhere Reproduzierbarkeit und aus Zeitersparnisgründen ein Pipettierroboter eingesetzt (Janus, Perkin Elmer). Diese Schritte umfassen die Zugabe von Medium in Mikrotiterplatten und Platten mit tiefen Kavitäten, die Induktion, den Zellaufschluss, sowie das Pipettieren der Komponenten zur Aktivitätsuntersuchung im Mikrotitermaßstab.

4.5.2 Picken von Kolonien

Um Kolonien von der Agarplatten für die Hochdurchsatzdurchmusterung in Mikrotiterplatten zu überführen, wurde ein Pickroboter eingesetzt (Biopick automated colony picking system, Biorobotics, Woburn, USA). Nachdem die mutagenisierten PCR-Fragmente aus Kapitel 4.4.8 und 4.4.9 in den Vektor pET22b(+) ligiert wurden, wurde das Volumen nach Hitzeschocktransformation zum Ausplattieren auf LB-Agarplatten so gewählt, dass ca. 100 – 200 Kolonien pro Platte erhalten wurden.

Der Pickroboter identifizierte anschließend mittels Fotokamera Kolonien auf der Platte, pickte diese und inokulierte damit eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten, welche mit jeweils $150 \mu\text{L}$ TB-Medium, 5 % (v/v) DMSO und $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin befüllt waren. Um

falsch-positive und falsch-negative Erkennungen zu reduzieren, können einige Filterparameter in der Software eingestellt werden, welche in Tabelle 4.2 zu finden sind. Die Inkubation der inokulierten Mikrotiterplatte erfolgte bei 37 °C und 600 rpm. Diese wurden als Stammplatten bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 4.2: Filtereinstellungen des Pickroboters

Allgemeine Parameter	
Plattengröße	88 mm
Agar-Tiefe	5 mm
Startposition	A1
Heizdauer	0,7 s
Bilderkennungsparameter	
Kleinster Durchmesser	1 mm
Größter Durchmesser	5 mm
Kleine Rundungsabweichung	50 %
Mittlere Rundungsabweichung	50 %
Große Rundungsabweichung	50 %
Filterstärke	32

4.5.3 Heterologe Proteinexpression in Mikrotiterplatten

Die in Kapitel 4.5.2 hergestellten Stammplatten wurden als Inokulum von Vorkulturplatten verwendet, welche 150 µL TB-Medium mit 5 % (v/v) DMSO und 100 µg mL⁻¹ Ampicillin in jeder der 96 Kavitäten mit 300 µL Volumen enthielten. Hierzu wurde die Platte dreimal angeimpft, anschließend mit Deckel und Klebeband verschlossen. Die Inkubation erfolgte 22 h bei 37 °C und 600 rpm.

Zur Proteinexpression wurden 600 µL TB-Medium mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin in Mikrotiterplatten mit 2 mL- Vertiefungen dreimal mit der Vorkultur angeimpft. Die Vorkulturplatten wurden anschließend als Stammplatten bei -80 °C verwahrt. Die Hauptkulturplatten wurden daraufhin 6 h bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Mittels Zugabe von 100 µL Induktionslösung (A.8) wurden die Zellen induziert. Die Expression erfolgte bei 25 °C und 600 rpm für ca. 16 h. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (3220 g, 20 min, 4 °C), der Überstand verworfen und die Mikrotiterplatten bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

4.5.4 Aktivitätsassay zur Auslese in der Mikrotiterplatte

Die Durchmusterung der Mutantenbibliothek erfolgte in Mikrotiterplatten mit flachem Boden und 96 Kavitäten. Hierzu wurden 150 μL Reaktionspuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8, 7,5 mM Cholsäure, 0,83 mM 12-Keto-Chenodesoxycholsäure) und 50 μL Zelllysate (aus 4.3.4 und 4.5.3) pipettiert, und die Reaktion mittels Zugabe von 50 μL 1,25 mM NADP^+ -Lösung gestartet. Die Extinktionszunahme bei 340 nm über 60 s diente anschließend als Selektionsgrundlage für die darauffolgende Charakterisierung.

4.6 Proteinbiochemische Methoden

4.6.1 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* im Schüttelkolben

Zur Expression aller Proteine wurden 5 mL LB-Medium (mit den entsprechenden Selektionsantibiotika) mit einem *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)-T1^R oder *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ aus Abschnitt 4.2.3, der mit einem oder zwei Expressionsvektoren transformiert wurde, über Nacht bei 37 °C und 180 rpm (Exzentrizität: 5 cm) inkubiert. Bei Verwendung von pET21a(+) und pET22b(+)-Vektoren wurden 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin, bei pET28a-Vektoren 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin, bei pCOLA(mod)-Vektoren 33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Chloramphenicol verwendet. 200 mL TB-Medium (mit den entsprechenden Selektionsmarkern) wurden mit der 5 mL-LB-Kultur inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm (Exzentrizität: 5 cm) inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,6 - 0,8 wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert und nach 21 h Inkubation bei 25 °C und 160 rpm (Exzentrizität: 2,5 cm) beendet.

4.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay

Die Proteinkonzentration einer Lösung wurde bestimmt, indem die Extinktion bei 562 nm von 20 μL Proteinlösung in 200 μL BCA-Lösung (Lösung A : Lösung B 50 : 1) des Kits der Firma Thermo Scientific (Rockford, USA) nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C gemessen wurde. Dabei bildet Bicinchoninsäure (BCA) mit einwertigen Kupferionen, die quantitativ aus zweiwertigen Kupferionen mit Proteinen reagieren, eine violette Komplexbinding, dessen Extinktion bei 562 nm photometrisch gemessen werden kann (Smith *et al.*, 1985). Die Bestimmung der Konzentration erfolgte über eine BSA-Kalibrierung.

4.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die SDS-PAGE-Methode verwendet (Laemmli, 1970; Fling & Gregerson, 1986). Für ein 12,5 %-iges SDS-PAGE-Gel wurden zunächst 2 mL Trenngelpuffer, 3,33 mL Acrylamid-Lösung (30 %), 2,67 mL destillier-

tes Wasser, 40 µL 10 % (w/w) Ammoniumpersulfat und 4 µL Tetramethylethyldiamin gemischt, in die Apparatur gegossen und gewartet, bis die Polymerisation beendet war. Anschließend wurde das Sammelgel bestehend aus 1 mL Sammelgelpuffer, 0,52 mL Acrylamid-Lösung (30 %), 2,47 mL destilliertem Wasser, 40 µL 10 % (w/w) Ammoniumpersulfat und 4 µL Tetramethylethyldiamin darauf gegeben.

Die zu untersuchende Proteinlösung wurde mit SDS-Gel-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Nachdem das Gel in die vorgesehene Elektrophoresekammer gegeben wurde, wurden 15 µL der Probe, entsprechend einer Proteinmenge von 20 µg, pro Geltasche eingefüllt, sowie in eine Tasche 7 µL Proteinmarker (Roti[®]Mark Standard, 14 – 212 kDa, Roth, Karlsruhe).

Das Gel wurde 15 min bei 10 mA in SDS-Laufpuffer gefahren, bis die Proben vollständig in das Sammelgel eingelaufen waren. Daraufhin wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht. Nach ca. 90 min wurde der Vorgang beendet und das Gel mit SDS-Färbe-Lösung und anschließend mit SDS-Entfärbe-Lösung behandelt.

Zur Vergleichen und Abschätzen von Proteinbanden wurde die Gele nach Anfärbung mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Sollte eine Bestimmung der Proteinkonzentration stattfinden, wurde der hierfür geeignete Perfect Protein Marker (10 – 225 kDa, Merck, Darmstadt) eingesetzt. Hierzu wurden verschiedene, definierte Mengen des Markers auf das Gel aufgetragen und entsprechend den Herstellerangaben eine Kalibriergerade erstellt. Dem Kalibrierbereich gemäß wurde die zu untersuchende Proteinlösung verdünnt.

4.6.4 Bestimmung von Aktivitäten im Küvetten-Photometer

Die Enzymaktivitäten wurden mit Hilfe eines Küvetten-Photometers der Firma Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA) gemessen. Hierzu wurden 100 µL einer Substratlösung mit 790 µL Puffer und 10 µL der zu vermessenden Enzymlösung gemischt, beziehungsweise im Falle der Alkoholdehydrogenase mit 10 µL einer Substratlösung mit 890 µL Puffer und 10 µL der zu vermessenden Enzymlösung. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µL Kofaktorlösung bei Raumtemperatur gestartet. Der Verlauf der NAD(P)H-, beziehungsweise thioNADH-Konzentration wurde mittels Extinktionsmessung bei 340 nm (NAD(P)H) und 400 nm (thioNADH) aufgenommen. Die Extinktionsänderung wurde anschließend für den linearen Anfangsbereich ermittelt und die Aktivität basierend auf dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet:

$$A = \frac{dc}{dt} = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} \quad 4.2$$

mit A: Enzymaktivität [U mL⁻¹ = mmol min⁻¹ mL⁻¹]

- c : Kofaktorkonzentration [mmol L^{-1}]
 t : Zeit [min]
 ΔE : Extinktionsänderung pro Minute [min^{-1}]
 ε : molarer Extinktionskoeffizient [$\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
 d : Schichtdicke (hier: 1 cm)

Aktivität der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase

Als Substrat wurde eine 100 mM Dehydrocholsäurelösung (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0) eingesetzt. Als Kofaktor wurde eine 1 mM NADH-Stammlösung verwendet. Die Extinktionsabnahme wurde bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ verfolgt. Die Aktivität wird wie folgt definiert: 1 U des Enzyms entspricht der Enzymmenge, welche die Umsetzung von $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ einer 10 mM Dehydrocholsäurelösung in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) bei Raumtemperatur katalysiert.

Aktivität der 7 β -Hydroxysteroiddehydrogenase

Als Substrat wurde eine 100 mM Dehydrocholsäurelösung (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0) eingesetzt. Als Kofaktor wurde eine 1 mM NADPH-Stammlösung verwendet und die Extinktionsabnahme bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ verfolgt. Die Aktivität wird wie folgt definiert: 1 U des Enzyms entspricht der Enzymmenge, welche die Umsetzung von $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ einer 10 mM Dehydrocholsäurelösung in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) bei Raumtemperatur katalysiert.

Aktivität der 12 α -Hydroxysteroiddehydrogenase

Als Substrat wurde eine 50 mM Cholsäurelösung (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0) eingesetzt. Als Kofaktor wurde eine 2,5 mM NADP^+ -Stammlösung beziehungsweise 2,5 mM NAD^+ -Stammlösung verwendet und die Extinktionszunahme bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ verfolgt. Die Aktivität wird wie folgt definiert: 1 U des Enzyms entspricht der Enzymmenge, welche die Umsetzung von $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ einer 5 mM Cholsäurelösung in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) bei Raumtemperatur katalysiert.

Aktivität der Formiatdehydrogenase

Als Substrat wurde eine 1 M Natriumformiat-Lösung (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0) eingesetzt. Als Kofaktor wurde eine 2,5 mM NADP^+ -Stammlösung verwendet und die Extinktionszunahme bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ verfolgt. Die Aktivität wird wie folgt definiert: 1 U des Enzyms entspricht der Enzymmenge, welche die Umsetzung von $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ einer 100 mM

Natriumformiat-Lösung in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) bei Raumtemperatur katalysiert.

Aktivität der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase

Die Bestimmung der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase wurde basierend auf dem Protokoll von French *et al.* (1997) durchgeführt. Als Substrat wurde eine 1 mM thioNAD⁺-Lösung (in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,0) eingesetzt. Als Kofaktor wurde eine 1 mM NADPH-Stammlösung verwendet und die Extrinktionszunahme bei $\lambda = 400$ nm verfolgt. Die Aktivität wird wie folgt definiert: 1 U des Enzyms entspricht der Enzymmenge, welche die Umsetzung von $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ einer 100 μM thioNAD⁺-Lösung in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,0) bei Raumtemperatur katalysiert.

Aktivität der Alkoholdehydrogenase

Als Substrat wurde Aceton eingesetzt. Als Kofaktor wurde eine 1 mM NADPH-Stammlösung verwendet und die Extinktionsabnahme bei $\lambda = 340$ nm verfolgt. Die Aktivität wird wie folgt definiert: 1 U des Enzyms entspricht der Enzymmenge, welche die Umsetzung von $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ einer 1 % (v/v) Acetonlösung in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) bei Raumtemperatur katalysiert (Liu, 2009, persönliche Kommunikation).

4.6.5 Bestimmung von Enzymkinetiken im Mikrotiterplatten-Photometer

Um Enzymaktivitäten im Mikrotitermaßstab zu ermitteln, wurden MTP-Photometer der Firma Biotek Instruments (Winooski, USA), sowie der Firma Tecan (Männedorf, Schweiz) verwendet. Dabei wurde bei konstanter Enzymkonzentration entweder die Substrat- oder Kofaktorkonzentration konstant gehalten, während die andere variiert wurde. Um v_{max} zu ermitteln, wurde die konstante Komponente jeweils im deutlichen Überschuss zugegeben.

Zur Bestimmung der Aktivitäten der 7 β -HSDH (für die Ermittlung von v_{max} , K_m und K_i) und 12 α -HSDH (für die Ermittlung von K_m von Cholsäure), sowie deren Varianten wurden 100 μL einer Substratlösung und 50 μL einer Enzymlösung (beide in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0) in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach 2 min Äquilibrierungszeit wurde die Reaktion durch 100 μL der Kofaktorlösung (gelöst in Wasser) gestartet und die Extinktion über 30 sec bei 340 nm verfolgt.

Zur Bestimmung der Aktivitäten der 12 α -HSDH und deren Varianten zur Ermittlung der maximalen Geschwindigkeit v_{max} und K_m von NADP⁺ wurden 25 μL einer Cholsäurelösung, 25 μL einer Enzymlösung und 50 μL einer Kofaktorlösung (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0)

in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe der Cholsäure. Die Extinktion wurde über 30 min bei 340 nm verfolgt. Hierzu kam mittels FPLC aufgereinigtes Enzympräparat zum Einsatz.

Bei Untersuchung der 12 α -HSDH und deren Enzymvarianten auf Restaktivität in Anwesenheit von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure wurden 190 μ L einer Lösung aus Cholsäure und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure mit 10 μ L einer Enzymlösung (beide in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0) gemischt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 μ L 1,25 mM NADP⁺-Lösung. Die Gesamtkonzentration an Cholsäure und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure wurde bei 5 mM im Ansatz konstant gehalten und die Verhältnisse der beiden Gallensalze variiert.

Zur Bestimmung der NAD⁺-Aktivität der 12 α -HSDH und deren Varianten wurden in einem Volumen von 250 μ L verschiedene Konzentrationen von NAD⁺ und Enzymlösung vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 μ L einer 50 mM Cholsäurelösung (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0) gestartet.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte anhand der Messdaten basierend auf dem Lambert-Beer'schen-Gesetzes in Gleichung 4.3:

$$A_{spez.} = \frac{\Delta C \cdot V_R}{V_x \cdot c_P} = \frac{\Delta E_{340} \cdot V_R}{\epsilon \cdot d \cdot V_x \cdot c_P} \quad 4.3$$

mit:	$A_{spez.}$:	spezifische Aktivität [$\text{U mg}^{-1} = \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]
	Δc :	Änderung der Kofaktorkonzentration [$\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$]
	V_R :	Reaktionsvolumen [μL]
	V_x :	Volumen Enzymlösung [μL]
	c_P :	Enzymkonzentration [mg L^{-1}]
	ΔE_{340} :	Extinktionsänderung bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ [min^{-1}]
	ϵ :	molarer Extinktionskoeffizient von NAD(P)H [$6,22 \cdot 10^3 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
	d :	Schichtdicke [cm]

Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der Software SigmaPlot beziehungsweise IGOR Pro mittels nichtlinearer Regression. Die maximale Geschwindigkeit v_{max} bei unendlicher Konzentration des beteiligten Substrats und Kofaktors wurde über einen Korrekturfaktor, der sich aus der Michaelis-Menten-Kinetik ableitet, errechnet. Um den Fehler für v_{max} abzuschätzen, wurde die Annahme getroffen, dass der relative Fehler der volumenbezogenen Enzymaktivität mit dem relativen Fehler für v_{max} , der aus der Angleichung der experimentellen Messpunkte an die

entsprechende Kinetikgleichung resultiert, gleichgesetzt werden kann. So kann der Fehler über die Gaußsche Fehlerfortpflanzung abgeschätzt werden.

4.6.6 Verlaufskurvenanalyse zur Identifikation kinetischer Parameter

Katalytische Eigenschaften von Enzymen werden typischerweise mittels Anfangsreaktionsraten ermittelt. Wird jedoch der komplette Zeitverlauf zur Analyse verwendet, können mehr Informationen in die Parameterermittlung einfließen. Für Reaktionen, welche sich nicht im Fließgleichgewicht befinden, ist die Verlaufskurvenanalyse die Methode der Wahl (Duggleby, 2001). Der Rechenaufwand ist jedoch deutlich höher.

Für die Parameteridentifikation zur kinetischen Modellierung der 12 α -HSDH wurden Verlaufskurven in einer 1 mL-Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm analysiert und ausgewertet. Hierzu wurden in der Küvette definierte Startkonzentrationen des Natriumsalzes der Cholsäure (0 – 50 mM), 12-Keto-Chenodesoxycholsäure (0 – 80 mM), NADP⁺ (0 – 0,23 mM) und NADPH (0 – 0,243 mM) eingesetzt. Die Konzentrationen der NADP⁺ ($\lambda = 260$ nm, $\epsilon = 18$ mM⁻¹ cm⁻¹, 24 °C)- und NADPH ($\lambda = 340$ nm, $\epsilon = 6,22$ mM⁻¹ cm⁻¹, 24 °C)-Stammlösungen wurden photometrisch ermittelt (Bisswanger, 2002). Die biokatalytische Reaktion der 12 α -HSDH wurde durch Zugabe der Kofaktorstammeslösung gestartet. Sämtliche Reaktionsverläufe wurden bei 24 °C in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) aufgezeichnet, indem die Extinktion bei $\lambda = 340$ nm in einem Zeitintervall von 20 sek über 90 min gemessen wurde, um die Konzentration von NADPH zu ermitteln. Zum Einsatz kam ein aufgereinigtes Enzympräparat, dessen Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt wurde (4.6.2).

4.6.7 Proteinaufreinigung

Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC)

Bei der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie handelt es sich um eine Affinitätschromatographie, welche zu den selektivsten Trennmethoden von Biomolekülen zählt (Lottspeich & Zorbas, 1998). Sie beruht auf einer spezifischen und umkehrbaren Wechselwirkung eines Liganden und des gewünschten Moleküls. Im Falle der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie werden Proteine am C- oder N-Terminus mit einer exponierten Polyhistidin-Abfolge versehen, welche Nickelionen (Ni²⁺) komplexieren. Die Ionen sind in eine hochvernetzte Agarosematrix des Säulenmaterials integriert. Die Elution erfolgt durch Verdrängung, typischerweise mittels Imidazolkonzentrationsgradienten.

Zur Aufreinigung wurden die Gensequenzen der 12 α -HSDH, sowie deren Enzymvarianten in einen pET28a-Vektor gebracht, wodurch N-terminal ein His₆-Anhang angefügt wurde. Nach

Expression und Zellaufschluss (4.3.4) erfolgte die präparative Auftrennung mittels einer *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)-Anlage. Zum Auslesen der Signale des Fraktionssammlers und UV-Spektrometers bei $\lambda = 280$ nm wurde das PC-Programm LabView verwendet. Die Aufreinigung erfolgte bei 4 °C unter der Verwendung der in Anhang A.8 genannten Puffer. Die Auftrennung wurde mit Hilfe einer HisTrap-Säule (GE Healthcare, Freiburg) mit einem Säulenvolumen von 5 mL erzielt.

Das System wurde zunächst mit 5 Säulenvolumina Bindepuffer equilibriert, bevor das Zelllysat mit einem Säulenvolumen pro Minute auf die Säule aufgetragen wurde. Anschließend wurden nicht-gebundene, als auch unspezifisch gebundene Proteine solange von der Säule gewaschen, bis die Basislinie des UV-Spektrometers erreicht wurde. Hierzu enthielt der Bindepuffer eine geringe Imidazolkonzentration, um eine Bindung von histidinreichen Proteinen mit einer geringen Affinität zum Säulenmaterial zu minimieren. Über einen linearen Imidazolgradienten von 0 – 100 % Elutionspuffer über 20 Säulenvolumina und anschließenden 10 Säulenvolumina 100 % Elutionspuffer wurden gebundene Proteine eluiert und in Fraktionen zu 2 Säulenvolumina gesammelt. Mittels Verfolgung des UV-Signals bei $\lambda = 280$ nm konnten die Fraktionen mit eluiertem Protein identifiziert werden.

Ultrafiltration

Zum Umpuffern und Verringern der Imidazolkonzentration wurden die vereinigten Fraktionen aus der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie- Aufreinigung auf eine Ultrafiltrationseinheit der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH (Vivaspin 20, Göttingen) aufgetragen und auf 20 mL Volumen mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) aufgefüllt. Da bekannt ist, dass 12 α -HSDH in nativer Form Tetramere der Masse 105 kDa (Braun *et al.*, 1991) bilden, wurde eine Ultrafiltration angewandt, die Proteine der Größe < 10 kDa ausschließt. Anschließend erfolgte die Aufkonzentrierung der Proteinprobe mittels Zentrifugation (4500 g, 30 min, 4 °C) mit zweimal wiederholter Verdünnung auf 20 mL mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) und ca. 40-facher Aufkonzentrierung.

Die Reinheit der Enzympräparationen wurde anschließend mittels SDS-PAGE untersucht. Die Enzyme wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.7 Stereoselektive Reaktionen an Cholsäure

4.7.1 Darstellung von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure mit isolierten Enzymen

Die enzymatische Oxidation von Cholsäure wurde in Erlenmeyerkolben ($V = 25 \text{ mL}$) mit einem Gesamtreaktionsvolumen $V = 20 \text{ mL}$ ausgeführt. Hierzu wurden steril-filtrierte Zellysate für die 12α -HSDH beziehungsweise Zellysate für die Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW 200 (ADH-TE) verwendet. Die volumetrischen Aktivitäten der verwendeten 12α -HSDH- und *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase-Enzympräparationen wurden vor dem Einsatz bestimmt (4.6.4) und gewünschte Aktivitäten dem Reaktionsansatz zugesetzt. Um die Enzymkonzentration zu ermitteln, wurde zunächst die spezifische Aktivität von aufgereinigter 12α -HSDH und *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase unter Verwendung eines Aktivitäts- und BCA-Assay ermittelt. Die experimentell ermittelten, spezifischen Aktivitäten von $64,5 \text{ U mg}^{-1}$ (12α -HSDH) und $41,7 \text{ U mg}^{-1}$ (*Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase) im Küvettenphotometer erlauben nun die Umrechnung der volumetrischen Aktivität auf die Enzymkonzentration im Zellysate.

Es wurden definierte Mengen einer Stammlösung des Natriumsalzes der Cholsäure (gelöst in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, $\text{pH } 8,0$) und Aceton gemischt. Anschließend wurde das Gesamtvolumen mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM , $\text{pH } 8,0$) eingestellt. Die Reaktion wurde mit einer definierten Menge NADP^+ (gelöst in 50 mM Kaliumphosphatpuffer $\text{pH } 8,0$) unter Rühren bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ gestartet.

4.7.2 Vorbereitung der Biokatalysatoren für die Biotransformation

Ganzzellumsetzungen zur Oxidation von Cholsäure wurden im 2 mL -, 10 mL - und 200 mL -Maßstab durchgeführt. Hierfür kamen Zellen zum Einsatz, welche im Schüttelkolben oder Rührkesselreaktor hergestellt wurden. Diese wurden zuerst pelletiert (3220 g , 10 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und anschließend in Kaliumphosphatpuffer (50 mM , $\text{pH } 8,0$) resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde die optische Dichte bestimmt. Über den experimentell ermittelten Umrechnungsfaktor von $0,462 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ OD}^{-1}$ für Biokatalysatoren aus dem Schüttelkolben und $0,469 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ OD}^{-1}$ für Biokatalysatoren aus dem Rührkesselreaktor nach Kapitel 4.3.2 wurde eine Korrelation auf die eingesetzte Biotrockenmasse angewandt.

4.7.3 Ganzzellbiotransformationen mit rekombinanten *E. coli*

Der Biokatalysator wurde wie in Kapitel 4.7.2 vorbereitet. Für die Biotransformationen im 2 mL -Maßstab wurden zylindrische Glasbehälter mit einer Höhe von $4,4 \text{ cm}$ und $1,4 \text{ cm}$

Durchmesser ($V = 4 \text{ mL}$), im 8 - 10 mL-Maßstab mit einer Höhe von 5 cm und 2,7 cm Durchmesser ($V = 20 \text{ mL}$) und für Ansätze im 200 mL- und 1 L-Maßstab Erlenmeyerkolben ($V = 1 \text{ L}$, beziehungsweise $V = 3 \text{ L}$) eingesetzt. Die 2 mL- und 10 mL-Ansätze wurden mit Hilfe kreuzförmiger Magnetrührer auf einer Mehrfachrührplatte (Variomag Multipoint, Thermo Scientific, Waltham, USA) und in einem Magnetrührblock (Thermomodul 40 ST; H&P Labortechnik, Oberschleißheim) mit 250 rpm beziehungsweise 350 rpm bei 25 °C gerührt. Die Durchmischung der 200 mL- und 1 L-Ansätze erfolgte auf einem Magnetrührgerät (Variomag Monotherm, Thermo Scientific, Waltham, USA) mit 300 rpm.

4.7.4 Ganzzellbiotransformationen mit rekombinanten *E. coli* im Zulaufverfahren

Der Biokatalysator wurde wie in Kapitel 4.7.2 vorbereitet. Das Startvolumen betrug 139,1 mL, wobei 20 mM Cholsäure, 50 mM 2-Oxoglutarat, 150 mM Diammoniumhydrogenphosphat vorgelegt wurden. Es kamen $23,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen, bezogen auf das Endvolumen ($V = 200 \text{ mL}$), zum Einsatz. Insgesamt wurden 74,8 mL Zulaufmedium mit 250 mM Cholsäure und 625 mM 2-Oxoglutarat (gelöst in Kaliumphosphatpuffer, 50 mM, pH 8,0) zugegeben. Die Zulauftrate war jeweils für 12 h konstant. Es wurde ein kalibriertes Pumpensystem verwendet, wobei zur Realisierung des variablen Zulaufprofils eine Ansteuerung mittels PC über die Software Iris (Infors, Bottmingen, Schweiz) erfolgte. Die Reaktionen wurden für 96 h unter Rühren bei 300 rpm bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.7.5 Ganzzellbiotransformationen mit rekombinanten *E. coli* im Parallelbioreaktor-rührsystem

Um das Zulaufverfahren zur Oxidation von Cholsäure im Ganzzellansatz zu modellieren und zu optimieren, wurde ein automatisiertes, paralleles Milliliter-Bioreaktorsystem verwendet, welches in Abbildung 4.2 gezeigt ist. Der Bioreaktorblock (2mag AG, München) besteht dabei aus 48 Reaktoren in acht Reihen zu je sechs Reaktoren, welche mittels Wärmetauscher im unteren Teil des Bioreaktorblocks temperiert werden können. Das Rührorgan ist auf einer Hohlachse gelagert und wird magnetisch-induktiv angetrieben. Die Rührorgane sind an der Sterilabdeckung befestigt, welche für jeden Reaktor eine Bohrung besitzt, über welche die Dosierung, Beprobung und Abgasabführung bewerkstelligt wird. Die Abdeckung ist zudem kühlbar und realisiert die Kopfraumbegasung der Reaktoren. Das Parallelrührkesselreaktorsystem wird mit Rührkesselreaktoren der Firma Presens GmbH (Regensburg) bestückt, welche mit optischen, immobilisierten Sensoreinheiten für pH und pO_2 ausgestattet sind (Kusterer, 2007). Es können Arbeitsvolumina zwischen 8 und 16 mL eingesetzt werden.

Das Parallelsystem wurde bereits für Kultivierungen im Zulaufverfahren mit *E. coli* verwendet (Puskeiler *et al.*, 2005a). Neben reproduzierbaren Bedingungen für Temperatur, Begasungs-, Verdunstungsrate und Rührerdrehzahl bietet der Bioreaktorblock zudem für die Biotransformationen im Zulaufverfahren ein automatisiertes, programmierbares Pipettiersystem (freedom evo; Tecan; Männedorf, Schweiz) für ein intermittierendes Zulaufprofil, welches für jeden Ansatz variiert werden kann.

Die Biotransformationen wurden bei einer Temperatur von 25 °C unter Verwendung eines gasansaugenden Rührorgans (Puskeiler *et al.*, 2005) bei 1200 rpm durchgeführt, so dass keine Begasung durch das Rührorgan induziert wurde, um vergleichbare Bedingungen wie in sonst eingesetzten Reaktionsgefäßen zu schaffen. Es wurde eine Kopfraumbegasungsrate von 72 L h⁻¹ für das Gesamtsystem eingestellt, die Deckeleinheit wurde dabei auf 4 °C gekühlt.

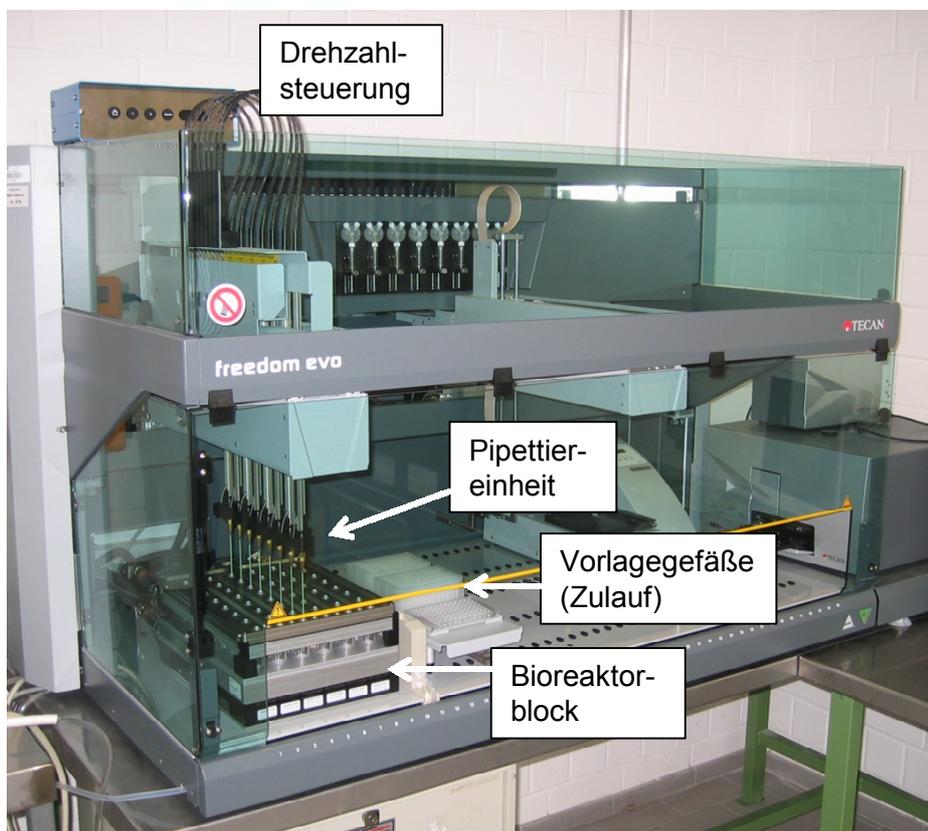


Abbildung 4.2: Parallelbioreaktorsystem zur parallelbetriebenen Biotransformation im Zulaufverfahren (nach Puskeiler, 2004).

Der Biokatalysator wird analog zu Kapitel 4.7.2 vorbereitet und zusammen mit 150 mM Diammoniumhydrogenphosphat in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) in jedem parallelbetriebenen Reaktor vorgelegt. Um eine ausreichende Durchmischung zu erhalten, wurde das System zunächst 5 min gerührt, bevor der Prozess mittels Zugabe von 640 µL des Zulaufme-

diums (250 mM Cholsäure, 625 mM 2-Oxoglutarat, gelöst in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0) gestartet wurde. Es erfolgte keine pH-Regelung.

Das Zulaufmedium wurde entsprechend der Programmierung in Einheiten zu 15 – 18 μL mit Hilfe des automatisierten Pipettiersystems intermittierend zugegeben, um ein möglichst kontinuierlichen Zulauf zu ermöglichen. Die Zulaufprofile wurden zuvor im Steuerungsprogramm vorgegeben und bestanden aus konstanten Zulaufraten, die in 12 h-Intervallen variiert wurden. Des Weiteren wurde die Verdunstungsrate von 30 $\mu\text{L h}^{-1}$, welche zuvor unter den Prozessbedingungen experimentell bestimmt wurde, mittels VE-Wasser-Zugabe ausgeglichen.

Der Prozess wurden jeweils nach 12 h beprobt. Hierzu wurden 100 μL entnommen und in eine Mikrotiterplatte überführt, welche bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde. Die Volumenänderung durch die Beprobung wurde bei der Modellierung berücksichtigt. Nach 96 h und acht verschiedenen Zuläufen der Dossierung wurde der Prozess beendet.

4.7.6 Immobilisierung von Biokatalysatoren in Alginat

Um den Biokatalysator zu immobilisieren, wurde dieser in Alginatkügelchen eingeschlossen. Hierzu wurden die Zellen zentrifugiert (4000 g, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), in TRIS-Puffer (50 mM, pH 8,0) resuspendiert und eine Biotrockenmasse-Konzentration von $133,5\text{ g L}^{-1}$ eingestellt (Dainty *et al.*, 1986). Auf den üblicherweise eingesetzten Kaliumphosphatpuffer musste verzichtet werden, da Phosphationen zur Destabilisierung der Partikel führt. Die Zellsuspension wurde anschließend nach Zhang *et al.* (2010) 1:3 mit einer 2,7 % (w/v) Natriumalginatlösung durchmischt, um eine Suspension mit einer Biotrockenmasse von $44,5\text{ g L}^{-1}$ und 1,8 % (w/v) Natriumalginat zu erhalten. Die Lösung wurde darauf mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Easy Load Masterflex L/S 7518-00; Ismatec, Glattbrugg, Schweiz) mit 100 mL h^{-1} durch eine Kanüle (Streican 0,03 x 30 mm; B. Braun, Melsungen) in eine gerührte 0,1 % (w/v) Calciumchloridlösung getropft und 20 min inkubiert (Sankalia *et al.*, 2005). Die Lösung wurde anschließend filtriert, die Immobilisate gewaschen und 2 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer 0,1 % (v/v) Glutaraldehyd-Lösung ausgehärtet (Li *et al.*, 2007). Nach Rosafärbung der Partikel wurden diese zweimal gewaschen und bis zur Verwendung mehrere Tage bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in TRIS-Puffer (50 mM, pH 8,0) gelagert.

4.7.7 Ganzzellbiotransformationen im Satzverfahren mit immobilisierten Zellen

Die Ganzzellbiotransformationen mit immobilisierten Zellen wurden wie in Kapitel 4.7.2 vorbereitet und im gerührten Prozess eingesetzt. Statt resuspendierter Zellen wurden die in 4.7.6 hergestellten Alginat-immobilisierten Zellen verwendet. Die Partikel wurden gewogen und der

Gewichtsanteil der Zellen an den Kügelchen über die Relation zur eingesetzten Zell-Alginat-Lösung berechnet. Anschließend wurde eine zu freien Zellen äquivalente Zellmasse eingesetzt.

4.8 Enantio- und regioselektive Reduktionen an Dehydrocholsäure

4.8.1 Darstellung von 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure mit rekombinanten *E. coli*

Für Reaktionen im 2 mL-Maßstab kamen zylindrische Glasbehälter mit einer Höhe von 4,4 cm und 1,4 cm Durchmesser ($V = 4$ mL), im 10 mL-Maßstab mit einer Höhe von 5 cm und 2,7 cm Durchmesser ($V = 20$ mL) zum Einsatz. Die Durchmischung erfolgte mittels kreuzförmiger Magnetrührstäbchen. Der Ganzzellbiokatalysator wurde im Schüttelkolben nach Kapitel 4.6.1 hergestellt und zunächst pelletiert (4000 rpm, 10 min, 4 °C) und anschließend im Kaliumphosphatpuffer (50 mM, verschiedene pH) resuspendiert. Für 2 mL-Ansätze wurden 1 mL, für 10 mL-Ansätze 5 mL der resuspendierten Zellsuspension eingesetzt. Die Reaktionsgefäße wurden für die Reaktion mit einem Deckel oder Parafilm luftdicht verschlossen. War hingegen Luftaustausch vorgesehen, wurde der Deckel mit einer 200 µL Pipettenspitze durchstoßen.

Sollte vollständig gelöstes Substrat umgesetzt werden, wurden entsprechende Volumina einer Stammlösung von Dehydrocholsäure (gelöst in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0) und einer Stammlösung von Natriumformiat (gelöst in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0) gemischt und mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe der Zellsuspension bei 25 °C und 350 rpm.

Wurde das Substrat als Suspension eingesetzt, wurde das Natriumsalz der Dehydrocholsäure in das Reaktionsgefäß eingewogen. Diese wurde anschließend mit einem definierten Gemisch aus einer Stammlösung von Natriumformiat (gelöst in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, verschiedene pH) und Kaliumphosphatpuffer (50 mM, verschiedene pH) dispergiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe der Zellsuspension bei 25 °C und 350 rpm.

4.8.2 Darstellung von 12-Keto-Ursodesoxycholsäure mit rekombinanten *E. coli*

Zur Synthese von 12-Keto-Ursodesoxycholsäure wurde der Biokatalysator *E. coli* BL21 (DE) $hdhA^- KanR^+ pET21a-fdh_{D221G}-7\beta-hsdh$ pCOLA(mod)- $3\alpha-hsdh$, wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben, hergestellt und pelletiert (3220 g, 10 min, 4 °C). Das Reaktionsvolumen betrug $V = 10$ mL in verschließbaren Gewindeflaschen ($V = 50$ mL). Die Durchmischung erfolgte mittels kreuzförmiger Magnetrührstäbchen.

Dehydrocholsäure-Natriumsalz wurde in die Flaschen eingewogen und im Reaktionsmedium suspendiert, welches aus definierten Anteilen einer Natriumformiat-Stammlösung (1 M, gelöst in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, verschiedene pH) und 50 mM Kaliumphosphatpuffer (verschiedene pH) bestand. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe der Zellsuspension bei 25 °C und 350 rpm.

4.9 Analytische Methoden

4.9.1 Glucosekonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Glucosekonzentration während der Kultivierung im Rührkesselreaktor wurde das Blutzuckermessgerät Accu-Chek® (Roche, Mannheim) verwendet, welches auf der enzymatischen Umsetzung mittels Glucosedehydrogenase beruht. Es kann in einem Bereich von 0,1 – 6 g L⁻¹ eingesetzt werden.

4.9.2 Qualitative Dünnschichtchromatografie

Bei diesem physikalisch-chemischen Trennverfahren wird die stationäre Phase (zum Beispiel Kieselgel) auf ein Trägermaterial aufgebracht (zum Beispiel Aluminiumfolie oder Glas). Als mobile Phase werden in der Normal-Phase-Chromatografie unpolare Lösungsmittel eingesetzt, wobei der Zusatz von polaren Lösungsmitteln wie Dichlormethan die Elutionskraft gegenüber stark adsorbieren Substanzen erhöht. Daher werden bei der Dünnschichtchromatografie (DC) oft Mischungen von verschiedenen Lösungsmitteln verwendet. Die Polarität und damit die Stärke der Adsorption an die feste Phase unterscheiden sich auch für Regioisomere, die deshalb getrennt werden können.

Um Umsätze von Cholsäure zu 12-Keto-Chenodesoxycholsäure schnell und in einer großen Anzahl abzuschätzen, wurden je eine Spatelspitze der Referenzsubstanzen gelöst. Auf eine DC-Alufolie Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) wurden mittels Glaskapillare oder Pipette 2 µL der Referenzsubstanzen und der Reaktionsansätze aufgetragen. Diese wurde möglichst senkrecht solange in eine Chromatografiekammer gestellt, die als Laufmittel ein Gemisch aus Dichlormethan:Aceton:Essigsäure (konz.) im Verhältnis 40:40:3 enthielt, bis die Laufmittelfront unter die Oberkante der Platte reichte. Die Färbung der Substanzen erfolgte mittels Besprühen mit Molybdätophosphorsäure-Sprühreagens (A.8) und anschließender Erhitzung.

4.9.3 Probenvorbereitung für die hochauflösende Flüssigkeitschromatographie

Zellfreie Synthesen

150 µL der zu untersuchenden Reaktionslösung wurden zur Analyse von Cholsäure und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure mit 850 µL eines 82,4 % (v/v) Methanol-Wasser-Gemischs mit 0,023 mM Salzsäure versetzt. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend 10 min bei 17900 g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde dem Kalibrierungsbereich entsprechend mit einer 70 % (v/v) Methanol-Lösung verdünnt.

Ganzzellreaktionen zur Steroidoxidation

Zur Analytik von Cholsäure und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure in Ganzzellansätzen wurden die Zellen abzentrifugiert. Anschließend wurde 150 µL des Überstands mit 850 µL eines 82,4 % (v/v) Methanol-Wasser-Gemischs mit 0,0235 mM Salzsäure versetzt. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend 10 min bei 17900 g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde dem Kalibrierungsbereich entsprechend mit einer 70 % (v/v) Methanol-Lösung verdünnt.

Ganzzellreaktionen zur Steroidreduktion

Um Dehydrocholsäure, 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure, 7,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure und 12-Keto-Ursodesoxycholsäure in asymmetrischen Ganzzellsynthesen zu analysieren, wurden 300 µL des zu untersuchenden Ganzzellreaktionsmediums mit 700 µL Methanol versetzt. Anschließend wurde die Probe mit 70 % (v/v) Methanol entsprechend dem Kalibrierungsbereich verdünnt und gut durchmischt. Proteine und Zelltrümmer wurden daraufhin abzentrifugiert (30 min, 17900 g, RT). 20 µL des Überstand wurden für die Analyse zu 580 µL 70 % (v/v) Methanol gegeben.

4.9.4 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur qualitativen und quantitativen Analytik aller für die betrachteten Reaktionen beteiligten chiralen Gallensäuren wurde das HPLC-System Finnigan Surveyor Plus von Thermo Fischer (Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Trennung der Substanzen erfolgte mit Hilfe einer Umkehrphasen-Chromatographiesäule vom Typ Hibar 125-4 RP-18e (5 µm) und Hibar 250-4 RP-18e (5 µm) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland). Es wurden jeweils Gradientenelutionen durchgeführt. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Acetonitril und phosphorsaurem Wasser (pH 2,6) eingesetzt. Letzteres diente dazu einen einheitlichen

Protonierungsgrad zu erhalten. Die Substanzen wurden mittels UV-Detektion bei $\lambda = 200 \text{ nm}$ und Raumtemperatur analysiert.

Cholsäure und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure

Säule: Hibar 125-4 RP-18e (5 μm)

Probeninjektion: 20 μL

Flussrate: 1 mL min^{-1}

Gradient: 0 – 3 min konstant 35 % Acetonitril, 3 – 8 min lineare Zunahme auf 43 % Acetonitril, 8 – 10 min lineare Zunahme auf 70 % Acetonitril, 10 – 12 min konstant 70 % Acetonitril, 12 – 14 min lineare Abnahme auf 35 % Acetonitril, 14 – 18 min konstant 35 % Acetonitril

Retentionszeiten: Cholsäure: 10,7 min, 12-Keto-Chenodesoxycholsäure: 7,8 min

Dehydrocholsäure, 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure, 7,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure und 12-Keto-Ursodesoxycholsäure

Säule: Hibar 125-4 RP-18e (5 μm)

Probeninjektion: 20 μL

Flussrate: 1 mL min^{-1}

Gradient: 0 – 3 min konstant 35 % Acetonitril, 3 – 7,5 min lineare Zunahme auf 39 % Acetonitril, 7,5 – 10 min lineare Zunahme auf 40 % Acetonitril, 10 – 11 min lineare Zunahme auf 70 % Acetonitril, 11 - 13 min konstant 70 % Acetonitril, 13 – 15 min lineare Abnahme auf 35 % Acetonitril, 15 – 18 min konstant 35 % Acetonitril

Retentionszeiten: Dehydrocholsäure: 7,1 min, 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure: 4,3 min, 7,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure: 5,6 min, und 12-Ketoursodesoxycholsäure: 3,7 min

Cholsäure, 12-Keto-Chenodesoxycholsäure, 7-Keto-Desoxycholsäure

Säule: Hibar 250-4 RP-18e (5 μm)

Probeninjektion: 20 μL

Flussrate: 1 mL min^{-1}

Gradient:	0 – 50 min konstant 30 % Acetonitril, 50 – 90 min lineare Zunahme auf 70 % Acetonitril, 90 – 100 min konstant 70 % Acetonitril, 105 – 110 min lineare Abnahme auf 30 % Acetonitril, 105 – 115 min konstant 30 % Acetonitril
Retentionszeiten:	Cholsäure: 67,5 min, 12-Keto-Chenodesoxycholsäure: 55,5 min, 7-Keto-Cholsäure: 53,5 min

4.9.5 HPLC-Kalibrierung

Die Kalibrierung der Cholsäure, 12-Keto-Chenodesoxycholsäure und Dehydrocholsäure erfolgte über Referenzsubstanzen und Kalibriergeraden.

Die HPLC-Kalibrierung für 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure erfolgte durch Vergleich der Kurveninhalte von Dehydrocholsäure und der synthetisierten 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure in den Messproben aus Dehydrocholsäure-Reduktionen mit ganzen Zellen und rekombinant exprimierter 7 β -HSDH und Formiatdehydrogenase. Hierzu wurde zunächst bestätigt, dass Zellen ohne exprimierter 7 β -HSDH keine Dehydrocholsäure umsetzen. Anschließend wurde der Kurveninhalt der Dehydrocholsäure von Ganzzellumsetzungen mit und ohne 7 β -HSDH von verschiedenen Proben verglichen. Daraus kann mit Hilfe von Gleichung 4.4 ein Zusammenhang für die 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure erhalten werden:

$$F_{S,0} = F_S + a \cdot F_P \quad 4.4$$

mit	$F_{S,0}$:	Integrierte Fläche des Substrat in der Nullprobe [-]
	F_S :	Integrierte Fläche des Substrat in der Messprobe [-]
	F_P :	Integrierte Fläche des Produkts in der Messprobe [-]
	a :	Korrekturfaktor [-]

Für jede zusammengehörige Messung wurde ein Korrekturfaktor a bestimmt, wobei daraufhin der 10 % winsorisierte Mittelwert der einzelnen Korrekturfaktoren, bei dem die Datengruppe ohne die Ränder berücksichtigt wird, errechnet wurde. Dadurch ist es möglich die Produktkonzentration anhand der Dehydrocholsäure-Kalibriergeraden unter Verwendung des Korrekturfaktors zu ermitteln. Es wurde $a = 1,059 \pm 0,021$ ermittelt.

Die Auswertung der zweistufigen Biotransformation von Dehydrocholsäure erfolgte mittels Referenzsubstanzen der Dehydrocholsäure, 12-Keto-Ursodesoxycholsäure, 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure und 7,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure. Daher musste hier Gleichung 4.4 nicht verwendet werden.

Gemessene Konzentrationen wurden aus dem gemessenen Umsatz einer Messprobe und der im Reaktionsmedium eingesetzten Gesamtgallensalzkonzentration errechnet, um Einflüsse von Messungenauigkeiten bei der Probenvorbereitung zu verringern.

4.10 Computerbasierte Methoden

4.10.1 Künstliche neuronale Netzwerke zur Modellierung des Zulaufverfahrens

Um die Biotransformation zur Cholsäureoxidation im Zulaufverfahren zu optimieren, wurden künstliche neuronale Netzwerke (KNN) angewandt, welche zur Schätzung von Substrat- und Produktkonzentrationen genutzt werden sollten. Künstliche neuronale Netze bestehen aus Schichten von untereinander verbundenen Neuronen, die biologischen Neuronen nachempfunden sind. Sie besitzen Eingänge (Dendrite), eine Entscheidungsfunktion (elektrochemisches Potential) und Ausgänge (Axone). Künstliche neuronale Netze können als „Black-Box“-Modelle eingesetzt werden, wenn rationale (mechanistische) Modelle nicht angewandt werden können.

Das künstliche neuronale Netzwerk wurde mit MATLAB (2009b, The Mathworks, Natick, MA, USA) erstellt. Hierzu wurden drei Funktionen implementiert, welche ein künstliches neuronales Netz definierter Architektur aufbauen, dieses mit experimentellen Daten trainieren und das erzeugte Modell anwenden.

Mit Standardeinstellungen (MATLAB-Befehl: *newfit*) wurde ein dreischichtiges künstliches neuronales Netz der Klasse aufgeschaltetes neuronales Netzwerk (*feedforward*) erzeugt. Jedes Neuron, welches exemplarisch in Abbildung 4.3 gezeigt wird, enthält dabei eine sigmoidale Entscheidungsfunktion der Form:

$$\varphi_a^{sig}(v) = \frac{1}{1+\exp(-av)} \quad 4.5$$

mit φ^{sig} : sigmoidale Aktivierungsfunktion [-]
 a : Steigungsmaß [-]
 v : Eingabewert [-]

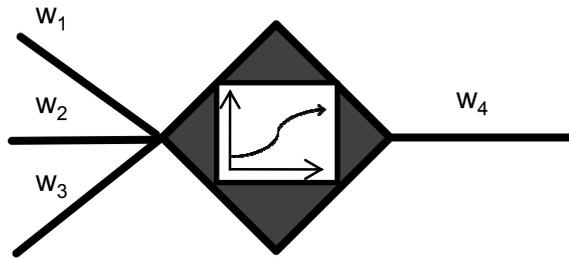


Abbildung 4.3: Aufbau eines Neuron innerhalb eines künstlichen neuronalen Netzwerks. Eingaben mit verschiedenen Gewichtungen (w_{1-3}) werden über eine sigmoidale Entscheidungsfunktion in eine Ausgabe umgerechnet, die ebenfalls gewichtet wird (w_4).

Zum Training des künstlichen neuronalen Netzes wurde der Levenberg-Marquardt-Algorithmus mit Rückwärtspropagierung (*backpropagation*) angewendet. Dabei nutzt das künstliche neuronale Netz einen Teil (70 %) der experimentellen Daten als Trainingsdaten, welche dem künstlichen neuronalen Netz zugeführt werden. Anschließend werden die Ergebnisse des künstlichen neuronalen Netzes mit den experimentellen Daten verglichen und die Gewichtungen w der Neurone modifiziert (MATLAB-Funktion: *train*).

Das trainierte künstliche neuronale Netzwerk kann anschließend als Modell für neue Zulaufprofile (Datensätze) angewandt werden (MATLAB-Funktion: *sim*). Auf die Architektur des künstlichen neuronalen Netzwerks zur Simulation des Zulaufverfahrens wird ausführlicher in 7.6 eingegangen.

4.10.2 Parameteridentifikation von mechanistischen Modellen

Beide Enzyme, *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase und 12 α -HSDH, die im zellfreien Ansatz eingesetzt werden, gehorchen einem geordneten bi-bi Mechanismus. Für die 12 α -HSDH wurde dieser Mechanismus mittels Produktinhibitionsstudien ermittelt (Braun *et al.*, 1991), für die *Thermoanaerobium brockii* Alkoholdehydrogenase, welche eine 97 % Identität zur *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase aufweist, wurde dieser ebenfalls beschrieben (Ford *et al.*, 1993). Hierbei bindet zuerst der Nukleotidkofaktor, gefolgt vom Alkohol beziehungsweise Keton, welche einen ternären Komplex bilden. Nach der Umsetzung verlässt zuerst das Produkt und anschließend der verbrauchte Kofaktor den Enzymkomplex. Das Schema ist in Abbildung 3.20 und Abbildung 6.1 zu sehen. Für die betrachteten Reaktionen gilt:

$$v = -\frac{dA}{dt} = -\frac{dB}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{dQ}{dt} \quad 4.6$$

Die Gleichung 3.8 berücksichtigt die Reversibilität der Reaktion und ist gültig für alle Konzentrationsbereiche. Die Variablen E , A , B , P und Q entsprechen den Konzentrationen des Enzy-

mes und der Reaktanten aus Abbildung 6.1. Die acht Mikroreaktionskonstanten können hinsichtlich elf kinetischer Parameter in Gleichung 3.8 ausgedrückt werden. Da elf kinetische Parameter von acht Mikroreaktionskonstanten abhängen, besteht eine Redundanz. Abhängige Parameter können mit der Methode von Straathof und Heijnen (1996) identifiziert und wie in Gleichung 4.7 - 4.9 ausgedrückt werden. Die Gleichung 4.7 entspricht dabei der Haldane-Beziehung, welche eine Korrelation der Gleichgewichtskonstante K_g mit den kinetischen Konstanten aufzeigt.

$$K_g = \frac{v_1 K_{iQ} K_{mP}}{v_2 K_{iA} K_{mB}} \quad 4.7$$

$$K_{mA} = K_{iA} \left(1 + \frac{v_1}{v_2} \left(1 - \frac{K_{mQ}}{K_{iQ}} \right) \right) \frac{K_{iQ} K_{mP}}{K_{iP} K_{mQ}} \quad 4.8$$

$$K_{iB} = \frac{v_1}{v_2} \frac{K_{iP} K_{iA} K_{mB} K_{mQ}}{K_{iQ} K_{mP} K_{mA}} \quad 4.9$$

Zwar setzen 12α -HSDH und die *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase verschiedene Substrate um, nutzen jedoch den gleichen Kofaktor NADP(H). Dieser Gesamtprozess kann demnach mit Hilfe von Massenbilanzen unter Annahme eines konstanten Volumens beschrieben werden. Für das Satzverfahren im idealen Rührkesselreaktor gilt:

$$\begin{aligned} \frac{dc_{NADPH}}{dt} &= -\frac{dc_{NADP^+}}{dt} = v_{HSDH} - v_{ADH-TE} \\ \frac{dc_{12-Keto-CDCS}}{dt} &= -\frac{dc_{Cholsäure}}{dt} = v_{HSDH} \\ \frac{dc_{Isopropanol}}{dt} &= -\frac{dc_{Aceton}}{dt} = v_{ADH-TE} \end{aligned} \quad 4.10$$

Die kinetischen Parameter der *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase und 12α -HSDH wurden unabhängig voneinander mittels Verlaufskurvenanalyse identifiziert. Ein Nelder-Mead-Simplex-Algorithmus (MATLAB R2008b; The Mathworks, Natick, MA, USA) wurde angewandt, um die Fehlerquadratsumme zu minimieren.

Diese direkte Suchmethode hängt stark von den Startwerten für die Modellparameter ab, welche beispielsweise über Untersuchungen der Anfangsgeschwindigkeiten erhalten werden können. Alternativ können Verfahren, wie die inkrementelle Methode (Brendel *et al.*, 2006) angewendet werden, um rechenaufwendige numerische Integrationen von kinetischen Modellen zu vermeiden. In der vorliegenden Arbeit wird eine ähnliche Strategie verwendet, um ohne numerische Integration einen großen Parameterraum abzudecken. Zuerst werden die experimentellen Daten interpoliert, um eine analytische Funktion zu erhalten, welche den Zeitverlauf

der NADPH-Konzentration beschreibt. Hierzu wurde ein künstliches neuronales Netz mit einer Eingabe-, einer versteckten und einer Ausgabebene verwendet. Der Wert jedes Knoten in der versteckten Ebene wird berechnet aus dem gewichteten Eingabewert (*time t*) und einem Grundlinienwert b_i entsprechend der logistischen Funktion:

$$h_i = \frac{1}{1 + \exp(w_i^l \cdot t + b_i)} \quad 4.11$$

Die lineare Kombination von $i = 12$ versteckten Neurone ergibt den Ausgabewert von der geschätzten NADPH-Konzentration:

$$\hat{c}_{NADPH}(t, w^l, w^H, b) = \sum_{i=1}^{12} w_i^H h_i \quad 4.12$$

Um die Gewichtungen und Grundlinienwerte, welche in den Matrices und Vektoren w^l , w^H , b gesammelt werden, zu identifizieren, wurde das künstliche neuronale Netz mittels *error back-propagation* unter Verwendung eines einfachen Gradienten-basierten *Newton-type* Algorithmus trainiert.

Die Reaktionsgeschwindigkeit folgt damit zu jedem Zeitpunkt der geschätzten NADPH-Konzentration, welche in Gleichung 4.13 dargestellt ist:

$$v^{ANN}(t) = \frac{d\hat{c}_{NADPH}}{dt} = \sum_{i=1}^{12} w_i^l w_i^H \frac{\exp(-(w_i^l t + b_i))}{1 + \exp(-(w_i^l t + b_i)^2)} \quad 4.13$$

Des Weiteren kann im einfachen Satzverfahren von den zeitlichen Verläufen der NADPH-Konzentration über die Stöchiometrie der Reaktion auf die Konzentrationen des Substrats (B) und Produkt (P) geschlossen werden. Mit Hilfe dieser Information ergibt sich für die Fehlerquadratsumme (SSE) der KNN-Schätzungen und der mechanistischen Reaktionsrate aus Gleichung 3.8 der folgende Zusammenhang:

$$SSE = \sum_{i=1}^n v^{ANN}(t_i) - v([NADPH](t_i), [NADP](t_i), [B](t_i), [P](t_i), p) \quad 4.14$$

Die zu identifizierenden kinetischen Parameter (v_1 , v_2 , K_{mA} , usw. aus Gleichung 3.8) werden im Vektor \mathbf{p} gesammelt und sind die einzigen Unbekannten in Gleichung 4.14. Die Parameter (Werte für \mathbf{p}) werden in einem zweistufigen Verfahren unter Minimierung der Fehlerquadratsumme (Gleichung 4.13) berechnet. In einer ersten Stufe wird ein Genetischer Algorithmus als globale Suchmethode eingesetzt. Der Genetische Algorithmus hat einige Vorteile verglichen mit den Gradienten-basierten Algorithmen, da er in der Lage ist, einen großen Parameterraum effizient zu untersuchen, um in die Nähe eines globalen Optimums zu gelangen. Die Parameter aus \mathbf{p} wurden nach unten bei 0 und nach oben durch die Werte in Tabelle 4.3 begrenzt. Die Werte wurden für die 12 α -HSDH basierend auf publizierten Daten erhoben (Braun *et al.*, 1991). Für die homologe *Thermoanaerobium brockii* Alkoholdehydrogenase

wurden höhere K_m veröffentlicht, weshalb ein größerer Bereich bis zu 10 mM untersucht wurde (Ford *et al.*, 1993).

Tabelle 4.3: Obere Grenzwerte für die Identifikation kinetischer Parameter für 12 α -HSDH und *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase (ADH-TE) (v_1 und v_2 (maximale Wechselzahlen) in min^{-1} , andere Werte in mM).

	12 α -HSDH	ADH-TE
v_1	10000	10000
v_2	10000	10000
K_{mB}	0,1	10
K_{mP}	0,1	10
K_{mQ}	0,1	0,1
K_{iA}	1	1
K_{iP}	1	10
K_{iQ}	1	1

Der vom Genetischen Algorithmus gefundene Parametersatz wurde als Ausgangspunkt für eine zweite Optimierung unter Verwendung eines Nelder-Mead-Simplex-Algorithmus genutzt, welcher nach 100 – 200 Iterationen zu einer minimalen Fehlerquadratsumme konvergierte. Auf diese Weise konnte die zeitintensive numerische Integration zu einer objektiven Funktionsbewertung des Simplex-Algorithmus reduziert werden. Zusätzlich ermöglicht die Kombination einer globalen Suchmethode (GA) mit einer lokalen Suche die Abschätzung aussagekräftiger Parameter.

Die Modellierung wurde freundlicherweise von Hannes Link (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität München) durchgeführt.

4.10.3 Optimierung mit statistischen Modellen

Um geeignete Reaktionsbedingungen für Ganzzellprozesse zur Steroidoxidation und -reduktion zu ermitteln, wurde der Einfluss ausgewählter Prozessparameter mittels *Response Surface* Methode (RSM) analysiert. Im Gegensatz zu Verfahren, in denen jeweils nur eine Variable pro Versuchsaufbau verändert wird, können bei der statistischen Versuchsplanung mehrere Variablen und deren Interaktionen gleichzeitig untersucht werden. Die *Response Surface* Methode kann zur Anwendung kommen, wenn eine Antwortgröße η von einem Satz von k unabhängigen Variablen $\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k$ abhängt. Die Einflussgrößen (Variablen) werden dabei normiert als Eingangsgrößen x_1, x_2, \dots, x_k verwendet. Die Antwortgröße η wird als Funktion der Eingabedaten x_1, x_2, \dots, x_k dargestellt:

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad 4.15$$

Um die unbekannte Funktion f zu beschreiben, wird bei der *Response Surface* Methode ein empirisches quadratisches Modell angewandt, welches sich wie folgt beschreiben lässt:

$$\eta = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 \quad 4.16$$

Diese Funktion berücksichtigt neben unabhängigen linearen und quadratischen Einflüssen, nur binäre lineare Interaktionen zwischen den Variablen und der Antwortgröße η . Die Bestimmung der Parameter β erfolgte durch Regression und Minimierung der Fehlerquadrate mit Hilfe der Funktion des Programms MATLAB (Mathworks, Natick, MA, USA).

Für die Versuchsplanung wurde ein dreidimensionales *Central Composite Design* des Typs *circumscribed* genutzt, bei dem sich ein Datenpunkt zentral im Designraum befindet und acht weitere Datenpunkte einen Würfel um diesen Punkt bilden (*factorial points*). Diese befinden sich für jede Variable um ± 1 vom Zentralpunkt entfernt und decken den Suchraum zur Identifikation der Parameter des beschriebenen Polynom 2.Ordnung ab. Zusätzlich enthält der Versuchsraum sechs weitere Punkte, die außerhalb des Suchraums liegen. Diese *star points* haben einen Abstand von $\pm \alpha$ zum Zentrum und stellen die Mittelpunkte aller Raumrichtungen dar. Der Wert α lässt sich von der Anzahl der untersuchten Faktoren ableiten (Montgomery, 2009):

$$\alpha = 2^{\frac{k}{4}} \quad 4.17$$

mit α : Abstand [-]
 k : Anzahl der Faktoren [-]

Bei der Verwendung von 3 Variablen ergibt sich ein Wert von $\alpha = 1,682$.

Für jeden Messpunkt wurden im Experiment Dreifachbestimmungen durchgeführt, wobei der Umsatz in Abhängigkeit dreier Variablen ermittelt wurde. Da der Umsatz als alleinige Antwortgröße nicht zu einer effizienten Prozessgestaltung genutzt werden kann, wurde ebenfalls die Produktkonzentration modelliert. Als Bedingung wurde definiert, dass der Umsatz im Bereich 0 – 100 % und die Produktkonzentration ≥ 0 mM und unterhalb der eingesetzten Substratkonzentration liegen muss.

5 Verbesserung wichtiger Hydroxysteroiddehydrogenasen mittels Protein Engineering

5.1 Erhöhung der Aktivität der 12 α -HSDH in Anwesenheit von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure

In den Arbeiten von Fossati *et al.* (2006) wurde eine starke Inhibierung der 12 α -HSDH in Anwesenheit des Produkts beschrieben. Um dennoch ökonomische Reaktionsgeschwindigkeiten bei hohen Produktkonzentrationen zu erhalten, sollte das Verfahren der gerichteten Evolution zur Verbesserung des Enzyms angewandt werden. Dieses Verfahren wird genutzt, wenn nur wenige Daten über den Zusammenhang zwischen Struktur, Sequenz und Mechanismus vorliegen (Bornscheuer & Pohl, 2001; Böttcher & Bornscheuer, 2010). Aus diesem Grund wurde zuerst eine Zufallsmutagenese durchgeführt. Nach Durchmusterung der erzeugten Mutantenbibliothek kann dann eine weitere Mutageneserunde erfolgen.

5.1.1 Durchmusterung einer zufallsbasierten Mutantenbibliothek

Es wurde zunächst eine zufallsbasierte Bibliothek von 12 α -HSDH-Mutanten unter Verwendung einer fehlerbehafteten PCR (*error-prone-PCR*, epPCR) erzeugt. Die Durchmusterung der Enzymvarianten erfolgte für ca. 3500 Mutanten. Zu jeder Versuchsreihe wurde eine Mikrotiterplatte mit Wildtypenzym als Vergleich untersucht. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in Anwesenheit von 10 % 12-Keto-Chenodesoxycholsäure bei einer Gesamtkonzentration von 5 mM Cholsäure und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure. So sollte der Aktivität bei einem Umsatz von 10 % entsprochen werden. Dieser Wert darf nicht zu niedrig gewählt werden, um den Einfluss des Produkts noch feststellen zu können. Zu hohe Konzentrationen bewirken eine große Zahl falsch-negativer Ergebnisse. Bei jedem Durchlauf wurde eine Kontrollplatte als Referenz gemessen, welche ausschließlich den Wildtyp der 12 α -HSDH enthielt.

Auf Grund des starken Rauschens der jeweiligen Kontrollplatte wurde zur Bewertung der Mutanten zum einen der Mittelwert der zehn höchsten Aktivitätswerte der Kontrollplatte und zum anderen der Maximalwert festgelegt. Anschließend wurden fünf Mutanten isoliert und

sequenziert, welche mindestens 50 % der Aktivität der zehn höchsten Aktivitäten und mindestens 25 % des Maximalwerts der jeweiligen Kontrollplatte aufwiesen.

5.1.2 Sequenzanalyse

Bei der Sequenzierung der Enzymvarianten wurde festgestellt, dass zwei gleiche Enzymvarianten isoliert wurden (A163V), sowie eine Sequenz mit Insertion beobachtet, welche für weitere Untersuchungen ausgeschlossen wurde. Die Aminosäuresubstitutionen der verbliebenen drei Mutanten sind in Tabelle 5.1 aufgeführt.

Tabelle 5.1: Aminosäuresubstitutionen der isolierten Mutante, bezeichnet nach der Position innerhalb der Mutantenbibliothek und der Mikrotiterplatte

Mutante	Aminosäuresubstitution(en)
2C5	V35A T125I
37D12	Q98H
41G2	A163V

Es ist zu erkennen, dass Mutanten mit einer oder zwei Mutationen isoliert wurden, wonach eine weitere Anzahl an Mutationen wahrscheinlich zu einer Beeinträchtigung der Aktivität führen. Des Weiteren verteilen sich die vier beobachteten Mutationen über die gesamte Sequenz.

5.1.3 Charakterisierung

Die Enzymvarianten aus Tabelle 5.1 wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und anschließend im Mikrotiter-Maßstab untersucht. Dabei wurde die 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration verändert, wobei die Gesamtkonzentration an Substrat und Produkt stets bei 5 mM blieb. Auf diese Weise sollte ein Rückschluss auf die Aktivität bei verschiedenen Umsätzen während des Prozesses gezogen werden.

Abbildung 5.1 zeigt eine deutlich verringerte Aktivität des Wildtyps in Anwesenheit steigender 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentrationen. Während bereits bei 1 % Produktanteil nur noch 80 % Restaktivität gemessen werden konnte, sank diese bei 25 % Anteil auf 11 %. Sämtliche Mutanten hingegen weisen deutlich höhere Restaktivität in Anwesenheit des Produkts auf. Bei 1 % Produktanteil behielten die Mutanten V35A T125I und A163V noch 96 % beziehungsweise 99 % ihrer Aktivität. Wurde der Produktanteil von 5 % untersucht, konnten noch für die Mutante V35A T125I 81 %, für Q98H 74 % und für A163V 70 % Aktivität bestimmt

werden. In Anwesenheit von 25 % Produkt konnte für die Mutanten V35A T125I und Q98H 40 %, für die Mutante A163V 39 % Restaktivität festgestellt werden, was einer 3,5-fach höheren verbliebenen Aktivität gegenüber dem Wildtyp entspricht.

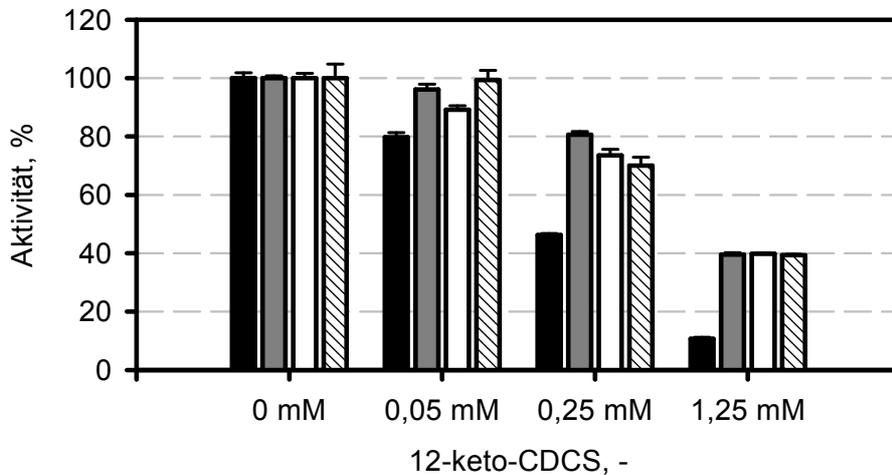


Abbildung 5.1: Aktivität verschiedener zufallsbasierter Enzymvarianten in Anwesenheit von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure. Die Wildtypaktivität (■) wird mit den Aktivitäten der Mutanten V35A T125I (▒), Q98H (□) und A163V (▨) verglichen. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen Aktivität samt Standardfehler einer Dreifachbestimmung bezogen auf die Enzymaktivität bei 0 mM 12-Keto-Chenodesoxycholsäure bei verschiedenen 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentrationen. Die Summe der Cholsäure- und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration beträgt 5 mM.

Da sämtliche Mutanten bei 25 % Produkt vergleichbare Restaktivitäten aufwiesen, sollte die Selektion einer Mutante für weitere Schritte anhand der volumetrischen Aktivität des Zelllysats vorgenommen werden. Das Zelllysate wurde jeweils unter derselben Expressions- und Aufschlussprozedur hergestellt. Dabei wurde von einer vergleichbaren Expression der Mutanten ausgegangen. Die Mutante Q98H wies etwa 44 % des Wildtyps auf, wohingegen die beiden anderen Mutanten weniger als 10 % der Aktivität zeigten. Auf Grund des deutlichen Unterschieds war die genaue Bestimmung der spezifischen Aktivität aller Mutanten nicht notwendig.

Um die Ergebnisse aus Abbildung 5.1 zu bestätigen, wurden die 12 α -HSDH, sowie die Mutante Q98H aufgereinigt und wiederholt untersucht, um eventuelle Einflüsse anderer Enzyme zu vermeiden. Abbildung 5.2 bestätigt das Ergebnis aus Abbildung 5.1, wobei ca. 3-fache Restaktivität gegenüber dem Wildtyp bei 25 % Produktanteil erhalten blieb. Die spezifische Aktivität wurde in diesem Versuchsansatz für die 12 α -HSDH mit $60,6 \pm 2,4 \text{ U mg}^{-1}$ und für die Mutante Q98H mit $37,0 \pm 7,4 \text{ U mg}^{-1}$ bestimmt. Damit wurde ein Verlust von ~40 % spezifischer Aktivität beobachtet.

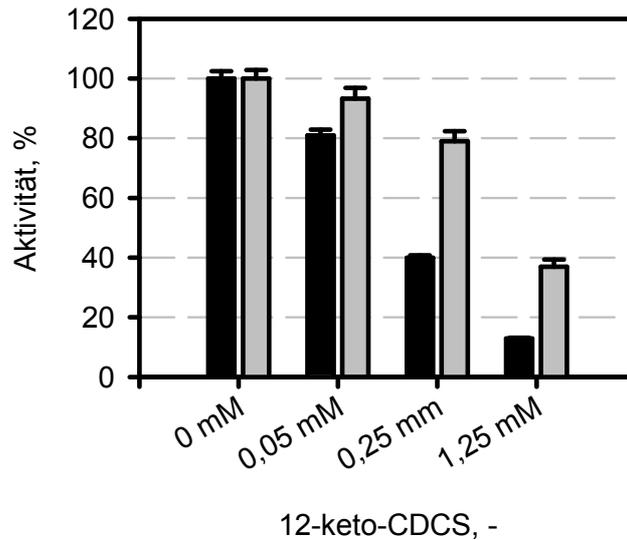


Abbildung 5.2: Aktivitäten der 12 α -HSDH Wildtyp und der Mutante Q98H in Anwesenheit von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure. Die Wildtypaktivität (■) wird mit den Aktivität der Mutante Q98H (▒) verglichen, die beide zuvor aufgereinigt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen Aktivität samt Standardfehler einer Dreifachbestimmung bei verschiedenen 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentrationen. Die Summe der Cholsäure- und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration beträgt 5 mM.

5.1.4 Sättigungsmutagenese

Das Prinzip der gerichteten Evolution beruht auf erneuten Mutageneserunden von bereits selektierten Mutanten. Aus diesem Grund wurde die Mutante Q98H, welche die höchste Restaktivität bei 25 % Produktanteil und den geringsten Verlust an Aktivität aufwies, für eine weitere Mutagenese gewählt. Basierend auf der Sequenzinformation der Mutante Q98H sollte für diesen Zweck ein Homologiemodell der 12 α -HSDH (freundlicherweise von Michael Knoll, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, erstellt) untersucht werden.

In Abbildung 5.3 weist die Position Q98 eine lokale Nähe sowohl zum gebundenen NADPH als auch zu Cholsäure auf. Die Mutation könnte sich daher auf die Bindung des Kofaktors, als auch des Substrats auswirken. Denkbar wäre beispielsweise ein schwächender Effekt der Kofaktorbindung. Im Röntgenstrukturmodell der 7 α -HSDH aus *E. coli* mit gebundener 7-Ketoglyco-Chenodesoxycholsäure aus den Arbeiten von Tanaka *et al.* (1996) ist C-24, welches das Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe von Chenodesoxycholsäure und Cholsäure darstellt, nahe dem Bereich im 12 α -HSDH-Homologiemodell gelegen, in dem sich die Mutation Q98H befindet. Daher kann auch ein Einfluss auf die Bindung von Substrat und Produkt möglich sein. Da keine eindeutige, rationale Erkenntnis bei Betrachtung des Homologiemodells und der mutierten Position gewonnen werden konnte, solle an Position 98 eine Sättigungsmutagenese durchgeführt werden.

Zusätzlich sollte eine benachbarte Position in die Mutageneserunde mit einbezogen werden, wobei die Position Ser100 ausgewählt wurde, die eine lokale Nähe zum Substrat aufweist, wie in Abbildung 5.3 zu erkennen ist. Mutationen an dieser Position könnten daher auch Auswirkungen auf die Enzymaktivität in Anwesenheit des Produkts haben. Um den experimentellen Aufwand zu minimieren, wurden Aminosäuren für diese Positionen ausgeschlossen, die hinsichtlich ihrer Hydrophobizität und Größe (P, I, L, F, Y, W, R) nicht untersucht werden sollten.

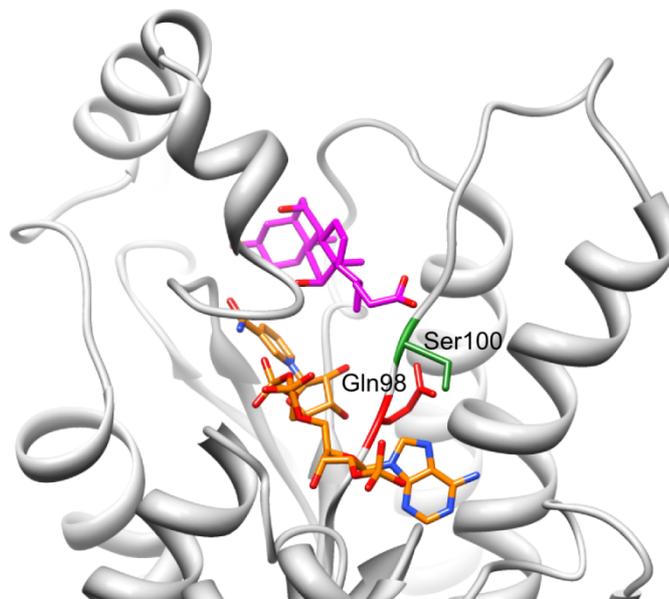


Abbildung 5.3: Ausschnitt des Homologiemodells eines 12 α -HSDH-Monomers. NADPH (orange) und Cholsäure (magenta) sind in die jeweiligen Bindungstaschen eingefügt. Die Aminosäureposition Gln98 (rot) und Ser100 (grün) sind markiert.

Tabelle 5.2: Synthetisches Genfragment zur Sättigungsmutagenese an Position 98 und 100 (rot markiert) der 12 α -HSDH

Synthetisches Genfragment	
Länge des Fragments	325 bp
Diversität	156
Proteinsequenz	1-MIFDGKVAIITGGGKAKSIGYGI AVAYAKE GANLVLTGRNEQKLLDAKEELERLYGIKVLP LAVDVTPSDESEDRVKEAVQKVIAEFGRIDV LINNAQASASGI-104
Aminosäuren Position 98	A,N,D,C,Q,E,G,H,M,S,T,V (gleichverteilt)
Aminosäuren Position 100	A,N,D,C,Q,E,G,H,M,S,T,V,K (gleichverteilt)

Es wurde daher das in Tabelle 5.2 beschriebene, synthetische Fragment von der Firma Sloning Biotechnology (Puchheim) erhalten, welches an den Positionen 98 und 100 variabel ist. An diesen Positionen sind 12 beziehungsweise 13 verschiedene, unter Ausschluss der

oben genannten Aminosäuren in gleicher Verteilung zu finden. Daraus ergibt sich eine Anzahl von 156 möglichen Mutanten. Das Fragment wurde nach Lieferung in den zuvor modifizierten pET22b(+)-12 α -HSDH-Vektor ligiert, in dem zuvor die Klonierungsschnittstelle *Bam*HI eliminiert und anschließend eine *Bam*HI-Schnittstelle innerhalb der Gensequenz eingefügt wurde. Nach Gleichung 5.1 müssen zur Abdeckung von 99,9 % 1075 Mutanten durchmustert werden:

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln\left(1-\frac{1}{f}\right)} \quad 5.1$$

mit N : Anzahl der Klone [-]
 p : Abdeckung [-]
 f : Diversität [-]

5.1.5 Durchmusterung der Sättigungsmutagenese-Bibliothek

Die Durchmusterung der semi-rationalen Enzymvarianten-Bibliothek erfolgte für ca. 1000 Mutanten nach den Bedingungen, wie sie bei der Zufallsbibliothek angewandt wurde. Nach Ausschluss gleicher Aminosäuresubstitutionen wurden die Mutanten zur Expression in *E. coli* BL21(DE3) ausgewählt, die in der Durchmusterung deutlich höhere Aktivitäten gegenüber der Kontrollen (Wildtyp und Mutante Q98H) aufwiesen. Anschließend wurden die vier Enzymvarianten mit den höchsten volumetrischen Aktivitäten (bei gleichen Aufschlussbedingungen) ausgewählt.

5.1.6 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der vier Mutanten ergab die Aminosäuresubstitutionen aus Tabelle 5.3. Es wurde eine Einfachmutante und drei Doppelmutanten isoliert. Position 98 ist dabei sowohl von hydrophoben (M, A) als auch einer polaren Aminosäure (S) besetzt, an Position 100 sind die kleinen, polaren Aminosäuren T, C und N zu finden.

Tabelle 5.3: Aminosäuresubstitutionen der isolierten Enzymvarianten, bezeichnet nach der Position innerhalb der Mutantenbibliothek und der Mikrotiterplatte

Mutante	Aminosäuresubstitution(en)
1H6	Q98S S100T
4C6	Q98M S100C
4G6	Q98S S100N
9F5	Q98A

5.1.7 Charakterisierung

Die Aktivitäten der vier Mutanten Q98S S100T, Q98M S100C, Q98S S100N und Q98A wurden ebenfalls bei verschiedenen Produktanteilen im Mikrotiter-Maßstab untersucht. Diese sind in Abbildung 5.4 mit den Aktivitäten des Wildtyps verglichen. Abgesehen von der Mutante Q98S S100N verblieb bei sämtlichen Mutanten über 80 % der Aktivität in Anwesenheit von 5 % Produkt. Bei 25 % Produktanteil wird der Unterschied zum Wildtyp und den Mutanten aus Abbildung 5.1 noch deutlicher, in dem für die Mutante Q98S S100T 60 % Restaktivität, für Q98M S100C 52 % und für die Q98A 45 % erhalten wurde. Damit konnte die Restaktivität bei 25 % Produktanteil um das 4,2 – 5,6-fache gegenüber dem Wildtyp erhöht werden.

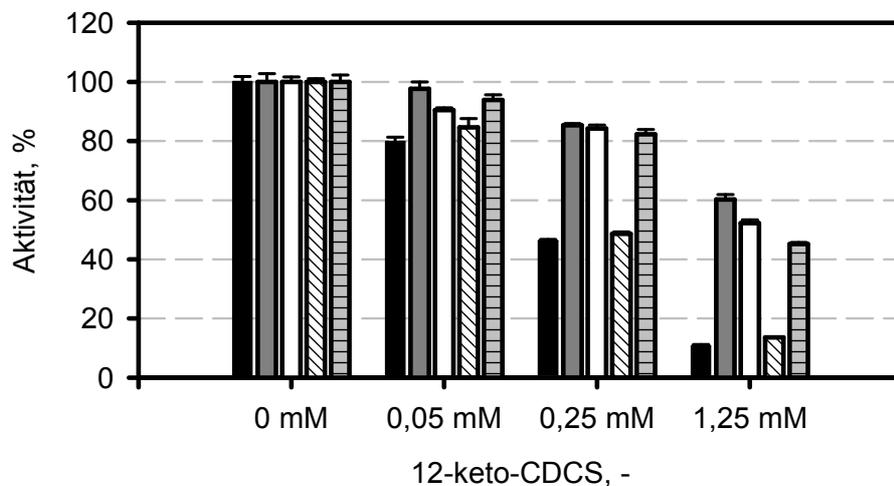


Abbildung 5.4: Aktivität verschiedener Sättigungsmutagenese-Mutanten in Anwesenheit von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure. Die Wildtypaktivität (■) wird mit den Aktivitäten der Mutanten Q98S S100T (▣), Q98M S100C (□), Q98S S100N (▨) und Q98A (▤) verglichen. Gezeigt sind die relativen Mittelwerte der Aktivität samt Standardfehler einer Dreifachbestimmung bei verschiedenen 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentrationen. Die Summe der Cholsäure- und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration beträgt 5 mM.

Jedoch zeigten sämtliche Mutanten einen weiteren Verlust der Aktivität. Der Anteil der Enzymvariante am Gesamtprotein wurde mittels SDS-PAGE abgeschätzt und mit der gemessenen volumetrischen Aktivität des Zellysats verrechnet. Anschließend wurde festgestellt, dass die Mutanten Q98S S100T und Q98M S100C weniger als 10 % der Wildtypaktivität behielten. Die Mutante Q98A zeigte noch 21 % der Wildtypaktivität. Aus diesem Grund wurde Q98A für den Einsatz in der weiteren, biokatalytischen Untersuchung gewählt.

5.1.8 Einsatz der Enzymmutanten in der Biokatalyse mit isolierten Enzymen

Um die Prozesstauglichkeit der Mutanten Q98H und Q98A zu untersuchen, sollten diese im Prozess zur Oxidation von Cholsäure mit isolierten Enzymen mit dem Wildtypenzym vergli-

chen werden. Hierzu wurde die 12α -HSDH-Aktivität des Zelllysats bestimmt und 10 U mL^{-1} zur Umsetzung von 100 mM Cholsäure eingesetzt. Zur Kofaktorregenerierung wurde die Acetonabhängige *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase eingesetzt.

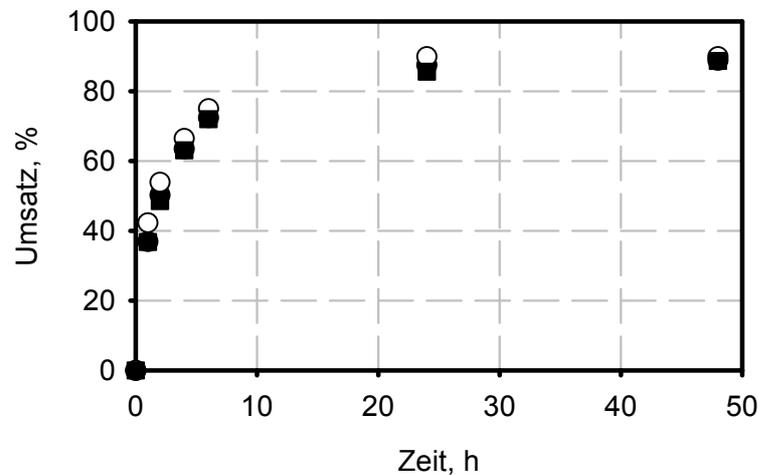


Abbildung 5.5: Vergleich des 12α -HSDH-Wildtyp (●) und der Mutanten Q98H (○) und Q98A (■) in der Oxidation von Cholsäure. Gezeigt ist der Umsatz von 100 mM Cholsäure mit 10 U mL^{-1} HSDH, 2 U mL^{-1} *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase und $1,34 \text{ M}$ Aceton bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ über 48 h .

In Abbildung 5.5 weisen die eingesetzten Mutanten keinen Vorteil gegenüber dem Wildtypenzym auf. Da jeweils auf die 12α -HSDH-Aktivität normiert wurde, musste bei den Mutanten ein größeres Volumen Zelllysats und damit eine größere Menge an 12α -HSDH-Enzymvariante eingesetzt werden, so dass sich der Einsatz der Mutanten nicht begründen lässt.

5.2 Änderung der Kofaktorspezifität der 12α -HSDH

Die 12α -HSDH benötigt NADP^+ als Kofaktor, welcher gegenüber der unphosphorylierten Form zum einen teurer ist und zum anderen eine geringere Stabilität im Prozess aufweist. Die volumetrische Aktivität von Zelllysats mit exprimierter 12α -HSDH mit $0,25 \text{ mM}$ des jeweiligen Kofaktors erbrachte eine um das 210-fache höhere Aktivität mit NADP^+ gegenüber NAD^+ . Daher sollte die Kofaktorspezifität von NADP^+ zu NAD^+ mittels positiongerichteter Mutagenese geändert werden.

Die 12α -HSDH wird zu den Short-Chain-Dehydrogenasen / Reduktasen gezählt (Braun *et al.*, 1991; Braun, 2008). Eine wichtige, gemeinsame Struktur der klassischen Short Chain Dehydrogenase / Reduktasen ist nahe des N-Terminus gelegen, welche durch die Aminosäuresequenz T-G-X₃-G-X-G gekennzeichnet und an der Bindung der Kofaktoren NAD(H) beziehungsweise NADP(H) beteiligt ist. Diese Kofaktor-Bindedomäne wird nicht nur in Short

Chain Dehydrogenasen / Reduktasen, sondern auch bei anderen Dehydrogenasen gefunden (Rao & Rossmann, 1973; Wierenga *et al.*, 1985; Bocanegra *et al.*, 1993).

5.2.1 Mutagenese der Position 38 und 39

Es wird angenommen, dass die Kofaktorspezifität bei den Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen durch Aminosäuren am Ende des β_2 -Stranges bestimmt wird (Persson *et al.*, 2003), wobei ein Aspartat- oder Glutamatrest mit einer NADH-Abhängigkeit einhergeht (Wierenga *et al.*, 1986; Scrutton *et al.*, 1990; Bocanegra *et al.*, 1993). NADPH-abhängige Enzyme zeigen an dieser Position häufig zwei basische Reste, wobei diese Voraussetzung geringer ausgeprägt ist (Persson *et al.*, 2003). Zur Bestätigung werden in Abbildung 5.6 NADH- und NADPH-abhängige Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen miteinander verglichen.

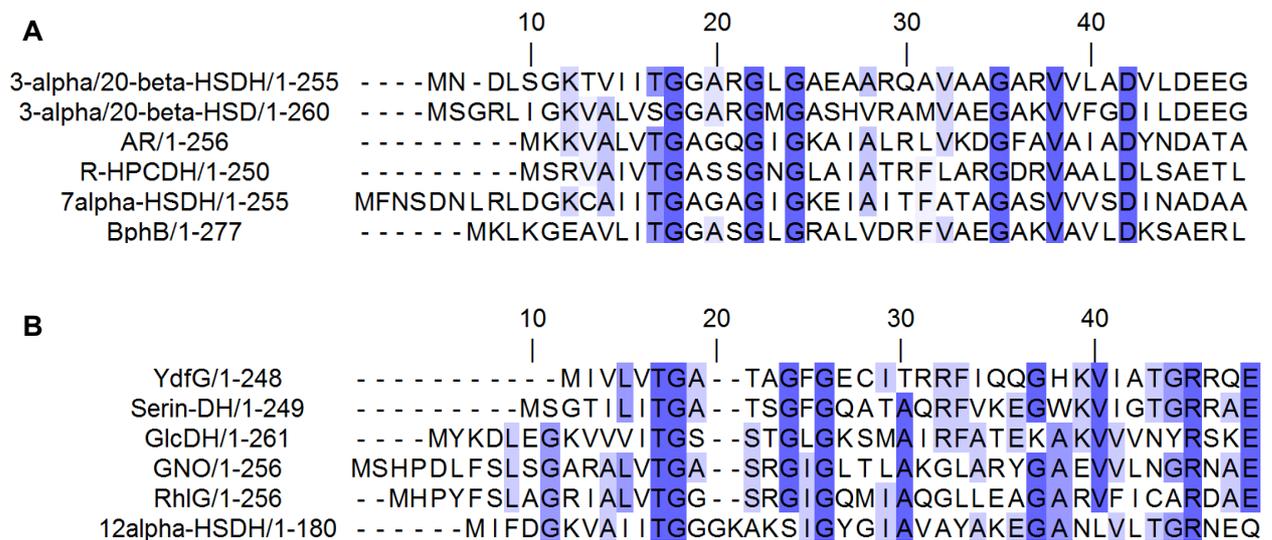


Abbildung 5.6: Sequenzvergleich NADH (A)- und NADPH (B)-abhängiger Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen zwischen den Aminosäuren 1 und 48 im Einbuchstabencode. Konservierte Bereiche sind farblich unterlegt. 3- α /20- β -HSDH: 3- α /20- β -HSDH aus *Streptomyces exfoliates*; 3- α /20- β -HSD: 3- α /20- β -HSDH *Mycobacterium tuberculosis*; AR: Diacetylreduktase aus *Klebsiella pneumoniae*; R-HPCDH: 2-(R)-hydroxypropyl-CoM Dehydrogenase aus *Xanthobacter autotrophicus*; 7 α -HSDH: 7 α -HSDH aus *Escherichia coli*; YdfG: L-Serin/L-allo-Threonin Dehydrogenase aus *Escherichia coli*; Serin-DH: Serin-Dehydrogenase aus *Agrobacterium tumefaciens*; GlcDH: Glucose 1-Dehydrogenase aus *Bacillus megaterium*; GNO: Gluconat 5-Dehydrogenase aus *Gluconobacter oxydans*; RhlG: Rhamnolipidbiosynthese 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] Reduktase aus *Pseudomonas aeruginosa*; 12alpha-HSDH: 12 α -HSDH aus *Clostridium* group P, strain C48 – 50.

Bei Betrachtung des Alignment ist ein konservierter Aspartatrest in Position 42 zu erkennen. Die entsprechende Position im Sequenzvergleich der NADPH-abhängigen Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen ist geringer konserviert, jedoch weist die folgende Position, welche die Position 45 im Sequenzalignment der NADPH-abhängigen Short Chain Dehydroge-

nasen / Reduktasen darstellt, einen konservierten Argininrest auf. Sämtliche Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen weisen das typische G-X₃-G-X-G-Motiv auf. Eine Ausnahme bildet die untersuchte 12 α -HSDH, welche ein abgewandeltes Motiv in diesem Bereich besitzt.

Die NADH-bestimmende Position, welche in Abbildung 5.6 A mit Asp42 zu finden ist, entspricht der Position 38 in der 12 α -HSDH-Sequenz. Das konservierte, NADPH-bestimmende Arginin befindet sich an Position 39. Beide Positionen sind im Homologiemodell der 12 α -HSDH in Abbildung 5.7 markiert. Die Aminosäuren an den beiden Positionen weisen eine deutliche Nähe zum Phosphatrest an C2' des Riboseteils von NADPH auf, so dass von einer Beteiligung von Gly38 und Arg39 an der Kofaktorspezifität der 12 α -HSDH ausgegangen werden kann. Die Mutanten G38D und G38D R39L wurden bereits in eigenen Vorarbeiten erzeugt, wobei ein deutlicher Aktivitätsverlust zu verzeichnen war (Braun, 2008). Diese Varianten sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit erneut vermessen und weitergehend untersucht werden.

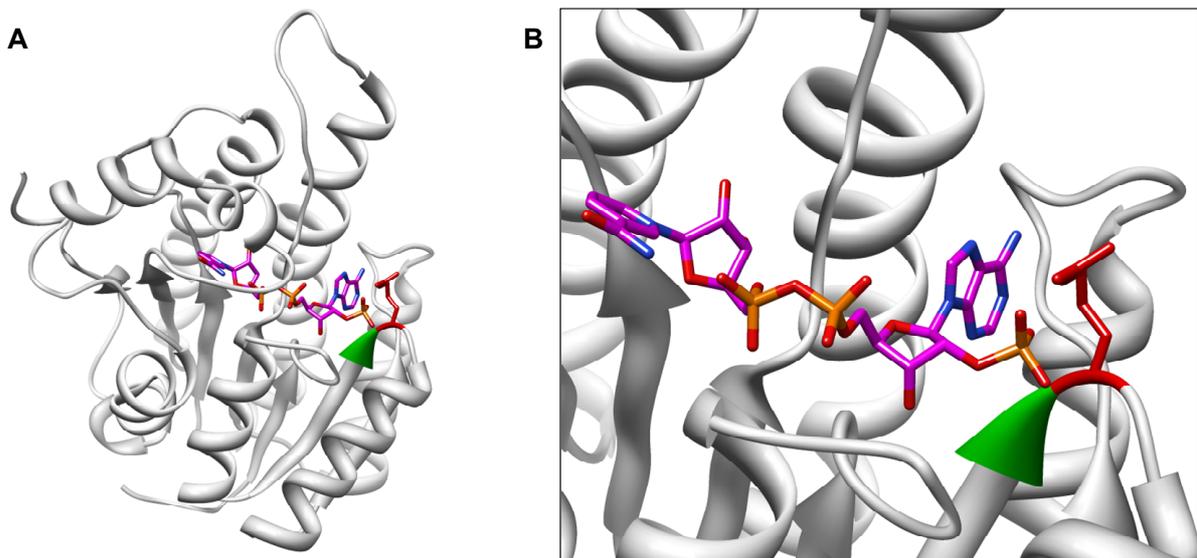


Abbildung 5.7: Homologiemodell eines 12 α -HSDH-Monomers in der Gesamtansicht (A) und Vergrößerung der Kofaktorbindestelle (B). Die Aminosäuren Gly38 und Arg 39 sind grün beziehungsweise rot markiert, NADPH ist farblich hervorgehoben.

Zuerst sollte eine Mutagenesestudie die Bedeutung der Position 38 bestätigen, indem diese durch Aminosäuren verschiedener Eigenschaften mittels positionsgerichteter Mutagenese ersetzt wurden. Des Weiteren sollte die Position 39 mit einem Leucinrest substituiert werden. Da eine prozessrelevante Mutante gefunden werden sollte, wurde eine Arbeitskonzentration von NAD⁺ zur Aktivitätsbestimmung von 0,25 mM gewählt. Die basale NAD⁺-Aktivität des Zelllysats von *E. coli* BL21(DE3) wurde bestimmt und in sämtlichen, nachfolgenden NAD⁺-Aktivitätstests berücksichtigt. Die Zellen wurden nach Expression mittels Ultraschall aufgeschlossen (4.3.4).

Anschließend wurde der Proteingehalt des Zellysats bestimmt, sowie der Anteil der Enzymvariante an der Gesamtproteinmenge mittels SDS-PAGE abgeschätzt und mit der gemessenen Aktivität verrechnet. Darauf erfolgte eine Normierung auf die Wildtyp-Aktivität, da eine gegenüber dem Wildtyp verbesserte Mutante unter prozessrelevanten Bedingungen gefunden werden sollte.

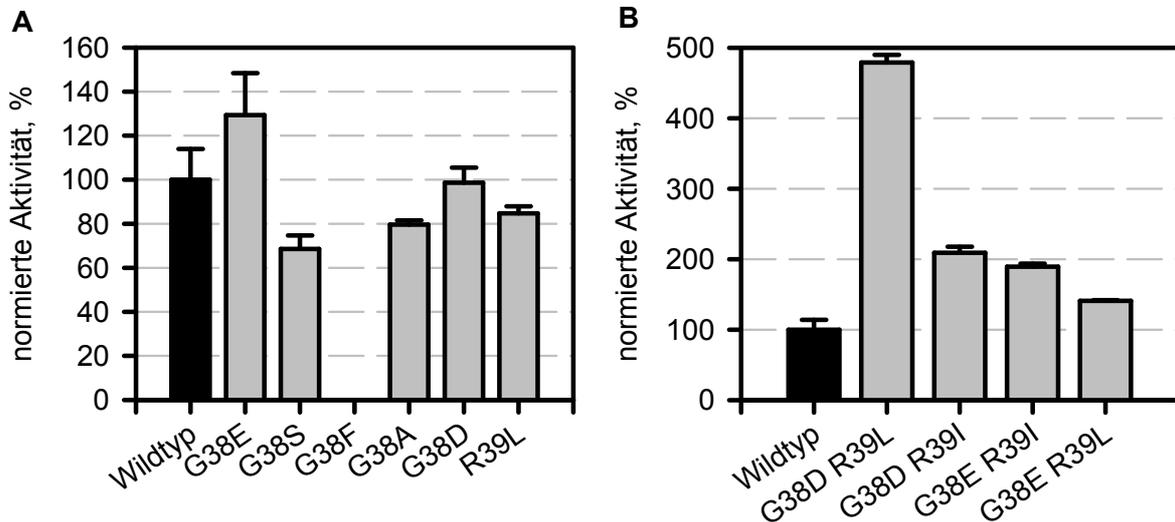


Abbildung 5.8: Auswirkung von Einfach- (A) und Doppelmutationen (B) in Positionen 38 und 39 der 12 α -HSDH auf die Aktivität mit NAD⁺. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen 12 α -HSDH-Aktivität mit 0,25 mM NAD⁺ und Standardfehler im Dreifachansatz. Die relative HSDH-Aktivität bezieht sich auf die Aktivität des Wildtyps, deren absolute Aktivität als 100 % gesetzt wurde.

In Abbildung 5.8 A ist zu erkennen, dass sämtliche Gly38-Mutanten kaum Verbesserung der NAD⁺-Aktivität aufweisen. Die Substitution durch die hydrophobe Aminosäure Phenylalanin führte zu einem Verlust der Aktivität. Die Aktivität der Mutante G38D entsprach in etwa der des Wildtyps. Der Austausch von Arg39 erbrachte ebenfalls keine Vorteile. Aus diesem Grund sollten verschiedene Doppelmutanten untersucht werden, wobei in Position 38 die beiden sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat und in Position 39 die lipophilen Aminosäuren Leucin und Isoleucin betrachtet werden sollten. Die Auswertung Abbildung 5.8 B zeigt eine deutliche Verbesserung der NAD⁺-Aktivität bei einer Arbeitskonzentration von 0,25 mM aller Doppelmutanten. Aspartat in Position 38 stellt sich dabei gegenüber Glutamat vorteilhafter dar. Die Mutante G38D R38L wies 480 % der NAD⁺-Aktivität des Wildtyps auf. Damit scheinen zumindest zwei Aminosäurepositionen für die Kofaktorspezifität der 12 α -HSDH von Bedeutung zu sein.

5.2.2 Modifikation des Glycin-reichen, kofaktorbindenden Motives

Wie in Abbildung 5.6 zu sehen, kann das bei klassischen Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen hochkonservierte Motiv T-G-X₃-G-X-G in der Sequenz der 12 α -HSDH nicht gefunden werden. Auch das bei *extended* Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen analoge Motiv T-G-X₂-G-h-a-G (mit a: aromatische Aminosäure, h: hydrophobe Aminosäure) oder der divergenten Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen, wie beispielsweise G-X₅-S-X-A sind nicht vorhanden (Persson *et al.*, 2003). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob positionsgerichtete Mutationen zur Angleichung an das konservierte Sequenz-Motiv G-X₃-G-X-G zu einer verbesserten NAD⁺-Aktivität führen.

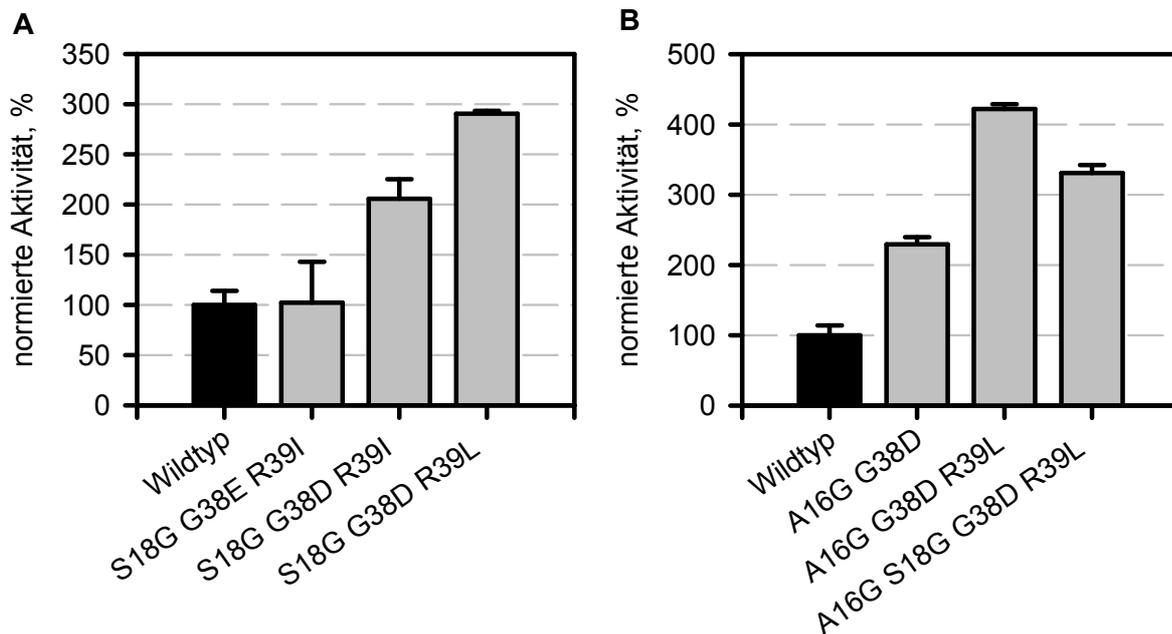


Abbildung 5.9: Auswirkung der S18G-Mutation (A) und A16G-Mutation (B) auf bereits gezeigte Mutanten der 12 α -HSDH hinsichtlich der Aktivität mit NAD⁺. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen 12 α -HSDH-Aktivität mit 0,25 mM NAD⁺ und Standardfehler im Dreifachansatz. Die relative HSDH-Aktivität bezieht sich auf die Aktivität des Wildtyps, deren absolute Aktivität als 100 % gesetzt wurde.

Zuerst sollte Ser18 durch Gly ersetzt werden, so dass die Sequenz G-G-G-K-A-K-G-I-G entsteht. Dies wurde für die drei besten Mutanten aus Abbildung 5.8 B durchgeführt. Die drei erstellten S18G-Mutanten wiesen in Abbildung 5.9 A vergleichbare oder verringerte Aktivitäten mit NAD⁺ gegenüber den entsprechenden Doppelmutanten in Abbildung 5.8 B auf, wobei die S18G-Mutante mit der Doppelmutation G38D R38L wiederum die höchste Aktivität von etwa 290 % des Wildtyps zeigte. Daher wurde die Modifikation von Alanin in Position 16 für die Mutanten G38D, G38D R39L und S18G G38D R39L durchgeführt. Auf diese Weise sollte zum einen das Sequenzmotiv G-G-G-K-G-K-S-I-G-Y-G und zum anderen G-G-G-K-G-K-G-I-G-Y-G erzeugt werden, welche beide das Zielmotiv enthalten.

Die Mutation von Serin zu Glycin in Position 18 erbrachte, wie in Abbildung 5.9 A zu sehen, keine Verbesserung der Aktivität unter den Arbeitsbedingungen gegenüber dem Wildtyp. Gegenüber den entsprechenden Doppelmutanten konnte entweder keine oder eine verminderte Aktivität festgestellt werden. Es fällt auf, dass wiederum die Aminosäuren Aspartat und Leucin in Position 38 und 39 zu der höchsten Aktivität führte.

Bei Austausch von Alanin in Position 16 zu Glycin konnte in Abbildung 5.9 B ebenfalls keine Verbesserung erzielt werden. Die Aktivität der Mutante A16G G38D R39L war zwar leicht höher gegenüber der entsprechenden S18G-Mutante, lag jedoch unter der Aktivität der Doppelmutante G38D R39L. Auch die Generierung des Motivs G-G-G-K-G-K-G-I-G-Y-G erbrachte für die Aminosäuren Aspartat und Leucin in Position 38 und 39 keinen Vorteil. Interessant ist, dass die Mutante A16G G38D eine um 100 % erhöhte Aktivität des Wildtyps aufweist, wohingegen die Einzelmutante G38D keine Verbesserung erzielte. Auch in dieser Versuchsreihe wird die Bedeutung der Doppelmutation G38D R39L deutlich.

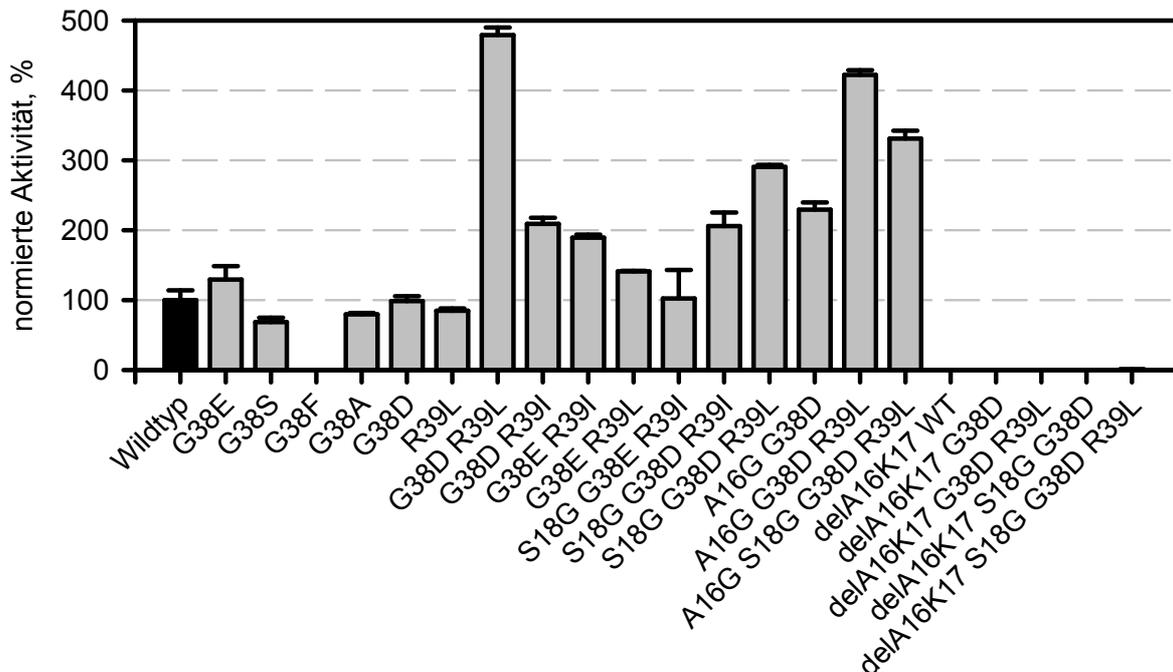


Abbildung 5.10: Übersicht aller erstellten Mutanten. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen 12α -HSDH-Aktivität mit $0,25 \text{ mM NAD}^+$ und Standardfehler im Dreifachansatz. Die relative HSDH-Aktivität bezieht sich auf die Aktivität des Wildtyps, deren absolute Aktivität als 100 % gesetzt wurde. del: Deletion.

Ein weiterer Versuch zur Erlangung der Konsensussequenz G-X₃-G-X-G war die Deletion zweier Aminosäuren innerhalb des entsprechenden Sequenzmotivs der 12α -HSDH. Hierzu wurden die Aminosäuren Ala16 und Lys17 entfernt, um anschließend Ser18 zu Glycin zu ändern und das Zielmotiv zu erhalten. Abbildung 5.10 zeigt eine Übersicht der NAD^+ -Aktivitäten aller erstellten Mutanten. Die Deletion der beiden Aminosäuren als auch die an-

schließende Mutation S18G führte zu einem vollständigen Verlust der Aktivität dieser Enzymvarianten. Dies deutet an, dass dieses ungewöhnliche Sequenzmotiv von essentieller Bedeutung für die Enzymaktivität ist und diese nicht deletiert werden dürfen.

5.2.3 Erhöhung der NAD⁺-Konzentrationen

Die Aktivität der Mutante G38D R39L, welche in Abbildung 5.10 die höchste Aktivität bei einer NAD⁺-Konzentration von 0,25 mM aufweist, sollte bei höheren Kofaktorkonzentrationen untersucht werden. Hierzu wurden 1 – 20 mM NAD⁺ eingesetzt. Des Weiteren wurde die Konzentration der Enzymvariante G38D R39L mittels densitometrischer Auswertung unter Verwendung eines kalibrierten Protein-Standards abgeschätzt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte im Mikrotiterplatten-Photometer.

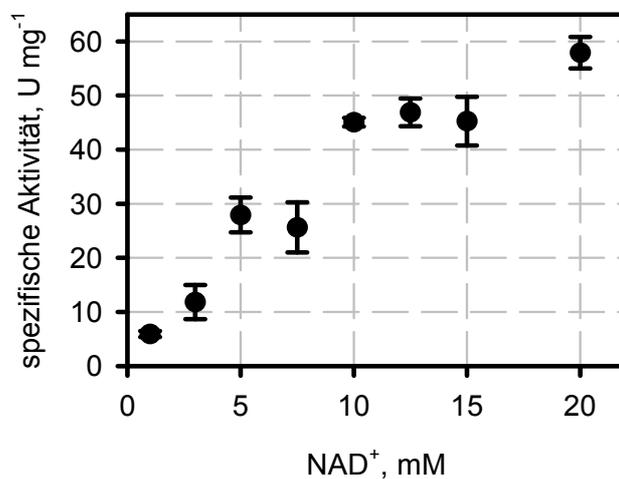


Abbildung 5.11: Spezifische Aktivitäten der 12 α -HSDH-Mutante G38D R39L bei verschiedenen NAD⁺-Konzentrationen. Zu sehen ist der Mittelwert der Aktivitätsmessung samt Standardfehler einer Dreifachbestimmung bei verschiedenen NAD⁺-Konzentrationen und 5 mM Cholsäure.

Das Ergebnis in Abbildung 5.11 zeigt deutlich, dass wesentlich höhere Aktivitäten erreicht werden können, wenn eine Erhöhung der NAD⁺-Konzentration erfolgt. Während bei 1 mM NAD⁺ 5,9 ± 0,6 U mg⁻¹ erhalten werden, steigert sich die Aktivität bei 10 mM bereits auf 45,1 ± 0,8 U mg⁻¹ und bei 20 mM auf 57,9 ± 2,9 U mg⁻¹.

5.3 Erhöhung der Aktivität der 12 α -HSDH

5.3.1 Vergleich der NADP⁺-Aktivitäten der 12 α -HSDH-Einzelmutanten

Die Aktivitäten der in Kapitel 5.2 erstellten Mutanten wurden ebenfalls mit 0,25 mM NADP⁺ gemessen, da vermutet wurde, dass Mutationen, welche die Kofaktorbindung betreffen, Auswirkungen auf die NADP⁺-Aktivitätseigenschaften haben. Im Reaktionsmechanismus einer Klasse 1 Alkoholdehydrogenase, welche zu den mittelkettigen Dehydrogenasen / Reduktasen gehört, wird vermutet, dass die Dissoziation des Kofaktors den geschwindigkeitslimitierenden Schritt darstellt (Charlier & Plapp, 2000). Die relativen Aktivitäten der Einzelmutanten sind in Abbildung 5.12 dargestellt.

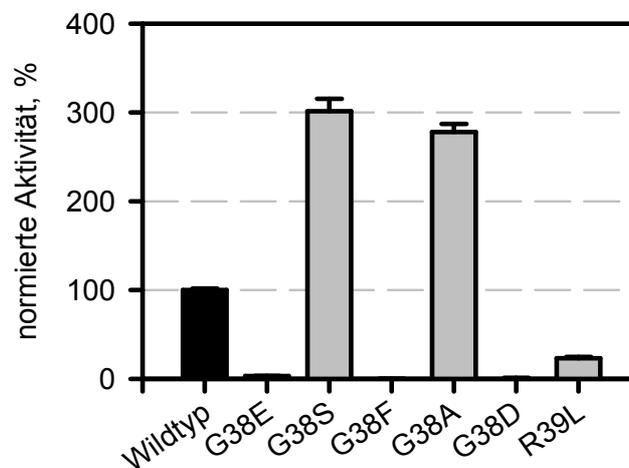


Abbildung 5.12: Auswirkung von Einfachmutationen in Positionen 38 und 39 der 12 α -HSDH auf die Aktivität mit NADP⁺. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen 12 α -HSDH-Aktivität mit 0,25 mM NADP⁺ und Standardfehler im Dreifachansatz. Die relative HSDH-Aktivität bezieht sich auf die Aktivität des Wildtyps, deren absolute Aktivität als 100 % gesetzt wurde.

Während die Mutanten G38E, G38F, G38D und R39L keinerlei oder nur kaum Aktivität unter Verwendung von 0,25 mM NADP⁺ zeigten, konnte bei den Mutanten G38S und G38A eine deutlich erhöhte Aktivität gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. Diese lag unter den Arbeitsbedingungen bei 300 % beziehungsweise 280 %.

5.3.2 Charakterisierung der 12 α -HSDH-Varianten mit gesteigerten Aktivitäten

Die Enzymvarianten G38A und G38S, welche in Abbildung 5.12 deutlich höhere Aktivitäten als das Wildtypenzym aufwiesen, sollten näher charakterisiert werden. Die Enzymkinetiken wurden im Mikrotiterplatten-Photometer aufgenommen. Die Ermittlung von K_m (Cholsäure) erfolgte unter Verwendung von Zelllysät, wobei 32 Substratkonzentrationen von 6 μ M bis 10 mM Cholsäure bei einer konstanten NADP⁺-Konzentration von 0,1 mM untersucht wurden.

Zur Bestimmung von K_m (NADP⁺) und v_{max} wurde mittels FPLC aufgereinigtem Enzympräparat bei konstanten 5 mM Cholsäure im Reaktionsansatz eingesetzt. Dabei wurden 24 NADP⁺-Konzentration von 10 µM bis 1 mM im Dreifachansatz untersucht. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software Sigma Plot 8.0 (Systat Software, Inc., San Jose, USA), in dem die Werte für v_{max} und K_m mit Hilfe nichtlinearer Regression identifiziert wurden.

Tabelle 5.4: Kinetische Parameter der 12α-HSDH und deren Enzymvarianten G38A und G38S

	K_m (Cholsäure), µM	K_m (NADP ⁺), µM	v_{max} , U mg ⁻¹
12α-HSDH Wildtyp	138±11	11,2±1,1	23,1±0,4
12α-HSDH G38A	300±25	52±5	98,3±4
12α-HSDH G38S	252±27	195±7	188±4

Zunächst fällt bei den ermittelten kinetischen Parametern der 12α-HSDH Wildtyp in Tabelle 5.4 auf, dass diese von den publizierten Daten von Braun *et al.* (1991) abweichen. Deutlich ist der Unterschied bei v_{max} , der um ein Mehrfaches geringer ermittelt wurde. Es wurden zwar unterschiedliche Messbedingungen wie beispielsweise den eingesetzten Kaliumphosphatpuffer (100 mM statt 50 mM beziehungsweise 30 mM), als auch eine andere Auswertungsmethode verwendet, jedoch lässt sich das Ergebnis dadurch nicht vollständig erklären. Des Weiteren ist möglich, dass unspezifisch gebundene Proteine bei der FPLC-Aufreinigung nicht vollständig entfernt wurden, so dass die Proteinmenge zu hoch bestimmt wurde. Die Abweichung zu den veröffentlichten Daten konnte abschließend jedoch nicht geklärt werden.

Betrachtet man die Parameter K_m für Cholsäure und NADP⁺, so fällt auf, dass sich die Halbsättigungskonstanten durch das Einfügen von Alanin und Serin in Position 38 deutlich erhöhen. Während sich K_m (Cholsäure) bei beiden Mutanten etwa verdoppelt, ist K_m für NADP⁺ etwa 5-fach (G38A) beziehungsweise 18-fach (G38S) erhöht. Besonders auffällig ist ebenfalls, dass die beiden erzeugten Mutanten deutlich höhere maximale Geschwindigkeiten aufweisen. Im Falle der Enzymvariante G38A konnte diese etwa um das 4-fache, im Falle der Enzymvariante G38S etwa um das 8-fache erhöht werden.

5.4 Verminderung der Substratinhibierung der 7β-HSDH

Die Effekte der analogen Aminosäuresubstitutionen in der Sequenz der 7β-HSDH sollten ebenfalls untersucht und anschließend mit den Ergebnissen der 12α-HSDH-Enzymvarianten

verglichen werden. Die Messungen erfolgten im Mikrotiterplatten-Photometer, wobei Zellysate zum Einsatz kam. Die 7 β -HSDH-Konzentration wurde densitometrisch unter Verwendung eines geeigneten Proteinstandards ermittelt. Der Einfluss der Dehydrocholsäure-Konzentration auf die spezifische Aktivität wurde bei einer konstanten Kofaktor-Konzentration von 100 μ M ermittelt, wobei die Substratkonzentration von 7 μ M bis 10 mM bei 31 verschiedenen Konzentrationen verändert wurde.

Die Abhängigkeit der Aktivitäten von der NADPH-Konzentration wurde bei einer konstanten Dehydrocholsäure-Konzentration von 300 μ M untersucht, da sich hier in etwa die optimale Geschwindigkeit v_{opt} der 7 β -HSDH befindet. Beim Wildtyp wurden acht NADPH-Konzentrationen von 25 bis 100 μ M, bei den Mutanten 16 verschiedene Konzentrationen von 6 μ M bis 100 μ M vermessen. Die jeweilige Reaktionsgeschwindigkeit wurde mittels linearer Regression über die ersten 18 sek der Messung ermittelt. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software IGOR Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, USA).

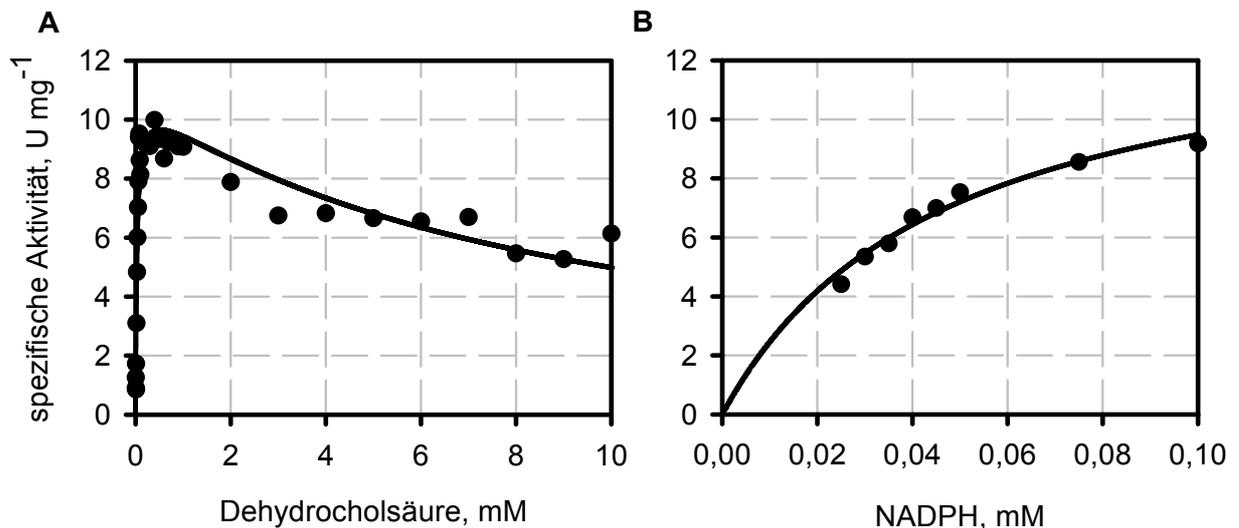


Abbildung 5.13: Abhängigkeit der spezifischen Aktivitäten der 7 β -HSDH von der Dehydrocholsäurekonzentration bei konstanten 100 μ M NADPH (A), sowie von der NADPH-Konzentration bei konstanten 300 μ M Dehydrocholsäure (B). Gezeigt sind die Messpunkte (\bullet), sowie das Ergebnis der nicht-linearen Regression basierend auf einer Michaelis-Menten-Kinetik mit (A) und ohne (B) Substratüberschusshemmung als durchgezogene Linie.

Während bei der Auftragung der spezifischen Enzymaktivität bei variablen NADPH-Konzentrationen und bei konstanter Substratkonzentration eine typische Michaelis-Menten-Kinetik in Abbildung 5.13 B zu sehen ist, ist dies bei der Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von verschiedenen Dehydrocholsäurekonzentrationen in Abbildung 5.13 A nicht zu erkennen. Die Ergebnisse gehorchen eher einer Michaelis-Menten-Kinetik mit Substrathemmung, wie sie in Gleichung 5.2 aufgeführt ist (Bisswanger, 2002):

$$v = v_{max} \cdot \frac{[S]}{K_m + \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right) \cdot [S]} \quad 5.2$$

mit: K_i : Inhibitionskonstante, mol L⁻¹

Daher wurde für die Analyse der Auftragungen spezifischer Aktivitäten bei variablen Kofaktorkonzentrationen und konstanten Substratkonzentration das klassische Michaelis-Menten-Modell aus Gleichung 3.3 angewendet, bei der Untersuchung variabler Substratkonzentrationen bei konstanter Kofaktorkonzentration hingegen das Modell mit Substratinhibierung aus Gleichung 5.2. Die mittels nicht-linearer Regression identifizierten kinetischen Parameter sind in Tabelle 5.5 aufgelistet. Des Weiteren werden in Abbildung 5.14 die Kinetiken der 7β-HSDH WT und der beiden Mutanten verglichen.

Tabelle 5.5: Kinetische Parameter der 7β-HSDH und deren Enzymvarianten G39A und G39S

	K_m (DHCS), μM	K_i (DHCS), mM	K_m (NADPH), μM	v_{max} , U mg ⁻¹
7β-HSDH WT	31 ± 5	8,6 ± 1,5	46 ± 7	15,8 ± 1,1
7β-HSDH G39A	33 ± 6	17 ± 4	16,4 ± 1,9	22,7 ± 1,2
7β-HSDH G39S	75 ± 9	80 ± 50	13,1 ± 2,9	22,4 ± 1,1

Die kinetischen Parameter in Tabelle 5.5, sowie die Kinetiken in Abbildung 5.14 verdeutlichen eine Substratinhibierung der 7β-HSDH durch das Substrat Dehydrocholsäure. Diese fällt für den Wildtyp am stärksten aus, gekennzeichnet durch den geringsten K_i . Die schwächste Inhibierung zeigt die Mutante G39S, wobei der hohe K_i , sowie dessen großer Fehler mit 80 ± 50 mM offen lassen, ob überhaupt noch von einer Substrathemmung ausgegangen werden kann. Der K_m für Dehydrocholsäure liegt bei den untersuchten Enzymen im Bereich von 30 – 80 μM, wobei kein Unterschied bei den Halbsättigungskonzentrationen vom Wildtyp und der Mutante G39A zu finden ist. Die Mutante G39S hingegen weist mit 75 ± 9 μM einen in etwa verdoppelten Wert auf. Die Halbsättigungskonzentration für NADPH liegt für den Wildtyp bei 46 ± 7 μM, wohingegen diese bei den Enzymvarianten deutlich niedriger mit 16,4 ± 1,9 μM für G38A und 13,1 ± 2,9 μM für G39S ermittelt wurden. Des Weiteren sind die maximalen Geschwindigkeiten v_{max} der beiden Enzymmutanten um etwa das 1,5-fache gegenüber dem Wildtyp erhöht. Diese Werte können jedoch bei einer Substratüberschusshemmung laut Gleichung 5.2 nicht erreicht werden und stellen damit theoretische Werte dar.

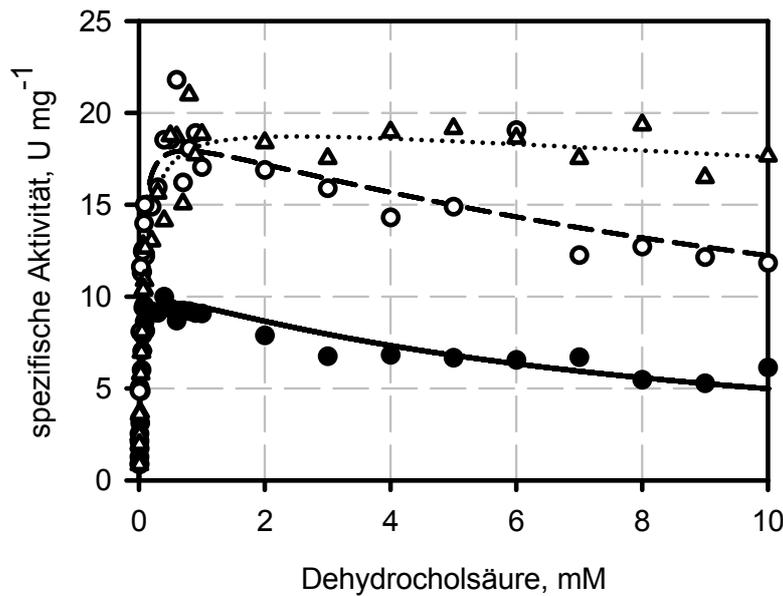


Abbildung 5.14: Vergleich der Kinetiken der 7β -HSDH-Varianten. Gezeigt sind die experimentellen Messreihen des Wildtyps (\bullet), sowie der Mutante G39A (\circ) und G39S (Δ) bei einer konstanten NADPH-Konzentration von 0,1 mM und variablen Dehydrocholsäure-Konzentrationen. Das Ergebnis der nicht-linearen Regression basierend auf Gleichung 5.2 wird durch die Linie dargestellt (durchgezogen: Wildtyp, gestrichelt: G39A, gepunktet: G39S).

Die maximal erreichbaren spezifischen Aktivitäten v_{opt} lassen sich durch das Maximum der entsprechenden Kinetiken ermitteln. Diese betragen für den Wildtyp $14,0 \text{ U mg}^{-1}$, für die Mutanten G39A und G39S $20,8 \text{ U mg}^{-1}$ beziehungsweise $21,2 \text{ U mg}^{-1}$. Für ein Satzverfahren sind jedoch die spezifischen Aktivitäten von Bedeutung, die bei höheren Dehydrocholsäure-Konzentrationen erreicht werden können, da eine ökonomische Prozessführung hohen Substrateinsatz verlangt. Durch Anwendung der Gleichung 5.2 und der kinetischen Parameter aus Tabelle 5.5 können die Aktivitäten bei exemplarischen 10 mM Dehydrocholsäure errechnet werden. Die Ergebnisse von v_{max} , der erreichbaren Geschwindigkeit v_{opt} und der Geschwindigkeit bei 10 mM Dehydrocholsäure $v_{10\text{mM DHCS}}$ werden in Abbildung 5.15 verglichen. Dabei zeigt der Wildtyp bei 10 mM Dehydrocholsäure eine spezifische Aktivität von $\sim 7,3 \text{ U mg}^{-1}$, die Mutante G38A von $\sim 14 \text{ U mg}^{-1}$ und die Mutante G39A bei 20 U mg^{-1} . Damit erreicht letztgenannte Mutante eine nahezu dreifache Geschwindigkeit gegenüber dem Wildtyp unter diesen Bedingungen.

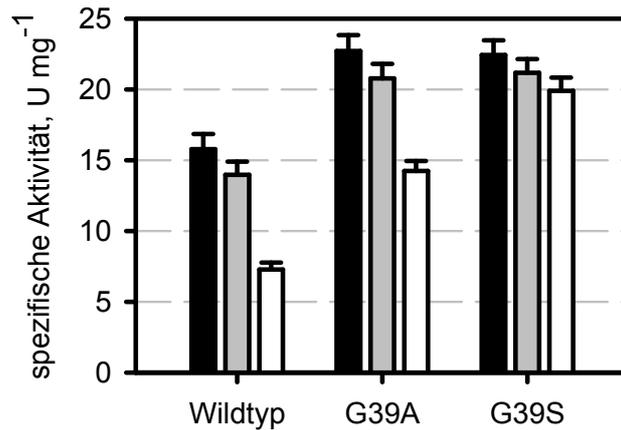


Abbildung 5.15: Vergleich der maximalen Geschwindigkeit v_{max} (■), der maximal erreichbaren Geschwindigkeit v_{opt} (▒) und der Geschwindigkeit bei 10 mM Dehydrocholsäure $v_{10mM\ DHCS}$ (□), bei der Annahme einer unendlichen NADPH-Konzentration.

5.5 Diskussion

Mit Hilfe der gerichteten Evolution konnten verschiedene Mutanten erzeugt werden, die höhere Aktivitäten in Anwesenheit von Produkt gegenüber dem Wildtypenzym der 12 α -HSDH aufwiesen. Die aussichtsreichste Mutante Q98H aus der ersten Mutageneserunde zeigte eine Aminosäuresubstitution, die sowohl nahe der Kofaktor-, als auch Substratbindetasche situiert ist. Daher sind Einwirkungen auf beide Bindetaschen denkbar. Dies könnte auch den Aktivitätsverlust bedingen, welcher gegenüber dem Wildtyp festgestellt wurde. Da jedoch kein Röntgenstrukturmodell, sondern nur ein Homologiemodell des Enzyms existiert, kann der Effekt nicht genauer beurteilt werden. Die Position wurde in einer Sättigungsmutagenese weiter untersucht, wobei eine benachbarte Position (Ser100) mit einbezogen wurde. Auf diese Weise konnte eine Mutante erzeugt werden, welche 60 % Restaktivität bei einem Umsatz von 25 % aufweist, jedoch einen weiteren Verlust an spezifischer Aktivität zeigte. Dies deutet darauf hin, dass die beiden identifizierten Positionen einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms als auch die Restaktivität in Anwesenheit von Produkt haben. Die ausgewählten Mutanten Q98H und Q98A zeigten im Prozess jedoch keinen Vorteil gegenüber dem Wildtyp. Dies kann womöglich auf eine verringerte Stabilität der Enzymvarianten, beruhend auf den eingeführten Mutationen, zurückzuführen sein. Andererseits ist es denkbar, dass die Ergebnisse aus der Enzymcharakterisierung auf Grund der Komplexität des Gesamtprozesses nicht einfach übertragbar sind.

Zur Änderung der Kofaktorspezifität wurden basierend auf Sequenzalignments und Literaturdaten (Persson *et al.*, 2003) verschiedene Mutanten erstellt. Die Enzymvariante G38D R39L zeigte bei einer Arbeitskonzentration von 0,25 mM eine 5-fach höhere Aktivität gegenüber

dem Wildtypenzym. Bei hohen NAD^+ -Konzentrationen steigerte sich die Aktivität erheblich. Es ist daher davon auszugehen, dass die Mutante G38D R39L eine hohe maximale Geschwindigkeit v_{max} aufweist. Hierfür sind jedoch sehr hohe Konzentrationen NAD^+ notwendig, so dass von einem, für Prozesszwecke ungünstig hohen K_m für NAD^+ ausgegangen werden kann, obwohl für die 7α -HSDH aus *E. coli* gezeigt werden konnte, dass die Seitenkette des Aspartat an Position 42 Wasserstoffbrücken zum O2'A und O3'A des Adenosinribose-Teils von NADH ausbildet (Tanaka *et al.*, 1996). Damit kann die Kofaktorspezifität nicht ausschließlich von den beiden Positionen 38 und 39 abhängen. Auch analoge Mutationen in den Arbeiten von Hölsch *et al.* (2009) und Leblanc *et al.* (1998) konnten keinen Wechsel der Kofaktorspezifität bewirken. Die Mutante G38D R39L weist offensichtlich einen hohen v_{max} auf, welcher sich nach Abschätzung sogar oberhalb der Aktivität des Wildtyps mit NADP^+ bewegt. Allerdings bewirkt ein vermutlich sehr hoher K_m , dass die Mutante unter Prozessbedingungen nicht einsatzfähig ist, da die Kosten für NAD^+ zu hoch wären.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Position 38 auch für die Aktivität mit NADP^+ von Bedeutung ist. Die Enzymvarianten G38A und G39S weisen in etwa das 4-fach beziehungsweise 8-fache des v_{max} des Wildtyps auf. Die Daten in Tabelle 5.4 lassen einen denkbaren Rückschluss auf die Korrelation von v_{max} und K_m (NADP^+) zu. Charlier & Plapp (2000) vermuteten den geschwindigkeitslimitierenden Schritt bei einer mittelkettigen Dehydrogenase / Reduktase in der Dissoziation des Kofaktors. Für eine Short Chain Dehydrogenase / Reduktase wurde vergleichbares publiziert (Cooper *et al.*, 2007). Wenn dies auch auf für die 12α -HSDH angewendet werden kann, könnte eine schnellere Kofaktor-Dissoziation und Abnahme der Bindungsaffinität dazu führen, dass die spezifische Enzymaktivität zunimmt. Hinweise darauf geben die Lage der Mutagenese position und die Erhöhung von K_m (NADP^+) beider Mutanten.

Die Aminosäuresubstitutionen an der analogen Position der 7β -HSDH führten zu einer Minderung der gefundenen Substratinhibierung. Eine Substratinhibierung erfolgt laut Bisswanger (2002) durch die Bindung eines weiteren Substratmoleküls an den binären Enzym-Substrat-Komplex, wodurch eine Hemmung erfolgt. Übertragen auf die 7β -HSDH könnte die Inhibierung durch die Bindung eines Dehydrocholsäure-Moleküls an den ternären Enzym-Komplex bedingt sein. Inhibitionen durch das Substrat werden auch für andere Short Chain Dehydrogenasen / Reduktasen beschrieben, wie beispielsweise für eine Pteridinreduktase 1 aus *Leishmania major* (Nare *et al.*, 1997), einer Salutaridinreduktase aus *Papaver breccatum* (Ziegler *et al.*, 2009) und der humanen 17β -HSDH (Gangloff *et al.*, 2001).

Als Ursache wurde für die Inhibition der Salutaridinreduktase aus *Papaver breccatum* wird eine modifizierte Substratbindung in der Substratbindungstasche vermutet (Ziegler *et al.*, 2009). Gangloff *et al.* (2001) postulierten hingegen die Bildung eines abortiven Komplex aus der

oxidierten Form des Substrats und oxidiertem Kofaktor mit dem Enzym. Dieser entsteht, nachdem das Substrat umgesetzt wurde und das Produkt den Komplex verlässt, jedoch bevor der verbrauchte Kofaktor dissoziieren kann. In den Arbeiten von Gangloff *et al.* (2001) konnte die Substrathemmung beseitigt werden, in dem an der analogen Position ein Leucin gegen ein Aspartat ersetzt wurde, welche den substituierten Positionen der 12 α -HSDH (Position 38) und 7 β -HSDH (Position 39) entspricht.

Auch bei einer humanen Lactatdehydrogenase konnte eine Substratinhibierung vermindert werden, wobei ebenfalls ein sogenannter *Dead-End*-Komplex als Ursache vermutet wurde (Eszes *et al.*, 1996). Des Weiteren wurde in diesen Arbeiten berichtet, dass zur Bindung des reduzierten Kofaktors zum einen der Nikotinamid- als auch der Adenosindiphosphat-Anteil beitragen. Bei der Bindung des oxidierten Kofaktors hingegen spielt nur der Adenosinphosphat-Anteil eine Rolle. Übertragen auf die Ergebnisse der 7 β -HSDH-Mutanten könnte dies bedeuten, dass die eingeführten Mutationen vor allem die Adenosinbindung betreffen, weshalb NADP⁺ schneller dissoziieren würde. Ein *Dead-End*-Komplex würde dadurch weniger häufig ausgebildet werden.

Um die unterschiedlichen Auswirkungen der untersuchten Mutationen auf die 12 α -HSDH und 7 β -HSDH genauer vergleichen zu können, muss beachtet werden, dass einerseits eine Oxidations- und andererseits eine Reduktionsreaktion betrachtet wurde. Daher kann womöglich von verschiedenen Effekten auf die Oxidation und die Reduktion ausgegangen werden. Deswegen könnten weiterführende Untersuchungen, wie beispielsweise die kinetische Betrachtung der jeweiligen Rückreaktionen interessant sein, wie auch Kofaktorbindungsstudien. Auch die *in silico*-Berechnung von Bindungsenergien könnten, wie von Ziegler *et al.* (2009) durchgeführt, weitere Aufschlüsse geben. Hierzu wären Röntgenstrukturmodelle hilfreich.

Vor der Anwendung im Prozess muss untersucht werden, ob die eingeführten Mutationen zu Verringerungen der Expressionsrate oder Stabilität führen. Des Weiteren könnte der höhere K_m für NADP⁺ der 12 α -HSDH-Mutanten höhere Arbeitskonzentrationen des Kofaktor erfordern. Ob die erzeugten Mutanten für die entsprechenden biokatalytischen Prozesse von Vorteil sind, muss daher in weiteren Experimenten geklärt werden.

6 Modellgestützte Prozessoptimierung der 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Produktion mit isolierten Enzymen

Die Entwicklung eines gekoppelten biokatalytischen Prozesses mit zwei beteiligten Enzymen und zwei Substraten / Produkten erfordert aufgrund der vielen Variablen einen hohen experimentellen Aufwand. Bei der Oxidation von Cholsäure mit integrierter Kofaktorregenerierung zur Herstellung von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure existieren viele Möglichkeiten den Einfluss verschiedener Prozessparameter zu optimieren. Sollen mehrere Ziele verfolgt werden, erweitert sich dadurch der experimentelle Aufwand erheblich. Des Weiteren können ohne Modell nur auf Basis experimenteller Daten lediglich bedingt Rückschlüsse auf alternative Prozessführungen gezogen werden, wenn beispielsweise neue Prozessziele definiert werden.

Prozessmodelle können dabei helfen diesen Aufwand zu vermindern, indem sie die Möglichkeit schaffen, Experimente *in silico* durchzuführen. Dadurch reduziert sich die Anzahl der realen Experimente erheblich.

6.1 Kinetisches Modell der 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Produktion mit 12 α -HSDH und der Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200

Bei der 12 α -HSDH wurde ein geordneter *bi-bi* Mechanismus in der Literatur aufgeklärt (Braun *et al.*, 1991). Von der *Thermoanaerobium brockii* Alkoholdehydrogenase, welche eine hohe Sequenzidentität von 97 % zur verwendeten *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase aufweist, wird dieser Mechanismus ebenfalls beschrieben (Ford *et al.*, 1993). Das Schema der Gesamtreaktion ist in Abbildung 6.1 dargestellt.

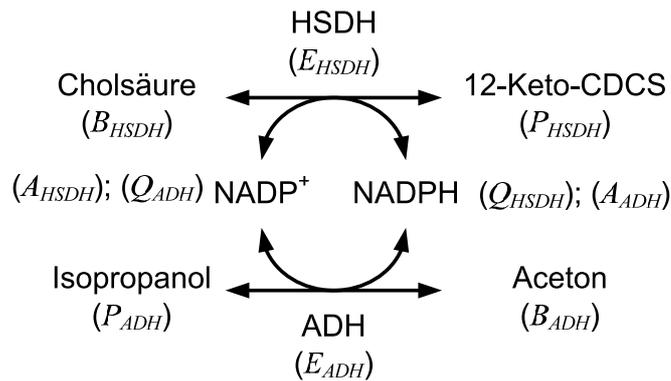


Abbildung 6.1: Reaktionsschema der biokatalytischen 12-Keto-Chenodesoxycholsäure (12-Keto-CDCS)- Synthese mit isolierten Enzymen. Die beteiligten Substanzen und Enzyme sind entsprechend Abbildung 3.20 und Gleichung 3.8 beschriftet. ADH: Alkoholdehydrogenase.

6.2 Unabhängige Parameteridentifikation

Zur Identifikation der kinetischen Parameter der 12 α -HSDH und der *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase wurde die in Abschnitt 4.10.2 beschriebene Methode verwendet und die experimentellen Daten in Form von Verlaufskurven photometrisch aufgenommen. Die kinetischen Parameter der 12 α -HSDH und der *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase wurden separat voneinander identifiziert. Dabei wurden weitestgehend die Reaktionsbedingungen, wie die im Prozess erwarteten Konzentrationsbereiche der beteiligten Substrate und Produkte, sowie der Einfluss von 100 mM Cholsäure auf die *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase, beachtet.

6.2.1 Verlaufskurvenanalyse der 12 α -HSDH

Die Verlaufskurven zur 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Produktion mit 12 α -HSDH wurden in 1 mL-Küvetten mittels photometrischer Analyse der NADPH-Konzentration aufgenommen. Die Reaktionen wurden mit aufgereinigtem Enzym bei Raumtemperatur durchgeführt und mittels Kofaktorzugabe gestartet. Es wurden acht Verläufe ermittelt, welche in Abbildung 6.2 zu sehen sind. Dabei wurde ein breiter Konzentrationsbereich betrachtet, um mögliche Inhibierungs- und Aktivierungseffekte zu berücksichtigen. Die Startwerte zur Parameteridentifikation, welche mittels Genetischen Algorithmus abgeschätzt wurden, werden in Tabelle 6.1 mit den Parametern, die mittels Simplex Algorithmus erhalten wurden, verglichen. Außerdem sind die abhängigen Parameter, welche sich aus den Gleichungen 4.7 - 4.9 errechnen, gezeigt.

Die Werte für die unabhängigen Parameter K_{mB} , K_{mP} und K_{mQ} der 12 α -HSDH liegen in derselben Größenordnung wie die publizierten Daten (Braun *et al.*, 1991). Die Geschwindigkeits-

konstanten, welche für eine Untereinheit der 12 α -HSDH angegeben sind, weisen eine höhere Geschwindigkeit für die Hinreaktion mit 8902 min⁻¹ gegenüber der Rückreaktion mit 831 min⁻¹ auf. Des Weiteren impliziert der Parametersatz aus Tabelle 6.1 eine höhere Affinität des Enzyms für das Produkt 12-Keto-Chenodesoxycholsäure gegenüber dem Substrat Cholsäure, was durch den sehr geringen K_{mP} gegenüber K_{mB} ausgedrückt wird und sich gut mit den Literaturdaten deckt. Variationen zu früher publizierten Daten können dadurch erklärt werden, dass einerseits eine andere Methode und Modellgrundlage zur Parameteridentifikation verwendet wurde. Auch wurde ein größerer Konzentrationsbereich für die Parameteridentifikation gewählt, ebenso wie andere Reaktionsbedingungen, wie beispielsweise die Pufferkonzentration.

Tabelle 6.1: Kinetische Parameter des mechanistischen Modells der 12 α -HSDH; v_1 und v_2 (maximale Wechselzahlen) in min⁻¹, alle anderen Werte in mM

12α-HSDH		
	Startwerte	Identifizierte Parameter
v_1	6969	8902
v_2	764	831
K_{mB}	0,049	0,039
K_{mP}	0,007	0,0008
K_{mQ}	0,074	0,07
K_{iA}	0,069	0,068
K_{iP}	0,957	1,377
K_{iQ}	0,11	0,071
Abhängige Parameter		
K_{mA}	0,273	0,079
K_{iB}	98,48	610,59
K_g	0,22	0,232

Betrachtet man die abhängigen Parameter, so fällt auf, dass sich der K_m für NADP⁺ (K_{mA}) mit 79 μ M in derselben Größenordnung bewegt, wie der unabhängige K_m für NADPH (K_{mQ}). Dies ist bemerkenswert, da K_{mA} auf der Grundlage von sieben unabhängigen Parametern errechnet wird. Des Weiteren zeigt die abhängige Gleichgewichtskonstante K_g , welche aus sechs abhängigen Parametern ermittelt wird, eine thermodynamische Präferenz für die NADP⁺ Reaktionsseite an.

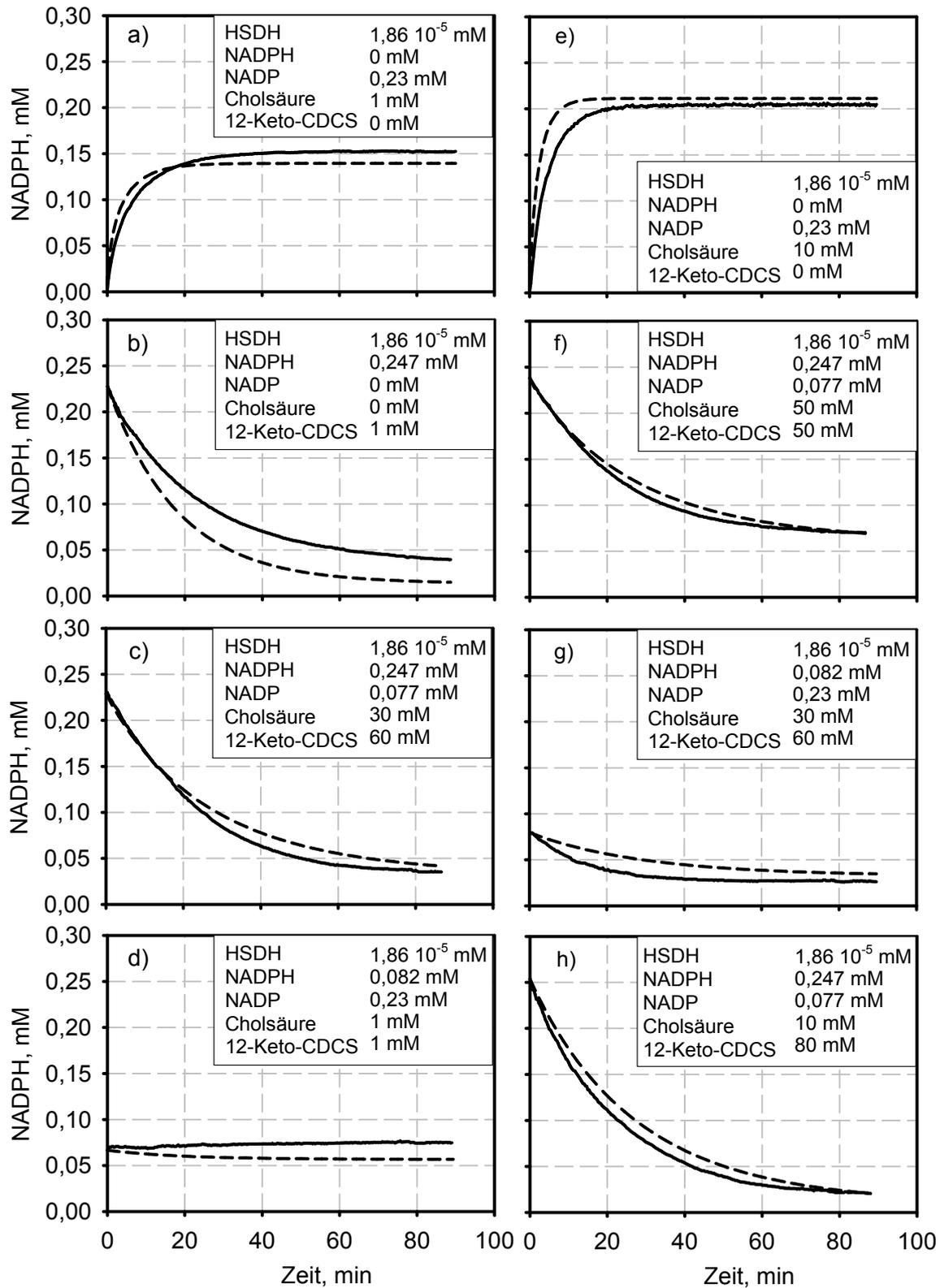


Abbildung 6.2: Zeitverläufe der Cholsäure- / 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Umsetzung (12-Keto-CDCS) mit 12 α -HSDH im Satzverfahren. Die experimentellen Daten zur Parameteridentifikation (durchgezogene Linie) werden mit den simulierten Daten des mechanistischen Modells (gestrichelte Linie) verglichen. Die Ausgangskonzentrationen sind in den Legenden angegeben. Die Enzymkonzentration bezieht sich auf die Untereinheiten des Enzyms.

In Abbildung 6.2 werden die Simulationsergebnisse mit den gemessenen Zeitverläufen der NADPH-Konzentration während der Oxidation von Cholsäure durch 12 α -HSDH verglichen. Das kinetische Modell mit dem Parametersatz aus Tabelle 6.1 beschreibt die Verlaufskurven, welche zur Parameteranpassung verwendet wurden, in guter Weise. Sowohl Hin- als auch Rückreaktion können für sehr hohe Konzentrationen von Substrat und Produkt innerhalb der Versuchsreihe beschrieben werden. Dabei weist das Modell einige wichtige Eigenschaften auf:

- Berücksichtigung der Reversibilität der Reaktion
- Wiedergabe der Reaktionsgeschwindigkeit, insbesondere während der ersten 20 – 60 Minuten vor Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts
- Vorhersage der Gleichgewichtskonzentrationen am Ende der Reaktion.

Das thermodynamische Gleichgewicht (GG) hängt laut Massenwirkungsgesetz in Gleichung 6.1 von den molaren Endkonzentrationen der Reaktanten ab:

$$K_g = \frac{c(\text{NADPH})_{GG} \cdot c(\text{12-Keto-CDCS})_{GG}}{c(\text{NADP}^+)_{GG} \cdot c(\text{Cholsäure})_{GG}} \quad 6.1$$

Verwendet man die gemessenen Konzentrationen von NADPH am Ende jedes Experiments erhält man eine durchschnittliche Gleichgewichtskonstante von 0,35. Dieser Wert passt gut zur identifizierten Gleichgewichtskonstante des mechanistischen Modells, welcher für $K_g = 0,23$ abgeschätzt wurde.

6.2.2 Verlaufskurvenanalyse der Alkoholdehydrogenase von *Thermoanaerobacter ethanolicus*

Für die zeitlichen Konzentrationsverläufe von NADPH bei der Reduktion von Aceton zu Isopropanol und umgekehrt unter Verwendung der *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase wurde ebenfalls ein breiter Konzentrationsbereich der Reaktanten untersucht. Dies ist notwendig, da für eine ökonomische Umsetzung zur 12-Keto-Chenodesoxycholsäure ein Überschuss an Aceton erforderlich ist (Fossati *et al.*, 2006). Die enzymatischen Reaktionen wurden in 1 mL-Quarzküvetten durchgeführt, welche mit einem Deckel verschlossen werden konnten, um Aceton- und Isopropanol-Verdampfung zu verhindern. Des Weiteren wurden die Reaktionen in Anwesenheit von 100 mM Cholsäure angesetzt, da Cholsäure bekanntlich als Detergenz wirkt und so Prozessbedingungen nachgestellt werden sollten. Die experimentellen Daten wurden freundlicherweise von Luo Liu (Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt.

Der identifizierte Parametersatz der *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase in Tabelle 6.2 weist eine höhere Präferenz für Isopropanol gegenüber Aceton auf, wobei er eine höhere Geschwindigkeitsrate für die Reduktion von Aceton zeigt.

Tabelle 6.2: Kinetische Parameter des mechanistischen Modells der *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase ; v_1 und v_2 in min^{-1} (maximale Wechselzahlen), alle anderen Werte in mM

<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> Alkoholdehydrogenase		
	Startwerte	Identifizierte Parameter
v_1	7770	7116
v_2	1442	1052
K_{mB}	5,484	5,947
K_{mP}	0,391	0,431
K_{mQ}	0,055	0,062
K_{iA}	0,039	0,042
K_{iP}	5,266	4,356
K_{iQ}	0,138	0,16
Abhängige Parameter		
K_{mA}	0,157	0,204
K_{iB}	39,51	32,38
K_g	1,369	1,876

Die Kinetiken der *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase können durch das identifizierte kinetische Modell mit diesem Parametersatz sowohl für niedrige (0,5 - 100 mM) als auch hohe (1220 – 3940 mM) Acetonkonzentrationen beschrieben werden. Das kinetische Modell zeigt eine sehr gute Übereinstimmung zu den experimentellen Daten für sämtliche Hinreaktionen in Abbildung 6.3 a-f. Für die Rückreaktionen konnte das beobachtete thermodynamische Gleichgewicht vorhergesagt werden (g-h), jedoch verliefen die Reaktionen schneller als mit dem kinetischen Modell simuliert.

Die experimentell ermittelten Gleichgewichtskonstanten der Verläufe in Abbildung 6.3 sind sehr sensitiv in Bezug zur finalen NADPH-Konzentration. Deshalb eignen sie sich nicht zum Vergleich mit den Werten aus Tabelle 6.2, da sehr geringe NADPH-Konzentrationen in den Reaktionen von Abbildung 6.3 a-f zu finden sind. Nach King (2003) kann jedoch eine Gleichgewichtskonstante von 1,815 für gleiche Reaktionsbedingungen (25 °C, pH 8,0) errechnet werden, welcher dem kalkulierten Wert von 1,876 aus Tabelle 6.2 sehr ähnlich ist.

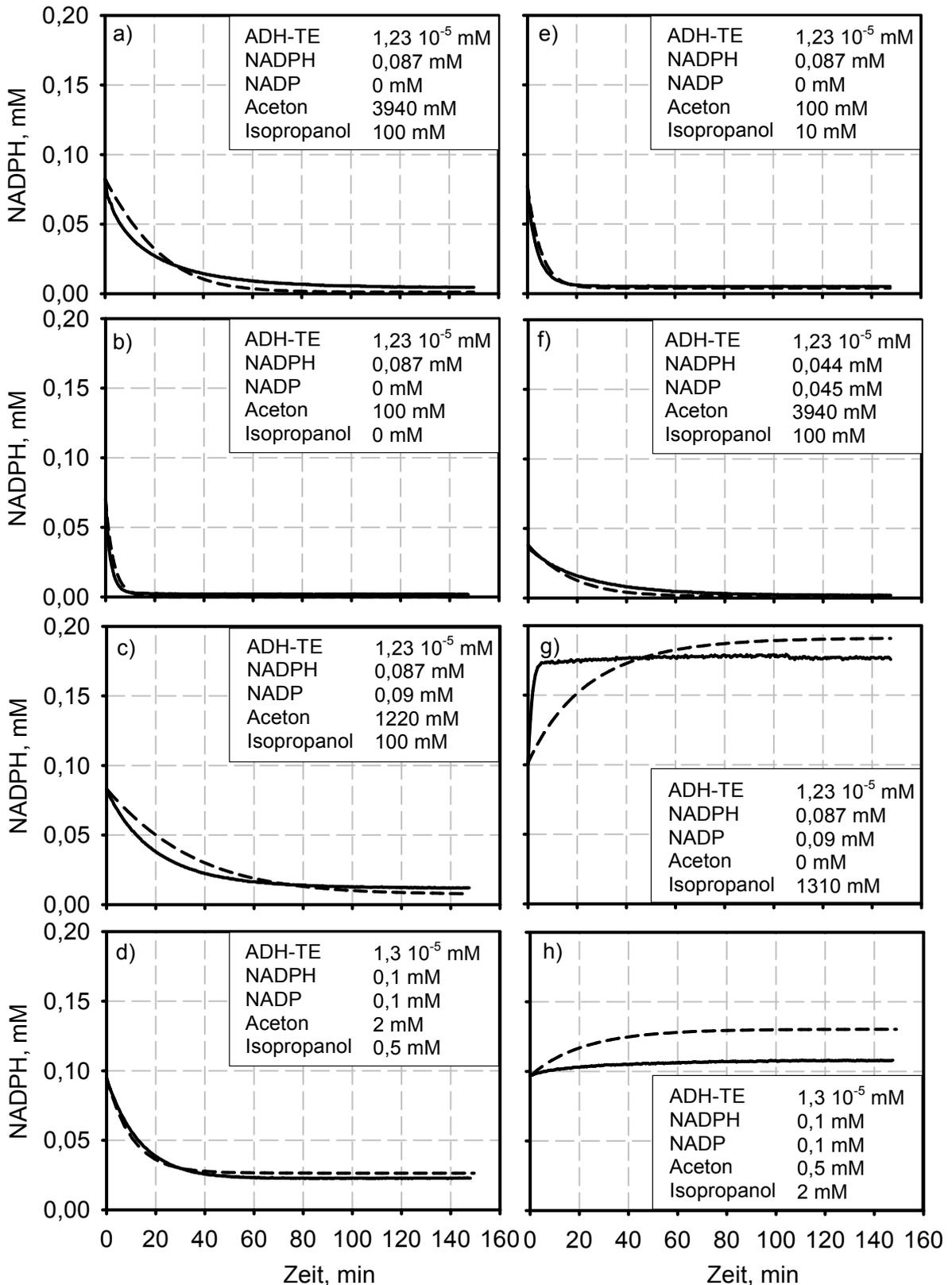


Abbildung 6.3: Zeitverläufe der Aceton- / Isopropanol-Umsetzung mit der Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* (ADH-TE) im Satzverfahren. Die experimentellen Daten zur Parameteridentifikation (durchgezogene Linie) werden mit den simulierten Daten des mechanistischen Modells (gestrichelte Linie) verglichen. Die Ausgangskonzentrationen sind in den Legenden angegeben. Die Enzymkonzentration bezieht sich auf die Untereinheiten des Enzyms.

6.3 Validierung des kinetischen Prozessmodells

Die kinetischen Modelle der 12 α -HSDH und der *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase können, wie gezeigt, die betrachteten biokatalytischen Reaktionen der einzelnen Enzyme gut beschreiben. Werden diese beiden unabhängig voneinander identifizierten Modelle mit den Stoffbilanzen der einfachen Satzverfahrens im idealen Rührkesselreaktor gekoppelt, ist es möglich, den biokatalytischen Prozess der Cholsäureoxidation mit der 12 α -HSDH und integrierter Kofaktorregeneration zu simulieren.

Die Oxidation von Cholsäure erfolgte in einem Volumen von 20 mL bei 24 °C und 250 rpm in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0). Die Reaktionszeit betrug 48 h. In diesem Zeitraum zeigten experimentelle Daten eine hohe Stabilität der eingesetzten Enzyme in Anwesenheit von bis zu 1,36 M Aceton (Daten nicht gezeigt).

Das gekoppelte enzymkinetische Modell beschreibt in Abbildung 6.4 die biokatalytischen Reaktionsverläufe mit integrierter Kofaktorregeneration in den parallelbetriebenen Satzprozessen in angemessener Weise. Die Gleichgewichtskonzentrationen werden durch das kombinierte Modell überwiegend gut vorhergesagt. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten sind jedoch meist höher als mit dem kinetischen Modell simuliert. Für die Unterschiede könnte die verschiedene Durchmischung bei der Verlaufskurvenanalyse zur Parameteridentifikation und bei den Satzverfahren zur präparativen 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Produktion mit integrierter Kofaktorregenerierung ursächlich sein.

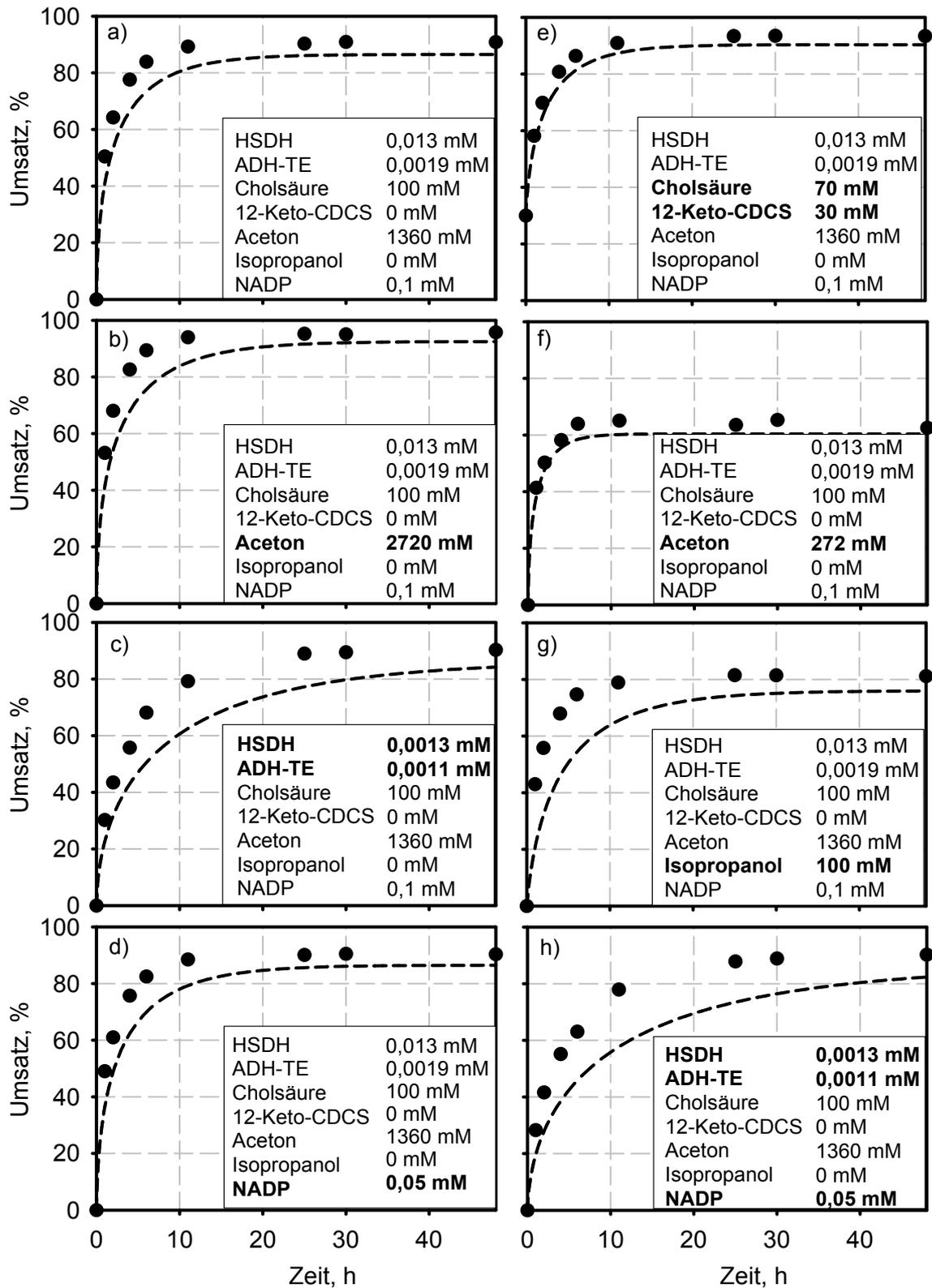


Abbildung 6.4: Umsatz von Cholsäure im Satzverfahren mit 12 α -HSDH bei gleichzeitiger Reduktion von Aceton mittels *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase (ADH-TE) zur NADP⁺-Regeneration. Gezeigt sind die experimentellen Daten (●) sowie die Simulationsdaten basierend auf den unabhängig identifizierten kinetischen Modellen (gestrichelte Linie). 12-Keto-CDCS: 12-Keto-Chenodesoxycholsäure.

6.4 Biokatalytische Prozessmodellierung nach erneuter Parameteridentifikation

Aus diesem Grund wurde zur Analyse und zur Verbesserung des kinetischen Modells die bereits gemessenen Prozessdaten (siehe Abbildung 6.4) zusätzlich verwendet, um die kinetischen Modellparameter ein weiteres Mal zu identifizieren. Diese sind in Tabelle 6.3 zusammengestellt. Auffällige Unterschiede zu den vorher identifizierten Parametern wurden bei den Geschwindigkeitskonstanten und K_{iA} der 12 α -HSDH beobachtet, welche sich wiederum auf die abhängige Gleichgewichtskonstante K_g auswirkt. Diese Verschiebungen lassen sich auf den veränderten Reaktor zurückführen, da jetzt ein gerührtes System im Prozess zum Einsatz kam und die Verlaufskurvenanalyse zuvor in einer ungerührten Küvette durchgeführt wurde.

Tabelle 6.3: Kinetische Parameter des kinetischen Prozessmodells; v_1 und v_2 in min^{-1} (maximale Wechselzahlen), alle anderen Werte in mM; ADH-TE: *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase

HSDH			ADH-TE		
Parameter-	Neu identifizierte		Parameter-	Neu identifizierte	
satz aus	Parameter		satz aus	Parameter	
Tabelle 6.1			Tabelle 6.2		
v_1	8902	12984	v_1	7116	7778
v_2	831	504	v_2	1052	1112
K_{mB}	0,039	0,02	K_{mB}	5,947	6,263
K_{mP}	0,0008	0,001	K_{mP}	0,431	0,389
K_{mQ}	0,07	0,088	K_{mQ}	0,062	0,0706
K_{iA}	0,068	0,215	K_{iA}	0,042	0,0415
K_{iP}	1,377	1,171	K_{iP}	4,356	4,698
K_{iQ}	0,071	0,087	K_{iQ}	0,16	0,153
Abhängige Parameter					
K_{mA}	0,079	0,158	K_{mA}	0,204	0,191
K_{iB}	610,59	809,2	K_{iB}	32,38	53,28
K_g	0,232	0,534	K_g	1,876	1,601

Abbildung 6.5 gibt den gemessenen Umsatz von Cholsäure und die simulierten Reaktionsverläufe wieder. Die Simulationsdaten, welche auf dem neu identifizierten Parametersatz beruhen, sind als durchgezogene Linie dargestellt.

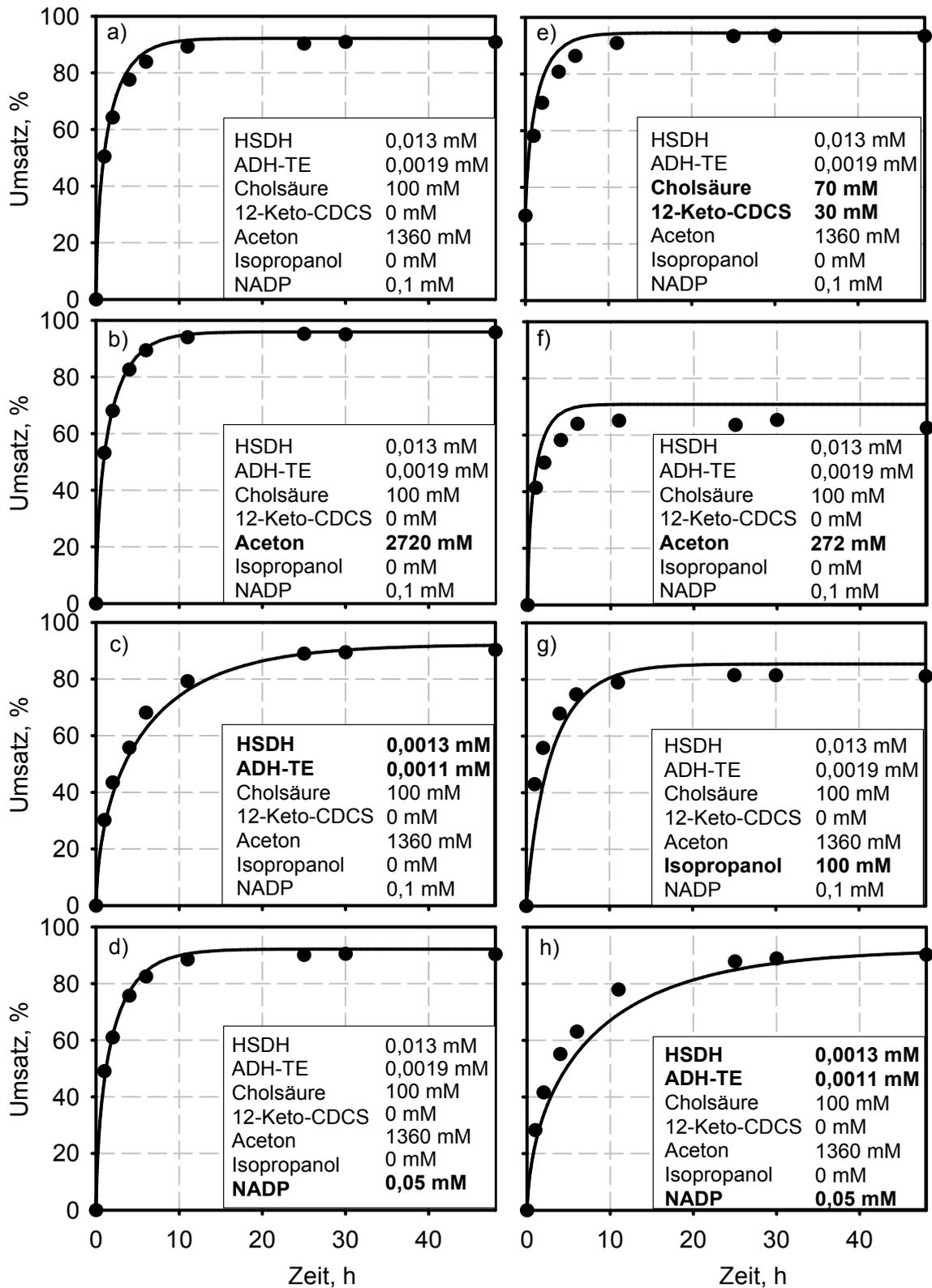


Abbildung 6.5: Umsatz von Cholsäure im Satzverfahren mit 12 α -HSDH bei gleichzeitiger Reduktion von Aceton mittels *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase (ADH-TE) zur NADP⁺-Regeneration. Gezeigt sind die experimentellen Daten (●) sowie die Simulationsdaten basierend auf dem neu identifizierten kinetischen Modell (durchgezogene Linie). 12-Keto-CDCS: 12-Keto-Chenodesoxycholsäure.

Das kinetische Prozessmodell ist in der Lage die Prozessverläufe akkurat zu beschreiben, wobei die Startkonzentrationen von Cholsäure, 12-Keto-Chenodesoxycholsäure, Aceton, Isopropanol, NADP^+ und der beteiligten Enzyme $12\alpha\text{-HSDH}$ und *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase verändert wurden. Der Verlauf in Abbildung 6.4 a) und Abbildung 6.5 a) soll als Referenz dienen, da er abgeändert auf den Arbeiten von Fossati *et al.* (2006) beruht. Die Variationen zur Referenz sind in den Legenden der anderen Prozessverläufe fett markiert. Der untersuchte Bereich kann beispielsweise im Falle der Acetonkonzentration von 2 % (v/v) (Abbildung 6.5 f) bis zu 20 % (v/v) (Abbildung 6.5 b) abgedeckt werden. Mit dem kinetischen Modell ist es möglich, nahezu alle Gleichgewichtszustände in Abhängigkeit der eingesetzten Acetonkonzentrationen gut zu berechnen.

Des Weiteren kann eine Startkonzentration von 30 mM 12-Keto-Chenodesoxycholsäure vom Modell berücksichtigt werden, wie in Abbildung 6.5 e) zu erkennen ist. Bei Verringerung der Enzymkonzentrationen (Abbildung 6.5 c) und f)) beschreibt das Modell unter Verwendung des neuen Parametersatzes die verringerte Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber der Referenz. Auch eine verringerte Kofaktorkonzentration kann berücksichtigt werden. Die Verminderung der NADP^+ -Konzentration gegenüber der Referenz bewirkt eine verlangsamte Reaktionsgeschwindigkeit, führt jedoch zum gleichen Gesamtumsatz nach 48 h (Abbildung 6.5 d, h).

Das Modell ist ebenfalls in der Lage, den deutlichen Einfluss von Isopropanol zu simulieren, wie in Abbildung 6.5 g) zu erkennen ist. Bereits 100 mM Isopropanol verringern den Umsatz bei Einsatz von 1,36 M Aceton deutlich, so dass durch das entstehende Isopropanol und das thermodynamische Gleichgewicht keine vollständigen Umsätze erzielt werden können.

Zur Analyse, welche Umsätze im Satzverfahren zur Oxidation von Cholsäure erreichbar sind, zeigt Abbildung 6.6 die Simulationsergebnisse unter Verwendung des kinetischen Prozessmodells. Die Prozesszeit wurde auf 96 h festgelegt, um die Gesamtreaktion ins Gleichgewicht zu bringen. Es ist zu erkennen, dass 90 % Umsatz von 100 mM Cholsäure bei Einsatz von 1 M Aceton erreicht werden kann. Um höhere Umsätze zu erhalten müssen deutlich höhere Acetonkonzentrationen zugegeben werden. Während mit 2 M Aceton 94,5 % Umsatz simuliert werden, sind für 98 % Umsatz bereits 5,7 M Aceton und für 99 % Umsatz 11,5 M Aceton notwendig. Diese hohen Acetonkonzentrationen können jedoch in realen Experimenten auf Grund deren denaturierenden Eigenschaften nicht eingesetzt werden, so dass die Ergebnisse in Abbildung 6.6 offenlegen, dass keine vollständigen Umsätze von 100 mM Cholsäure erzielt werden können.

Aus diesen Grund zeigt Abbildung 6.6, welche Umsätze verschiedener Cholsäurekonzentrationen mit 1,36 M (B) und 2,72 M (C) Aceton erreicht werden können. 50 mM Cholsäure kann beispielsweise zu 95,9 % mit 1,36 mM Aceton und zu 97,9 % mit 2,72 M Aceton umgesetzt werden. Um höhere Umsätze zu erhalten, müsste die Ausgangs-

konzentration von Cholsäure weiter reduziert werden. Auch hier wird deutlich, dass hohe Cholsäurekonzentrationen bei Acetonkonzentrationen, wie sie in den Arbeiten von Fossati *et al.* (2006) eingesetzt wurden, nicht vollständig umgesetzt werden können.

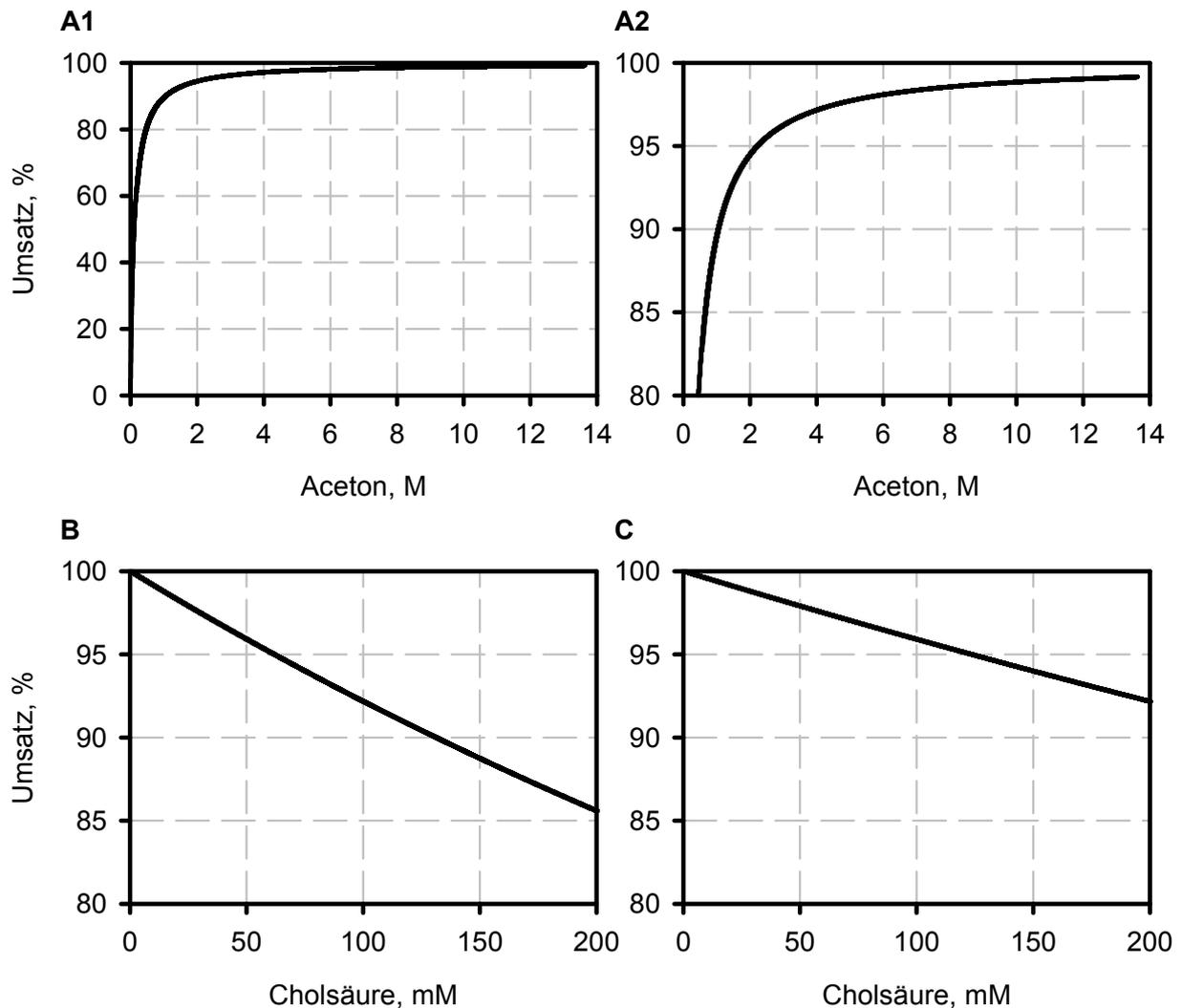


Abbildung 6.6: Simulierte Umsätze des kinetischen Prozessmodells für das Satzfahren zur Oxidation von Cholsäure nach 96 h. Gezeigt sind die simulierten Umsätze von 100 mM Cholsäure in Abhängigkeit der Acetonkonzentration von 0 – 100 % Umsatz (A1) und der Ausschnitt 80 – 100 % Umsatz (A2), sowie die simulierten Umsätze in Abhängigkeit der Cholsäurekonzentration mit 1,36 M (B) und 2,72 M (C) Aceton, jeweils mit 0,013 mM HSDH, 0,0019 mM *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase (jeweils bezogen auf die Untereinheiten des Enzyms) und 0,1 mM NADP⁺.

6.5 Prozessoptimierung

Eine Prozessoptimierung hat häufig ökonomische Ziele. Wird zum Beispiel die Prozesszeit festgesetzt, sind Reaktionsbedingungen gesucht, die bei minimalen Produktionskosten zu einem maximalen Umsatz mit hohen Produktkonzentrationen führen. Bei biokatalytischen

Prozessen verursachen üblicherweise die Enzyme und Kofaktoren hohe Kosten und spielen daher eine beträchtliche ökonomische Rolle. Daher stellt das Auffinden von minimalen Enzym- und Kofaktorkonzentrationen für den Maximalumsatz in einer festgelegten Zeit ein wichtiges Ziel in einem Satzverfahren dar.

Abbildung 6.7 zeigt die Simulationsergebnisse der Umsetzung im Satzverfahren von 100 mM Cholsäure als Funktion der Enzymkonzentration nach 48 h Prozesszeit bei zwei Kofaktorkonzentrationen (0,1 mM (A) und 0,05 mM NADP⁺(B)) und 10 % Aceton.

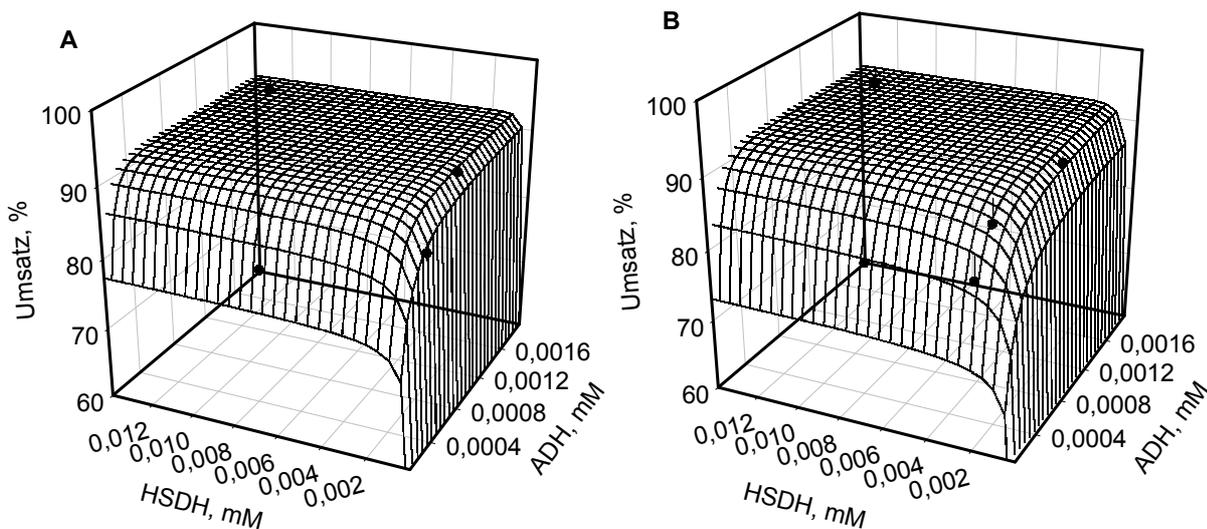


Abbildung 6.7: Biokatalytische Umsetzung von 100 mM Cholsäure im Satzverfahren in Abhängigkeit der eingesetzten Enzyme nach 48 h Prozesszeit bei zwei Kofaktorkonzentrationen 0,1 mM (A) und 0,05 mM (B). Die experimentellen Daten (●) werden mit den Simulationsdaten verglichen.

Es wurden Enzymkonzentrationen im Bereich zwischen 0,1 – 15 μ M für die 12 α -HSDH und 0,1 – 2 μ M für die *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase untersucht. Die experimentellen Daten werden als Punkte gezeigt und repräsentieren die Ergebnisse aus Abbildung 6.5 und weiterer Validierungsexperimente, welche nicht zur Modellparameteridentifikation verwendet wurden. Dabei wurden ebenfalls Reaktionsansätze mit geringeren Enzymkonzentrationen gegenüber Abbildung 6.5 betrachtet.

Das kinetische Prozessmodell sagt die Validierungsdaten angemessen voraus. Abweichungen, welche durch die Vertikalen dargestellt sind, können daher rühren, dass bereits geringe experimentelle Schwankungen in diesem sensitiven Enzymkonzentrationsbereich besonders deutliche Auswirkungen aufweisen.

Die Ergebnisse, welche in Abbildung 6.7 aufgeführt sind, können zur Minimierung der Enzymkosten eingesetzt werden. Unter Verwendung von 0,1 mM NADP⁺ kann beispielsweise die *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase-Konzentrationen auf 0,4 – 0,6 μ M

und die 12 α -HSDH-Konzentration auf 3 – 4 μ M, jeweils bezogen auf eine Untereinheit des Multimers, reduziert werden, um dennoch den maximal möglichen Umsatz innerhalb von 48 h zu erhalten.

Beim Einsatz von 0,05 mM NADP⁺ kann die Konzentration der *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase auf 0,6 – 0,8 μ M und für die 12 α -HSDH auf 4 – 6 μ M vermindert werden. Eine weitere Reduzierung würde zu geringeren Umsätzen innerhalb von 48 h Prozesszeit führen.

Es ist zu erkennen, dass die minimale Enzymkonzentration zum Erreichen eines maximalen Umsatzes mit Hilfe des Prozessmodells abgeschätzt werden kann. Wie in Abbildung 6.7 zu sehen, kann in einem gewissen Bereich die Verringerung eines Enzyms durch die Erhöhung des anderen ausgeglichen werden. Daher bietet das Modell bei Kenntnis individueller Herstellungspreise und / oder Halbwertszeiten der Enzyme im technischen Prozess das Potential, eine kostenoptimierte Enzymkonzentration zu berechnen.

6.6 Diskussion

Das enzymkinetische, mechanistische Prozessmodell berücksichtigt alle Mikroreaktionsschritte für die zugrundeliegenden geordneten *bi-bi* Mechanismen. Für jedes der beiden Enzyme konnten die kinetischen Modellparameter unabhängig voneinander mittels Verlaufskurvenanalyse bestimmt und die kinetischen Modelle anschließend kombiniert werden, um das Satzverfahren zur 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Produktion mit integrierter Kofaktorregeneration zu simulieren. Das identifizierte Modell stellt ein effizientes Werkzeug dar, um Prozesse *in silico* zu planen. Durch die Anwendung dieses mechanistischen, enzymkinetischen Modells wird es möglich, die Auswirkungen einer Vielzahl von Einflussfaktoren in einem großen Suchraum zu analysieren. Beispiele für Zielfunktionen sind Kosten, Ausbeute und Prozesszeit, jeweils in Abhängigkeit der Konzentrationen von Substrat- und Kosubstratkonzentration, sowie eingesetzter Enzymmengen.

Die meisten Satzexperimente, welche für die Validierung der Simulationsergebnisse durchgeführt wurden, wiesen eine gute Übereinstimmung zwischen Simulation- und Experimentaldaten auf. Teilweise konnte das vorhergesagte Gleichgewicht nicht exakt vorhergesagt werden oder die gemessene Anfangsreaktionsgeschwindigkeit war höher als mit Hilfe des Modells vorhergesagt. Die schlechte Homogenisierung in den einfachen Satzexperimenten in Küvetten bei den Experimenten zur Parameteridentifikation führte zur Unterschätzung der im Rührkessel gemessenen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten und damit auch zu Abweichungen bei der Schätzung des thermodynamischen Gleichgewichts. Daher wurden die Messdaten der

Validierungsexperimente im Rührkesselreaktor genutzt, um die Modellparameter erneut zu identifizieren.

Es ist nützlich, die mechanistischen Modelle für Enzyme in Multienzymsystemen zunächst separat voneinander zu identifizieren. Diese Vorgehensweise erlaubt es, wichtige, prozessrelevante Kinetikinformationen der beteiligten Enzyme, wie beispielsweise v_1 , v_2 , K_m und Inhibierungskonstanten zu erhalten. Dieses Wissen unterstützt zum Beispiel die Suche nach alternativen Enzymen. Außerdem erlauben die Identifikation von separaten mechanistischen Modellen und die anschließende Kombination, dass jedes der beiden Enzyme in Form eines modularen Konzepts gegen andere Enzyme ausgetauscht werden können. In diesem Fall muss für die Anwendung eines anderen oder verbesserten Enzyms bei Kenntnis des zugrundeliegenden Mechanismus nur ein Datensatz neuer Verlaufskurven aufgenommen und ein Parametersatz identifiziert werden. Im betrachteten Fall könnten beispielsweise andere Acetonabhängige Alkoholdehydrogenasen untersucht werden, welche für die biokatalytische Synthese von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure geeignet sind. Prozesssimulationen mit den neuen Parametersätzen können dann als Entscheidungsgrundlage genutzt werden, welche Alkoholdehydrogenase für den Prozess am günstigsten ist. Des Weiteren ist es vorstellbar, die Parameter der in Kapitel 5 erzeugten 12 α -HSDH-Enzymvarianten zu ermitteln und deren Einsatz im Prozess *in silico* zu simulieren.

Ein andere Anwendung des mechanistischen Modells zur Cholsäureoxidation mit integrierter Kofaktorregenerierung könnten *in silico* Studien von alternativen Prozessstrategien darstellen. Beispiele hierfür könnten kontinuierliche Prozesse mit immobilisierten Enzymen und Kofaktoren oder Zulaufverfahren in Rührkesselbioreaktoren sein. Dabei kann das kinetische Prozessmodell helfen, optimale Reaktionsbedingungen, wie Verweilzeit, sowie Substrat- und Kosubstratkonzentration zu ermitteln. Es muss jedoch beachtet werden, dass Änderungen der Prozessstrategie mit verlängerten Enzymnutzungszeiten und wiederholten Verwendungen der Enzyme eine zusätzliche Identifikation von Enzyminaktivierungskinetiken erfordert. Diese könnten zur Erweiterung des erstellten Modells genutzt werden. Betrachtet man beispielsweise die denaturierende Eigenschaft von Aceton, wäre es vorstellbar, dass ein Acetonzulaufprozess für einen Prozesserfolg vorteilhaft ist, da hohe Acetonkonzentrationen zu hohen Umsätzen, aber auch zu verringerten Enzymstabilitäten führen. Anschließend kann das Modell genutzt werden um die Expositionsdauer bei hohen Acetonkonzentrationen zu verringern, indem ein optimales Zulaufprofil berechnet wird. Bei kontinuierlichen Prozessen könnten Enzymstabilitätskinetiken Hinweise geben, wie lange ein Prozess betrieben werden kann, und ob die intermittierende Zugabe von Enzym während des Prozesses von Vorteil sein könnten.

7 Steroidoxidation mittels ganzer Zellen

7.1 Stammentwicklung

7.1.1 Wahl des Organismus

Gallensalze besitzen als biologische Detergenzien wirksame antimikrobielle Eigenschaften, indem sie beispielsweise mit bakteriellen Membranlipiden interagieren und die Dissoziation von integralen Membranproteinen verursachen (Coleman *et al.*, 1980; Heuman *et al.*, 1996). Deshalb sollte zunächst ein geeigneter Organismus für Ganzzellbiotransformationen gefunden werden, der hohe Gallensalzkonzentrationen toleriert.

Bakterien lassen sich in grampositive und gramnegative Vertreter einteilen. Dabei wird in der Literatur angenommen, dass gram-negative Zellen von Natur aus höhere Toleranzen gegenüber Galle als gram-positive Zellen aufweisen, weshalb Gallensäuren häufig zur deren selektiven Anreicherung eingesetzt werden (Begley *et al.*, 2005; Bridson, 2006). Beispielsweise zeigten 31 von 47 untersuchten *Lactobacillus*-Stämmen keine Replikation in Medium mit 0,3 % Ochsen-galle, wobei das Wachstum der verbliebenden Stämme stark verzögert war (Jacobsen *et al.*, 1999). In der Literatur wird von pathogenen, grampositiven Mikroorganismen berichtet, die wie *Listeria monocytogenes* die Gallenblase besiedeln und von daher eine hohe Toleranz gegenüber Gallensäuren aufweisen müssen (Begley *et al.*, 2002; Hardy *et al.*, 2004). Diese scheiden aus Sicherheitsgründen für einen industriellen Ganzzellprozess aus.

Demzufolge wurde nach geeigneten Vertretern gramnegativer Mikroorganismen gesucht. Die Gallenblasen-besiedelnden *Salmonella typhimurium* und *Salmonella typhi* zeigten eine minimale inhibitorische Konzentration bei 18 % beziehungsweise 12 % Ochsen-galle, sowie eine minimale bakterizide Konzentration von > 60 % beziehungsweise 18 % Ochsen-galle (van Velkinburgh & Gunn, 1999). Auch von *E. coli* sind sehr hohe Resistenzen gegenüber Gallensalzen berichtet, welcher häufig aus der Gallenblase und der Galle von Menschen und Tieren isoliert werden kann (Brook, 1989; Carpenter, 1998; Flores *et al.*, 2003). Bei der Resistenz spielen das AcrAB und EmrAB *multidrug* Effluxsystem und unbekannte Effluxsysteme eine wichtige Rolle (Thanassi *et al.*, 1997). Solche Effluxsysteme für Gallensäuren könnten überdies Vorteile für einen Biotransformationsprozess bringen, wenn umgesetzte Gallensalze schnell aus dem Zellinneren transportiert werden. Des Weiteren sind für *E. coli* eine Vielzahl

molekularbiologischer Techniken bekannt, um gentechnische Modifikationen durchzuführen (Sambrook & Russell, 2001). Da verschiedene Hydroxysteroiddehydrogenasen bereits erfolgreich in *E. coli* heterolog exprimiert werden konnten, wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) für eine Gallensalttoleranzstudie eingesetzt (Yoshimoto *et al.*, 1991; Möbus & Maser, 1998; Braun, 2008; Liu *et al.*, 2011). Hierzu wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET22b(+)-12 α -*hsdh* in LB-Medium und Anwesenheit verschiedener Cholsäurekonzentrationen bei 37 °C kultiviert. Das Medium wurde zuvor auf pH 7,5 eingestellt.

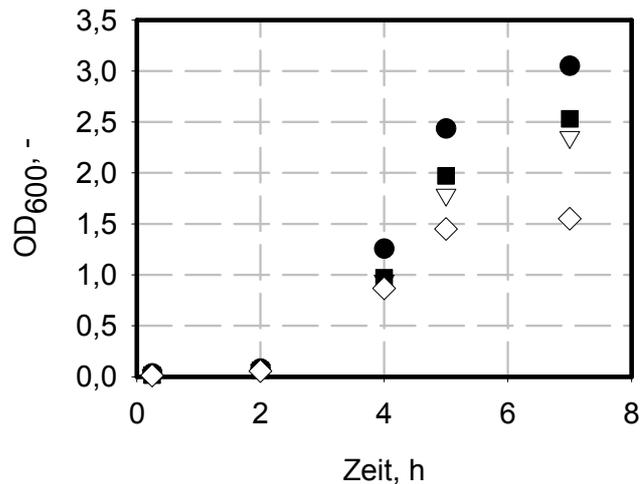


Abbildung 7.1: Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) pET22b(+)-12 α -*hsdh* in LB-Medium und Anwesenheit von Cholsäure. Aufgezeigt sind die gemessenen optischen Dichten (OD_{600}) über 7 h mit 0 mM (●), 0,5 mM (▽), 1 mM (■) und 5 mM (◇) Cholsäure.

Der untersuchte *E. coli* BL21(DE3)-Stamm zeigt in Abbildung 7.1 bei Inkubation in LB-Medium bis einschließlich 5 mM Cholsäure ein deutliches Wachstum. Steigende Cholsäurekonzentrationen führen jedoch zu einem geringeren Wachstum, wobei im Falle von 5 mM bereits eine Verlangsamung zwischen 5 und 7 h bei einer OD_{600} von 1,55 zu erkennen war. *E. coli*-Kulturen mit 25 mM Cholsäure erreichten nach 24 h eine OD_{600} von 1,96 (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass der untersuchte *E. coli* zwar ein verringertes, aber dennoch klares Wachstum in Anwesenheit der Gallensäure Cholsäure aufweist. Da für die untersuchten Ganzzellreaktionen ruhende Zellen zum Einsatz kommen sollen, war die Verminderung der Wachstumsrate durch Cholsäure nicht entscheidend.

7.1.2 Beseitigung von Nebenprodukten mittels genetischer Modifikation

Als Darmbewohner ist *E. coli* in der natürlichen Umgebung Gallensalzen ausgesetzt. Es konnte daher bereits eine NADH-abhängige 7 α -HSDH in *E. coli* HB101 identifiziert, kloniert und rekombinant exprimiert werden (Macdonald *et al.*, 1973; Yoshimoto *et al.*, 1991). Eine 7 α -HSDH-Nebenaktivität im Ganzzellorganismus würde in Kombination mit einer heterolog

exprimierten 12 α -HSDH teilweise zur 7,12-Diketo-Lithocholsäure führen, welche im weiteren, chemischen Verfahren mittels Wolff-Kishner-Reduktion zur Lithocholsäure umgesetzt werden würde, welche als toxisch gilt (Bernstein *et al.*, 2005). Die Genomsequenz von *E. coli* BL21(DE3) ist aufgeklärt (Jeong *et al.*, 2009), so dass diese für eine Sequenzanalyse vorlag. Innerhalb der Sequenz wurde das Gen einer 7 α -HSDH (*hdhA*) identifiziert. Da in der metabolisierenden Zelle ein hohes NAD⁺ / NADH-Verhältnis vorherrscht, musste geklärt werden, ob Cholsäure durch *E. coli* BL21(DE3) zu 7-Keto-Desoxycholsäure umgesetzt wird. Hierzu wurden 9,2 g_{BTM} L⁻¹ Zellen von *E. coli* BL21(DE3)-T1^R als auch von *E. coli* BL21(DE3) pET22b(+)-12 α -*hsdh* im 2 mL-Maßstab mit 25 mM Cholsäure in 50 mM Kaliumphosphatpuffer bei Raumtemperatur und 250 rpm für 48 h inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsüberstand mittels HPLC untersucht.

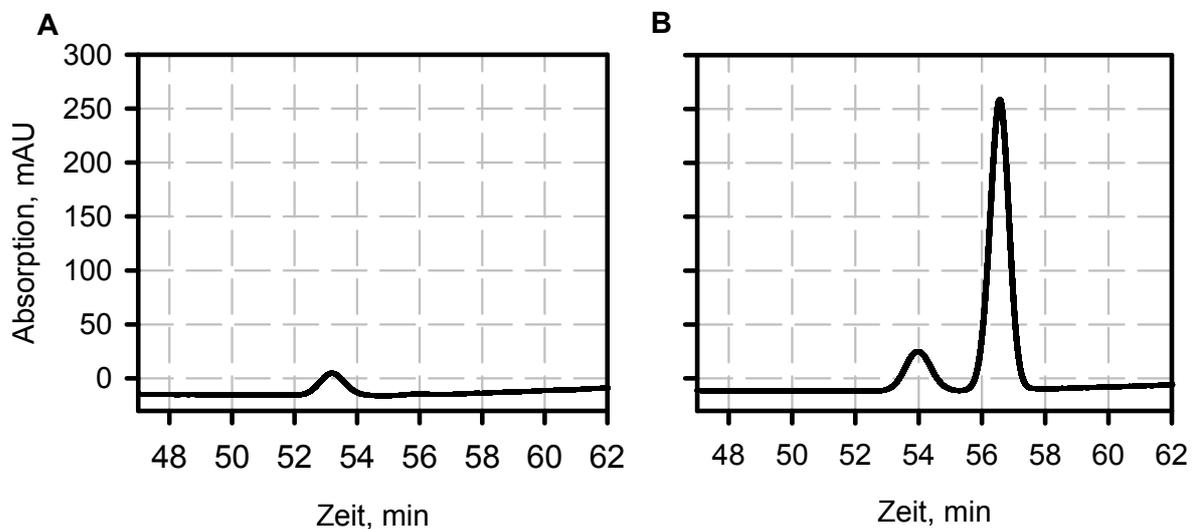


Abbildung 7.2: Ausschnitte der HPLC-Chromatogramme des Überstands von *E. coli* BL21(DE3) (A) und *E. coli* BL21(DE3) pET22b(+)-12 α -*hsdh* (B) nach 48 h Inkubation mit 25 mM Cholsäure. Es wurden 9,2 g_{BTM} L⁻¹ Zellen eingesetzt. Die Retentionszeit von 7-Keto-Desoxycholsäure beträgt ca. 53 – 54 min, von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure ca. 56 min.

Wie in Abbildung 7.2 A zu sehen, wurde mittels HPLC 7-keto-Desoxycholsäure bei Inkubation von *E. coli* BL21(DE3) festgestellt. Bei der 7-Keto-Desoxycholsäure handelt es sich um das Produkt der 7 α -HSDH-Katalyse aus Cholsäure. Zum Vergleich ist die Verwendung des Stamms *E. coli* BL21(DE3) pET22b(+)-12 α -*hsdh* in Abbildung 7.2 B dargestellt. Hier ist der zusätzliche Peak der 12-Keto-Chenodesoxycholsäure zu erkennen, welche eine Retentionszeit von ca. 56 min aufweist. Auch hier wurde zusätzlich 7-Keto-Desoxycholsäure nachgewiesen. Damit konnte gezeigt werden, dass die NADH-abhängige 7 α -HSDH des eingesetzten Stamms aktiv in der Zelle vorliegt und Cholsäure umsetzt.

Aus diesem Grund war es nötig, das 7 α -HSDH-codierende Gen auszuschalten, um den Stamm *E. coli* BL21(DE3) für Ganzzellbiotransformationen, sowohl zur Oxidation als auch zur

Reduktion von Gallensäuren einsetzen zu können. Hierzu wurde das in Abschnitt 4.4.18 beschriebene Verfahren angewandt, in dem eine Kanamycin-Resistenz als Selektionsmarker in das Zielgen insertiert wurde. Ein erfolgreicher Einbau konnte zusätzlich mittels Sequenzierung bestätigt werden.

Um das erfolgreiche Ausschalten der natürlichen 7α -HSDH-Aktivität zu zeigen, wurde der erstellte Knockout-Stamm ebenfalls mit $9,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen im 2 mL-Maßstab mit 25 mM Cholsäure in 50 mM Kaliumphosphatpuffer bei Raumtemperatur und 250 rpm für 48 h inkubiert. Außerdem wurde der erhaltene Stamm mit dem Plasmid pET22b(+)- 12α -*hsdh* transformiert und unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

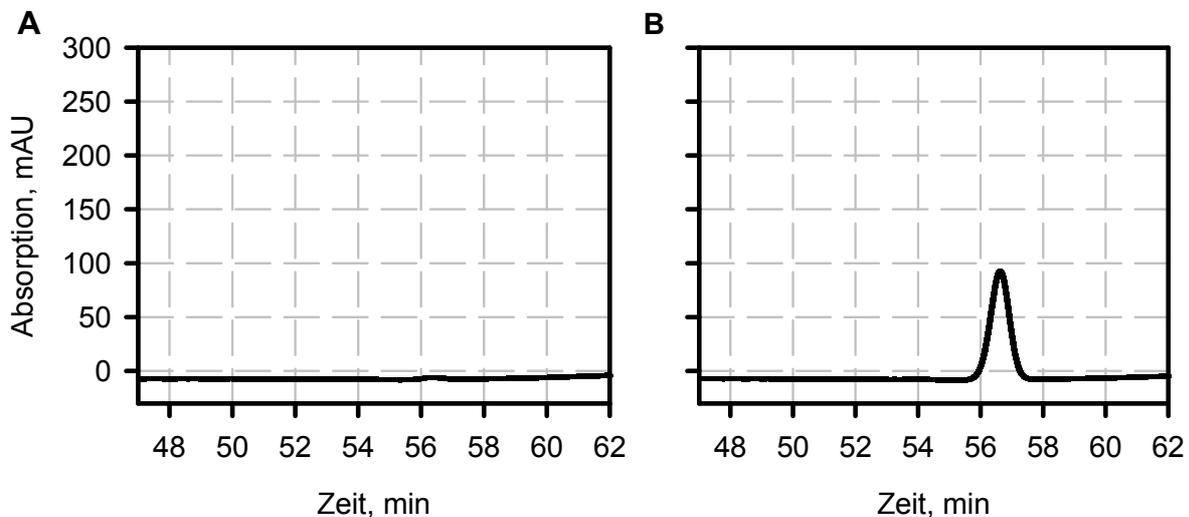


Abbildung 7.3: Ausschnitte der HPLC-Chromatogramme der Analyse des Überstands von *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ (A) und *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ pET22b(+)- 12α -*hsdh* (B) nach 48 h Inkubation mit 25 mM Cholsäure. Es wurden $9,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen eingesetzt. Die Retentionszeit von 7-Keto-Desoxycholsäure beträgt ca. 53 – 54 min, von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure ca. 56 min.

Die Auswertung des HPLC-Chromatogramms in Abbildung 7.3 A bestätigt, dass der erstellte *Knockout*-Stamm *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ keine messbare Mengen an 7-Keto-Desoxycholsäure produziert. Bei Verwendung des Stamms *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ pET22b(+)- 12α -*hsdh* kann in Abbildung 7.3 B nur die 12-Keto-Chenodesoxycholsäure detektiert werden, die durch die rekombinante 12α -HSDH synthetisiert wurde.

In Kombination mit dem Sequenzierungsergebnis, der beobachteten Kanamycinresistenz und der HPLC-Analyse in Abbildung 7.3 kann von einem erfolgreichen Ausschalten der genomkodierten 7α -HSDH ausgegangen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der neue Stamm kompetent zur DNA-Aufnahme gemacht werden kann. Der Stamm wird daher im Folgenden für sämtliche Ganzzellbiotransformationen eingesetzt.

7.1.3 Vektorkonstrukte

Für die Biotransformation von Cholsäure zu 12-Keto-Chenodesoxycholsäure wurden folgende Vektorkonstrukte erstellt, die mittels Sequenzierung verifiziert wurden:

- **pCOLA(mod)-baiG:** Bei diesem Vektorkonstrukt wurde zunächst das Gen aus *Clostridium scindens* DSM 5676 mittels Kolonien-PCR und der Primer BaiG_forward und BaiG_revers_XhoI amplifiziert, dessen Genprodukt eine 99 % Identität zu einem Steroidtransporter aus *Eubacterium* sp. Stamm VPI 12708 aufweist (Mallonee & Hylemon, 1996). Die Klonierung erfolgte in die *multiple cloning sites 2* über die Schnittstellen NdeI und XhoI. Der Stamm wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen.

Der Steroidtransporter aus *Eubacterium* sp. Stamm VPI 12708 wurde gewählt, da dessen Expression in *E. coli* zu einer siebenfach erhöhten Aufnahme von Cholsäure führte und dabei eine Präferenz zu primären Gallensalzen besitzt (Mallonee & Hylemon, 1996). Kombiniert mit den bekannten und unbekanntenen Effluxsystemen von *E. coli* (Thanassi *et al.*, 1997) sollte der Effekt des zusätzlichen Transports untersucht werden.
- **pCOLA(mod)-sth:** Die Amplifikation der Gensequenz, welche eine lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase kodiert, wurde mit Hilfe der Oligonukleotide Sth-pf5_PciI_forw und Sth-pf5_BamHI_rev auf isolierter, genomischer DNA von *Pseudomonas fluorescens* pf5 durchgeführt. Da die Klonierung in den Vektor pCOLA(mod) über die Schnittstellen NcoI und BamHI erfolgte, wurde eine NcoI-Schnittstelle in der neuen Chloramphenicol-Resistenz des Vektors mittels positionsgerechter Mutagenese entfernt. Der Vektor enthält zusätzlich eine verkürzte *multiple cloning sites 2*. Das PCR-Produkt des sth-Gens wurde mit PciI verdaut, welches NcoI-kompatible Enden erzeugt, da die Gensequenz selbst eine NcoI-Schnittstelle enthält. Durch die Klonierung über NcoI, welches ein ATG-Startsignal enthält, wurde die Gensequenz N-terminal um ein Methionin und ein Serin verlängert.

Die Transhydrogenase koppelt den NAD⁺ / NADH- mit dem NADP⁺ / NADPH-Pool (French *et al.*, 1997). Da der Metabolismus von *E. coli* ein hohes Verhältnis von NAD⁺ zu NADH von ca. 20 einstellt (Lengeler *et al.*, 1999), sollte dieses günstige Verhältnis auf den NADP⁺ / NADPH-Pool übertragen werden, um NADP⁺ für die Oxidation von Cholsäure bereitzustellen.
- **pCOLA(mod)-sth-baiG:** Dieser Vektor enthält sowohl die Sequenz der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* pf5 über NcoI und BamHI in der *multiple cloning sites 1* und den Steroidtransporter BaiG über NdeI und XhoI in der *multiple cloning sites 2*, wie in den beiden vorigen Vektoren beschrieben.

Der Vektor pCOLADuet-1 wurde als Ausgangsvektor ausgewählt, da er kompatibel zum pET-System ist und über zwei *multiple cloning sites* verfügt. Zudem liegt er in einer geringeren Kopienzahl vor, da vermutet wurde, dass die 12 α -HSDH in einer höheren Konzentration vorliegen sollte als der Transporter BaiG und die lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase.

7.1.4 Stammdurchmusterung bei verschiedenen Bedingungen

Die erstellten Vektorkonstrukte wurden in den Stamm *E. coli* BL21(DE) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ jeweils zusammen mit dem Vektor pET22b(+)-12 α -*hsdh* kotransformiert. Um den geeignetsten Stamm zu identifizieren, wurden die Biokatalysatoren im Schüttelkolben hergestellt. Es wurde jeweils der Stamm *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ pET22b(+)-12 α -*hsdh*, welcher keine weiteren, rekombinanten Hilfsproteine enthält, als Kontrolle untersucht. Bei der Durchmusterung sollten neben dem Auffinden eines Produktionsstamms verschiedene Reaktionsbedingungen für einen späteren Prozess untersucht werden. Sämtliche Versuche zur Stammdurchmusterung wurden im 2 mL-Maßstab bei pH 8,0, 24 °C und 250 rpm durchgeführt.

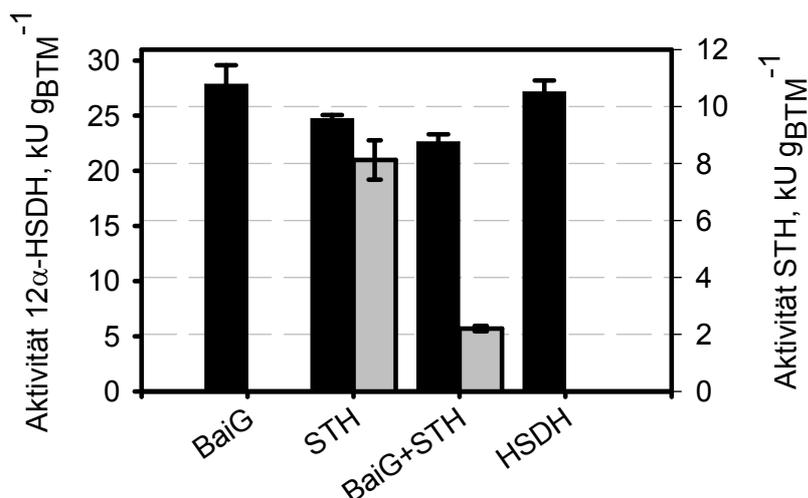


Abbildung 7.4: Aktivitäten der untersuchten Stämme zur Oxidation von Cholsäure nach Kultivierung im Schüttelkolben. Zusätzlich zur 12 α -HSDH enthalten die Stämme einen Steroidtransporter (BaiG) und eine lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase (STH). Zum Vergleich wurde der Stamm ohne Hilfsproteine (HSDH) verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte der Aktivitäten der 12 α -HSDH (■) und der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase (▒) samt Standardfehler im Dreifachansatz bezogen auf die Biotrockenmasse.

Zunächst wurde die Aktivität der 12 α -HSDH und der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase untersucht. Die verschiedenen Stämme in Abbildung 7.4 weisen eine vergleichbare 12 α -HSDH-Aktivität auf. Die höchsten Aktivitäten konnten beim Kontrollstamm (HSDH) und bei Koexpression des Steroidtransporters (BaiG) mit $27,1 \pm 1,1$ kU g_{BTM}⁻¹ beziehungsweise $27,8 \pm 1,8$ kU g_{BTM}⁻¹ beobachtet werden. Des Weiteren konnte die lösliche Pyridin-

Nukleotid-Transhydrogenase mit $8,1 \pm 0,7 \text{ kU g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bei alleiniger Koexpression und $2,2 \pm 0,1 \text{ kU g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bei zusätzlicher Expression von BaiG erfolgreich exprimiert werden. Letzter Stamm wies die geringste 12α -HSDH-Aktivität auf, was auf die heterologe Expression dreier Proteine zurückgeführt werden kann.

Da die untersuchten Stämme keine heterolog exprimierten Enzyme zur Regenerierung von NADP^+ besitzen, sondern mit der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase eine Möglichkeit erhalten auf das günstige $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ -Verhältnis zurückzugreifen, sollte ein geeignetes Kosubstrat gefunden werden, das die Kofaktorregenerierung zusätzlich über den zelleigenen Metabolismus unterstützt. Da *E. coli* über eine intrazelluläre Glutamatdehydrogenase verfügt, sollten zunächst die beiden Substrate der Glutamatdehydrogenase, 2-Oxoglutarat und Ammonium, untersucht werden. Glutamatdehydrogenasen wurden in zellfreien Systemen bereits zur Cholsäureoxidation und weiteren NADP^+ -Regenerationen eingesetzt (Carrea *et al.*, 1985; Kroutil *et al.*, 2004a).

Die Durchmusterungsversuche wurden mit einer Zelldichte von $9,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ durchgeführt. Zuerst sollte die Zugabe von 25 mM der Kosubstrate der Glutamatdehydrogenase, 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat, was einer potenziellen Ammoniumkonzentration von 50 mM entspricht, untersucht werden.

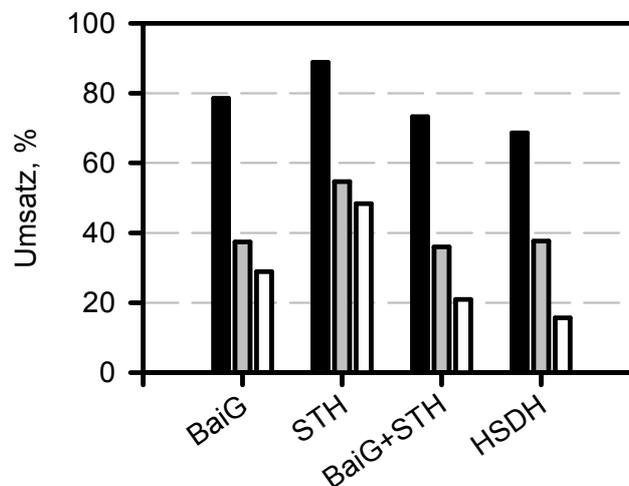


Abbildung 7.5: Einfluss der Kosubstrate 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat. Gezeigt sind die Mittelwerte des Umsatzes von 25 mM Cholsäure mit $9,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen im Doppelansatz ohne Kosubstrate (□), mit 25 mM 2-Oxoglutarat (▒) beziehungsweise 25 mM 2-Oxoglutarat und 25 mM Diammoniumhydrogenphosphat (■) nach 24 h. Zusätzlich zur 12α -HSDH enthalten die Stämme einen rekombinanten Steroidtransporter (BaiG) und eine lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase (STH). Zum Vergleich wurde der Stamm ohne Hilfsproteine (HSDH) verwendet.

Wie in Abbildung 7.5 zu sehen, spielen die beiden eingesetzten Kosubstrate 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat als Ammoniumquelle eine entscheidende Rolle für eine hohe Umsetzung von Cholsäure innerhalb von 24 h Prozesszeit. Während kein Stamm ohne

Kosubstrate über 50 % Umsatz erreichte, erhöhte bereits die Zugabe einer äquimolaren Menge an 2-Oxoglutarat die Umsetzungen deutlich bei allen Stämmen. Im Falle der alleinigen Überexpression der 12 α -HSDH konnte der Umsatz mehr als verdoppelt werden. Bei den Stämmen, welche einen Steroidtransporter enthielten, wurde die Umsetzung um ca. 30 % beziehungsweise über 70 % verbessert. Bei heterologer Expression der 12 α -HSDH und der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase verbesserte sich der Umsatz um ca. 13 %. Wie aus Abbildung 3.17 ersichtlich, würde die Beteiligung einer intrazellulären Glutamatdehydrogenase Ammoniumionen für die Reduktion von 2-Oxoglutarat benötigen. Abbildung 7.5 zeigt, dass äquimolare Mengen an Diammoniumhydrogenphosphat und 2-Oxoglutarat zu den besten Umsätzen von ca. 68 % im Falle der Kontrolle ohne Hilfsproteine und über 88 % im Falle der zusätzlichen Expression der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase, führt. Der Ansatz unter Verwendung äquimolarer Mengen der Kosubstrate wird daher für weitere Durchmusterungsversuche als Referenz betrachtet.

Zusätzlich zeigen sämtliche Stämme bessere Umsetzungen von Cholsäure gegenüber dem Kontrollstamm. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ *pET22b(+)-12 α -hsdh* *pCOLA(mod)-sth* zeigte in allen drei Versuchen die höchsten Umsätze.

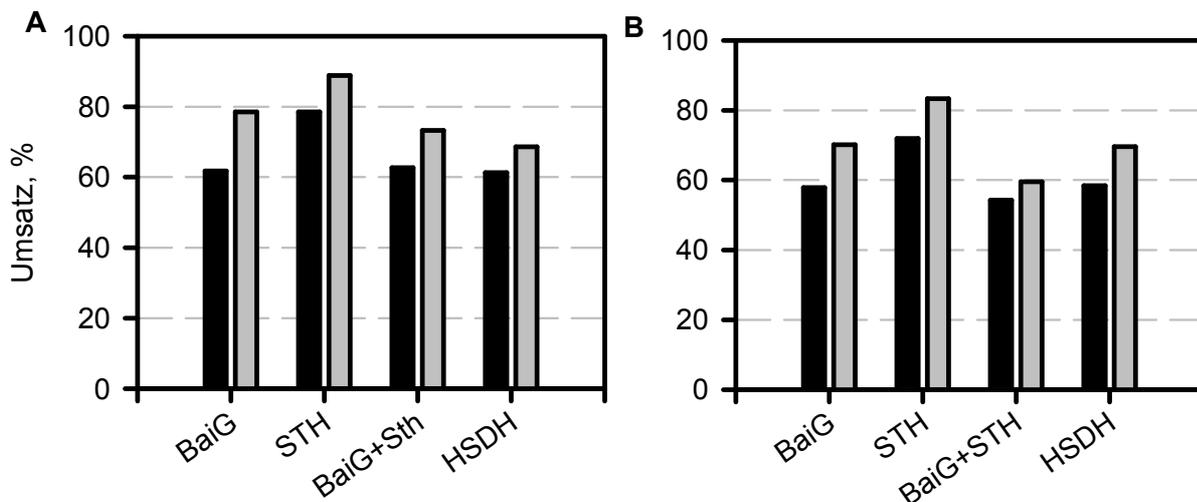


Abbildung 7.6: Einfluss der Biomassekonzentration auf die Biotransformation. Gezeigt sind die Mittelwerte des Umsatzes von 25 mM Cholsäure (A) im Doppelansatz mit 4,6 g_{BTM} L⁻¹ (■) und 9,2 g_{BTM} L⁻¹ (▒), beziehungsweise 50 mM Cholsäure (B) mit 9,2 g_{BTM} L⁻¹ (■) und 18,5 g_{BTM} L⁻¹ (▒) nach 24 h. Es kamen äquimolare Mengen der Kosubstrate 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat zum Einsatz. Zusätzlich zur 12 α -HSDH enthalten die Stämme einen rekombinanten Steroidtransporter (BaiG) und eine lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase (STH). Zum Vergleich wurde der Stamm ohne Hilfsproteine (HSDH) verwendet.

Des Weiteren sollte der Einfluss der Biokatalysatorkonzentration auf die Biotransformation von Cholsäure untersucht werden. Hierzu wurden 25 und 50 mM Cholsäure mit jeweils äquimola-

ren Konzentrationen der Kosubstrate versetzt. Beide Cholsäurekonzentrationen wurden mit zwei verschiedenen Biokatalysatorkonzentrationen umgesetzt.

Abbildung 7.6 zeigt in sämtlichen Ansätzen zur Oxidation von 25 und 50 mM Cholsäure mit äquimolaren Mengen an Kosubstraten höhere Umsetzungen bei einer höheren Biomassekonzentration. Eine Verdopplung der Zellzahl bewirkt eine Verbesserung der Umsetzung von 25 mM Cholsäure zwischen 11 % (HSDH) bis zu 27 % (BaiG). Dies ist auch bei der Oxidation von 50 mM Cholsäure zu beobachten, wobei Steigerungen von 10 (BaiG+STH) – 21 % (BaiG) erzielt wurden. Es ist zu erkennen, dass sich eine Erhöhung der Biokatalysatorkonzentrationen positiv auf die Umsätze auswirkt. Des Weiteren zeigen die Stämme mit dem Steroidtransporter, beziehungsweise mit einem Steroidtransporter und der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase keine Verbesserungen gegenüber dem Kontrollstamm bei der Umsetzung von 25 mM Cholsäure unter Verwendung von $4,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$. Dies ist ebenfalls bei der Oxidation von 50 mM Cholsäure mit $9,2$ und $18,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Biokatalysator zu erkennen. Die Koexpression der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase ohne Steroidtransporter hingegen führte bei sämtlichen betrachteten Ansätzen wiederum zu den besten Ergebnissen. Innerhalb von 24 h konnten mit $9,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ 88 % Umsatz von 25 mM Cholsäure und mit $18,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ 83 % Umsatz von 50 mM Cholsäure erreicht werden.

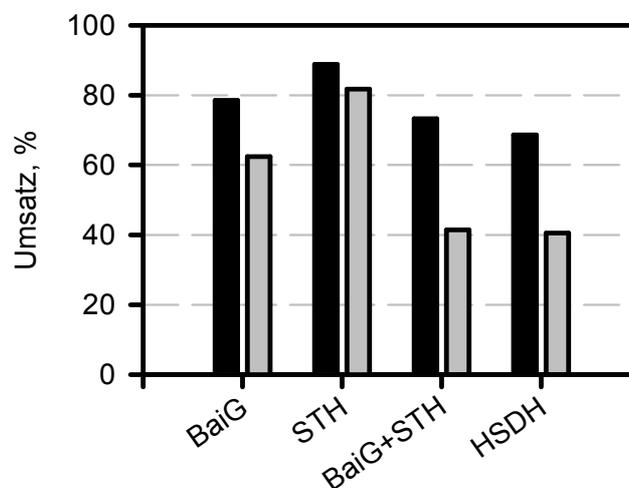


Abbildung 7.7: Einfluss von Glucose. Gezeigt sind die Mittelwerte des Umsatzes von 25 mM Cholsäure im Doppelansatz ohne Glucose-Zugabe (■) und mit 5 g L^{-1} Glucose (▒) und $9,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen. Es kamen äquimolare Mengen der Kosubstrate 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat zum Einsatz. Zusätzlich zur 12α -HSDH enthalten die Stämme einen rekombinanten Steroidtransporter (BaiG) und eine lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase (STH). Zum Vergleich wurde der Stamm ohne Hilfsproteine (HSDH) verwendet.

Um die Auswirkung einer Kohlenstoffquelle als Bausteinlieferant und Energieträger auf die Ganzzellbiotransformation zu untersuchen, wurden der Referenzansatz aus Abbildung 7.5 mit 5 g L^{-1} Glucose versetzt. Der eingesetzte Steroidtransporter BaiG besitzt eine 99 % Identität

zu einem ATP-abhängigen Transporter aus *Eubacterium* sp. Stamm VPI 12708, weshalb untersucht werden sollte, ob die Zugabe eines Energieträgers zu einem besseren Import der Cholsäure und damit schnelleren Umsätzen führt. Zudem wurde angenommen, dass sich Glucose positiv auf die Vitalität der Zellen auswirkt.

In Abbildung 7.7 ist jedoch zu sehen, dass sämtliche Stämme verringerte Umsätze bei Zugabe von Glucose aufweisen. Im Falle des Kontrollstamms betrug der Verlust innerhalb der betrachteten Prozesszeit ca. 40 %. Die Koexpression des Steroidtransporters zeigte im Versuch mit 62 % Umsatz das zweitbeste Ergebnis, was darauf hindeuten könnte, dass der zusätzliche Energieträger zu einer verbesserten Steroidaufnahme führt und dadurch der ansonsten sichtbare negative Effekt von Glucose weniger intensiv ausfällt.

Die Ergebnisse aus Abbildung 7.5 bis Abbildung 7.7 zeigen deutlich, dass der Stamm *E. coli* BL21(DE3) *hdhA⁻ KanR⁺ pET22b(+)-12 α -hsdh pCOLA(mod)-sth* unter sämtlichen Bedingungen die höchsten Umsätze innerhalb von 24 h Prozesszeit aufzeigt. Sie lagen stetig über den Umsätzen des Kontrollstamms, obwohl dieser eine höhere 12 α -HSDH-Aktivität pro Biotrockenmasse aufweist. Demnach scheint der Einsatz der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase von Vorteil für die Ganzzelloxidation zu sein. Die bei Koexpression des Steroidtransporters zusätzlich zur löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase beobachtete Verringerung der STH-Aktivität führte stets zu geringeren Umsätzen. Daher wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) *hdhA⁻ KanR⁺ pET22b(+)-12 α -hsdh pCOLA(mod)-sth* für die weitere Prozessentwicklung von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure im Ganzzellansatz eingesetzt.

7.2 Herstellung des Biokatalysators im Zulaufverfahren

Nach Evaluierung der erstellten Stämme, sollte der in der Durchmusterung ausgewählte Stamm *E. coli* BL21(DE3) *hdhA⁻ KanR⁺ pET22b(+)-12 α -hsdh pCOLA(mod)-sth* im Litermaßstab hergestellt werden. Hierzu wurde eine Kultivierung, verändert nach Wilms *et al.* (2001), durchgeführt, welche sich bereits in Vorversuchen zur 12 α -HSDH-Produktion im Rührkesselreaktor ($V = 42$ L) als geeignet erwies (Daten nicht gezeigt). Dabei kommen ein Minimalmedium mit Zusätzen, sowie ein exponentieller Zulauf bestehend aus Glucose und Diammoniumhydrogenphosphat in einem Rührkesselreaktor (Labfors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) ($V = 7,5$ L) zum Einsatz. Die Verwendung eines definierten Mediums birgt einige Vorteile gegenüber Komplexmedium. Zum einen bietet es reproduzierbare Bedingungen und zum anderen könnte der Einsatz von Komplexmedium bei einer späteren Zulassung in Hinblick auf die Ursodesoxycholsäure-Herstellung kritisch bewertet werden. Allerdings können

geringere spezifische Aktivitäten pro Zellmasse gegenüber der Verwendung eines Vollmediums resultieren.

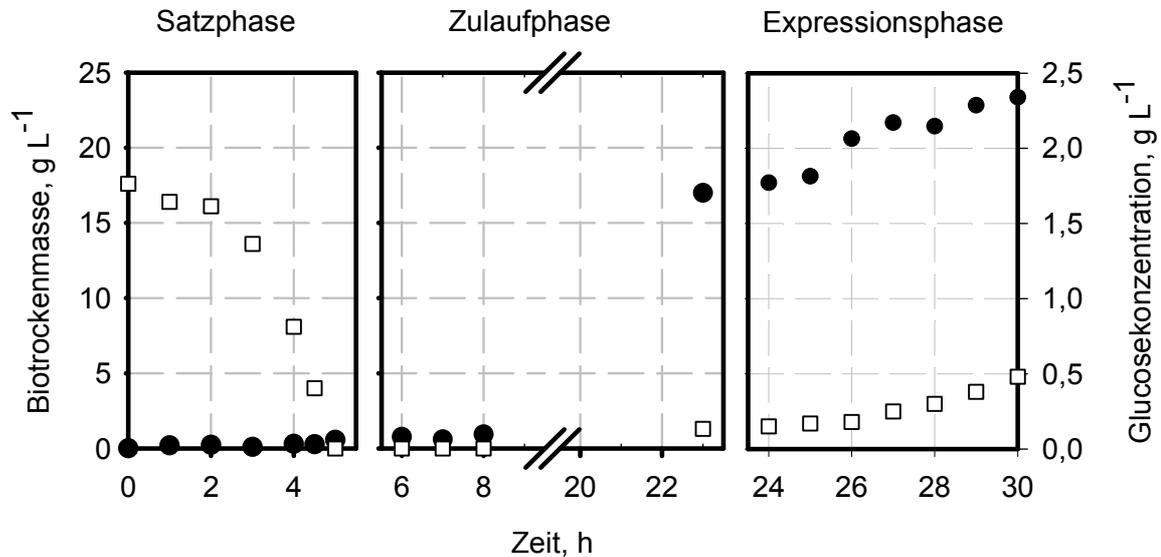


Abbildung 7.8: Exemplarischer Verlauf der Biotrockenmasse (●) - und Glucosekonzentration (□) während der Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ *pET22b(+)-12α-hsdh pCOLA(mod)-sth* im Zulaufverfahren. Die Induktion erfolgte im vorliegenden Beispiel nach 23 h.

Der Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration in Abbildung 7.8 zeigt exemplarisch für die durchgeführten Kultivierungen einen Anstieg auf 0,77 g L⁻¹ während der Satzphase, welche im gezeigten Fall nach 6 h beendet war. Dieser Wert liegt etwas unter der erwarteten Biotrockenmasse-Konzentration, die sich aus der bis dahin kompletten verbrauchten Glucose errechnet. Die Dauer der Satzphase variierte während verschiedener Kultivierungen, bedingt durch unterschiedliche physiologische Zustände der Zellen aus der Vorkultur.

Anschließend wurde die Zulaufphase gestartet, wobei eine Wachstumsrate von $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ im dargestellten Beispiel mittels exponentieller Zulauftrate eingestellt wurde. Nach 17 h wurde auf diese Weise eine Biotrockenmasse-Konzentration von 17 g L⁻¹ erreicht. Basierend auf der Schätzung nach Gleichung 4.1 und einer angenommenen Biotrockenmasse-Konzentration zu Beginn der Zulaufphase von 1 g L⁻¹ wurde eine Biotrockenmasse-Konzentration von 17,8 g L⁻¹ erwartet, was sich nur unwesentlich vom gemessenen Wert unterscheidet. Nach Induktion mit IPTG wurde die Wachstumsrate zur Expression auf $\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$ gesenkt. Nach 7 h Expressionsphase und 30 h Prozesszeit wurde eine Biotrockenmasse-Konzentration von 23,4 g L⁻¹ erreicht. Der geschätzte Wert liegt bei 25,9 g L⁻¹. Die Differenz kann auf die gesteigerte Proteinexpression und mRNA-Bildung zurückgeführt werden. Die Glucosekonzentration stieg während der Expressionsphase von 0,13 g L⁻¹ bis zum Prozessende auf 0,48 g L⁻¹ an. Die Akkumulation der Glucose kann ebenfalls mit der Induktion begründet werden, da der Induktor IPTG inhibierend wirken kann (Wilms *et al.*, 2001).

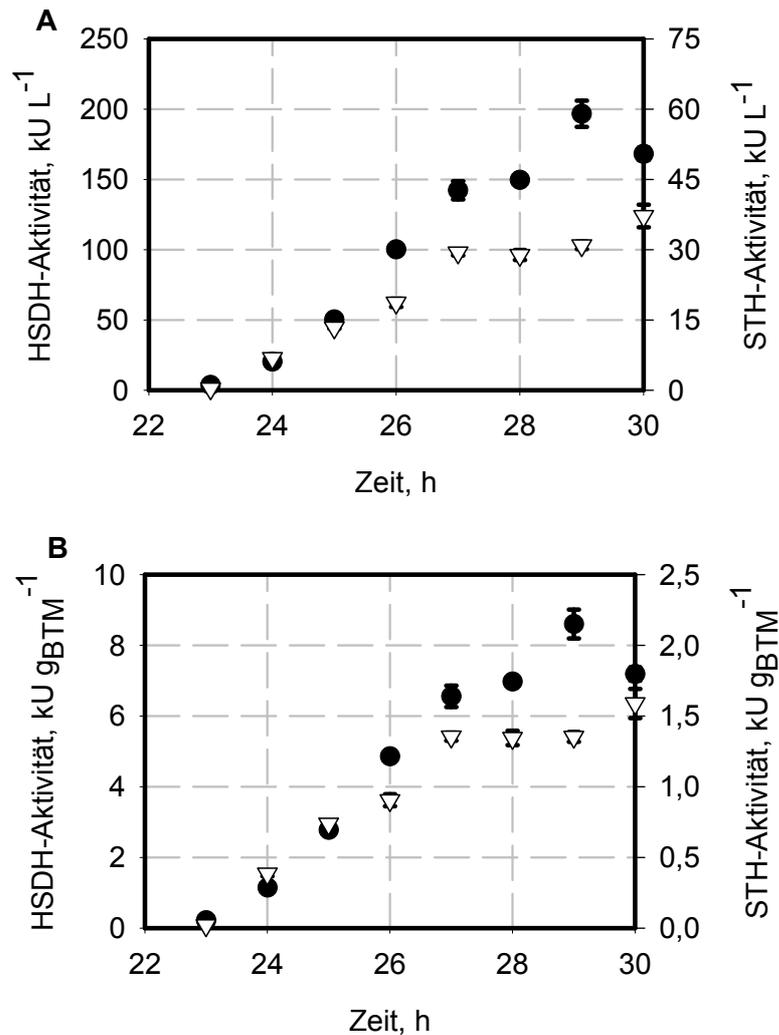


Abbildung 7.9: Verlauf der 12 α -HSDH-Aktivität (●) und der Aktivität der löslichen Pyridin-Nukleotid-transhydrogenase (STH, ▽) während der Expressionsphase in Abbildung 7.8. Gezeigt sind die Mittelwerte im Dreifachansatz samt Standardfehler der volumetrischen Aktivitäten des Kulturmediums (A) und der Aktivität bezogen auf den Biokatalysator (B).

Die 12 α -HSDH-Aktivität in Abbildung 7.9 zeigt eine fast lineare Zunahme der Aktivität vom Zeitpunkt der Induktion mit 3,7 kU L⁻¹ bis zu 6 h nach Induktion auf einen Wert von 215 kU L⁻¹. Nach 7 h Expression fällt der Aktivitätswert jedoch wieder auf 174 kU L⁻¹. Die Stagnation beziehungsweise Abnahme eines exprimierten Proteins unter Verwendung von IPTG ist bereits in der Literatur beschrieben (Wilms *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte ein Anstieg der STH-Aktivität von 0,34 kU L⁻¹ auf 30,9 kU L⁻¹ nach 6 h und 37,1 kU L⁻¹ nach 7 h beachtet werden. Bezogen auf die Biotrockenmasse wurden Zellen mit 8,6 kU g_{BTM}⁻¹ 12 α -HSDH und 1,3 kU g_{BTM}⁻¹ STH-Aktivität nach 6 h und 7,2 kU g_{BTM}⁻¹ 12 α -HSDH und 1,8 kU g_{BTM}⁻¹ STH-Aktivität nach 7 h erhalten. Der unterschiedliche Verlauf beider Enzyme kann mit den verschiedenen Vektoren und Antibiotikaresistenz-Genen erklärt werden. Die 12 α -HSDH-Sequenz ist auf einem pET22b(+)-Vektor kodiert, welcher die Resistenz für das thermolabile Antibioti-

kum Ampicillin trägt. Auf Grund des Aktivitätsverlauf aus Abbildung 7.9 wurden die Zellen für die vorliegende Arbeit stets zwischen 6 und 7 h nach Induktion geerntet.

Der Biokatalysator weist gegenüber der Herstellung im Schüttelkolben deutlich verringerte spezifische Aktivitäten pro Zellmasse auf. Dies kann auf das im Schüttelkolben verwendete Vollmedium, sowie die höhere IPTG-Konzentration und veränderte Expressionsbedingungen, wie Dauer und Temperatur, zurückgeführt werden. Des Weiteren wurde bei der Kultivierung eine leichte Akkumulation von Glucose beobachtet, die zur Katabolitrepression führen kann.

7.3 Prozessentwicklung und reaktionskinetische Betrachtungen

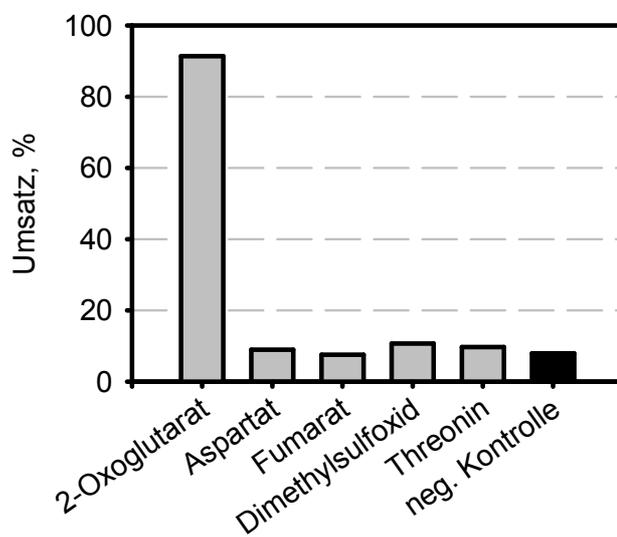
7.3.1 Alternative Kosubstrate

Wie in Abbildung 7.5 gezeigt wurde, sind die Kosubstrate 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat wichtige Faktoren für eine erfolgreiche Umsetzung von Cholsäure zu 12-Keto-Chenodesoxycholsäure. 2-Oxoglutarat und Ammonium sind Substrate der Glutamatdehydrogenase von *E. coli*, wodurch NADP^+ erzeugt wird (Sakamoto *et al.*, 1975). Da 2-Oxoglutarat mit einem Preis von 395,00 € kg^{-1} (Carl Roth, Stand: 28.01.2011) einen hohen Kostenanteil an einem Prozess ausmacht, sollten weitere kostengünstige Substrate von zelleigenen Stoffwechsellzymen von *E. coli* untersucht werden, welche direkt oder indirekt unter NAD(P)H-Oxidation umgesetzt werden. Die untersuchten Substrate, sowie deren beteiligte Stoffwechselwege und -enzyme, sind in Tabelle 7.1 aufgelistet.

In Abbildung 7.10 ist zu erkennen, dass die untersuchten, alternativen Kosubstrate nur zu Umsetzungen von etwa 10 % von 100 mM Cholsäure innerhalb von 96 h Prozesszeit führten. Dieser Umsatz unterschied sich kaum von der Negativkontrolle, in der keine Kosubstrate eingesetzt wurden. Um den Einfluss von Diammoniumhydrogenphosphat zu vernachlässigen, waren in jedem Ansatz ebenfalls 100 mM enthalten. Nur die Verwendung von 2-Oxoglutarat zeigte einen Umsatz von 91 % innerhalb der Prozesszeit. Zum einen liegen während der Reaktion aerobe Verhältnisse vor, weshalb die benötigten Enzyme wahrscheinlich keine Aktivität zeigen könnten. Zum anderen sind die biochemischen Synthesewege während der Biotransformation stark verlangsamt.

Tabelle 7.1: Alternative Kosubstrate. Untersuchte Kosubstrate mit dazugehörigem Stoffwechselweg und Enzym, sowie deren Preis (Carl Roth, Stand: 28.01.2011, ohne MwSt.)

Substrat	Enzym(e)	Stoffwechselweg	Preis, € kg ⁻¹
Aspartat	β-Aspartat-semialdehyd-Dehydrogenase Homoserindehydrogenase	Threoninbiosynthese	88,70
Dimethylsulfoxid	DMSO-Reduktase	Anaerobe Atmung	13,88
Fumarat	Fumaratreduktase	Anaerobe Atmung	16,58
Threonin	Threonindehydrogenase	Isoleucinsynthese	183,80
2-Oxoglutarat	Glutamatdehydrogenase	Glutamatsynthese	395,00

Abbildung 7.10: Biotransformation von Cholsäure mit alternativen Kosubstraten. Gezeigt ist der Umsatz nach 96 h Prozesszeit von 100 mM Cholsäure mit 100 mM Diammoniumhydrogenphosphat und 18,8 g_{BTM} L⁻¹ Biokatalysator unter Zugabe von 250 mM des zu untersuchenden Kosubstrats.

7.3.2 Reaktionskinetischer Einfluss der Kosubstrate

Basierend auf den Erkenntnissen von Abbildung 7.10, sollten reaktionskinetische Aspekte der beiden Kosubstrate 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat untersucht werden, um deren Vorteil für einen effektiven Prozess zu bestätigen. Hierzu wurden die Kosubstrate einzeln als auch kombiniert zugegeben und deren Effekte anschließend verglichen. Abbildung 7.11 stellt den zeitlichen Verlauf der Umsetzung von 50 mM Cholsäure dar. Unter der Verwendung äquimolarer Mengen an 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat konnte bereits nach 14 h ein Umsatz von 75 % erhalten werden. Nach 48 h wurde ein Umsatz von 97 % gemessen, der sich nach 72 h unwesentlich veränderte. Fehlte eines der beiden Kosubstrate, zeigt Abbildung 7.11 eine Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb

der ersten 14 Prozessstunden. Die Umsatzrate für die ersten 14 h war für die einzelnen Kosubstrate, sowie für die Negativkontrolle ähnlich.

Nach 48 h zeigten beide Kosubstrate höhere Umsetzungen gegenüber der Reaktion ohne Kosubstrat. Nach 72 h erreichte der Ansatz mit 50 mM Diammoniumhydrogenphosphat 59 %, derjenige mit 50 mM 2-Oxoglutarat 68 % Umsatz. Insgesamt konnte das Ergebnis aus Abbildung 7.5 bestätigt werden, da die Notwendigkeit beider Kosubstrate deutlich zu erkennen ist.

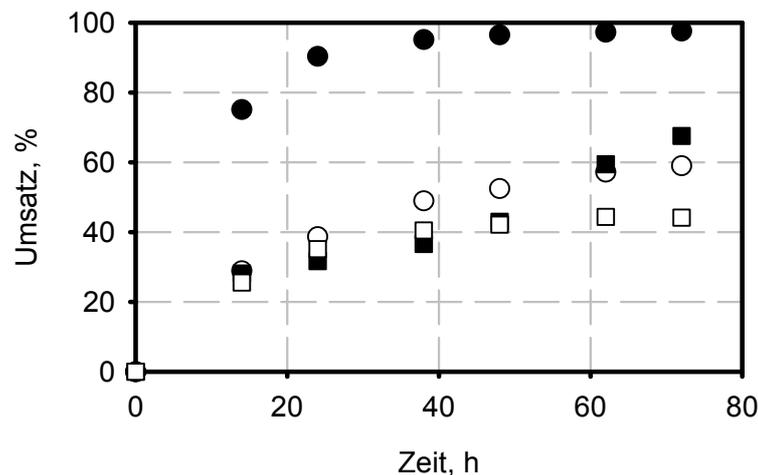


Abbildung 7.11: Einfluss der Kosubstrate auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Zu sehen ist der Umsatz von 50 mM Cholsäure mit $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Biokatalysator über 72 h. Es werden der Einfluss von 50 mM 2-Oxoglutarat und 50 mM Diammoniumhydrogenphosphat (●), 50 mM 2-Oxoglutarat (■), 50 mM Diammoniumhydrogenphosphat (○) mit der Kontrolle ohne Zusätze (□) verglichen.

7.3.3 Biokatalysatorkonzentration

Um eine geeignete Biokatalysatorkonzentration für einen Prozess zu finden, wurden Reaktionskinetiken bei drei verschiedenen Zellkonzentrationen zur Umsetzung von 50 mM Cholsäure, sowie der dreifachen molaren Menge an 2-Oxoglutarat und Ammoniumionen durchgeführt. Abbildung 7.12 vergleicht die aufgenommenen Reaktionskinetiken. Unter Verwendung von $9,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ wurde nach 2 h ein Umsatz von 17 % erreicht. Die doppelte Zellmasse steigerte den Umsatz auf 27 %. Eine weitere Verdopplung führte zu 33 % Umsatz. Ein vollständiger Umsatz von 50 mM Cholsäure wurde nach 48 h mit $37,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen erreicht. Zu diesem Zeitpunkt lag der Umsatz bei der halben Biokatalysatorkonzentration bei 98,9 %. Die Verwendung von $9,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen erbrachte einen Umsatz von 89 %. Hier konnte nach 72 h 96 % Umsatz erhalten werden.

Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass die Erhöhung der Kosubstrate 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat gegenüber dem Ansatz aus Abbildung 7.11 zu einer vollständigen Umsetzung von 50 mM Cholsäure innerhalb von 72 h führt. Dies veranschaulicht, dass eine optimale Konzentration der beiden Kosubstrate in weiteren Versuchen gefunden werden

muss. Zum anderen ist zu erkennen, dass eine Erhöhung der Biokatalysatorkonzentration, wie zu erwarten, zu schnelleren Umsatzraten führt. Innerhalb der ersten beiden Prozessstunden führte eine Vervierfachung der eingesetzten Zellen zu einer Verdopplung des Umsatzes. Wurde die doppelte Biokatalysatormenge eingesetzt, war der Umsatz um 60 % höher. Bei Betrachtung von Abbildung 7.11 fällt auf, dass die Verdopplung der Zellkonzentration von $9,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ auf $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ insgesamt einen größeren Effekt hat, als die Erhöhung von $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ auf $37,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$. In beiden Fällen konnte innerhalb von 48 h ein nahezu vollständiger Umsatz erhalten werden. Aus diesem Grund wurden für die weitere Prozessoptimierung Biomassekonzentrationen im Bereich von $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ eingesetzt.

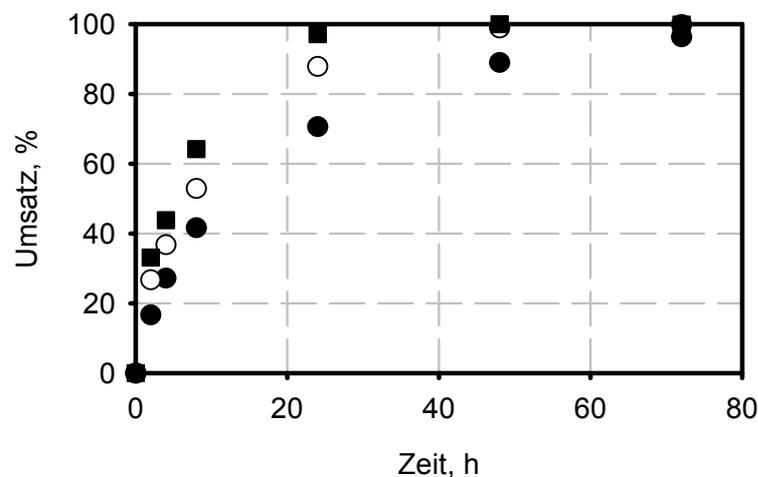


Abbildung 7.12: Einfluss der Biokatalysatorkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Zu sehen ist der Umsatz von 50 mM Cholsäure mit $9,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ (●), $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ (○) und $37,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ (■) Zellen über 72 h mit 150 mM 2-Oxoglutarat und 75 mM Diammoniumhydrogenphosphat.

7.3.4 Zellaggregatbildung

Während der untersuchten Prozesse von Kapitel 7.1.2 bis 7.3.3 wurde eine teils starke Zellaggregation beobachtet, wie sie in Abbildung 7.13 bei verschiedenen Cholsäurekonzentrationen zu erkennen ist. Diese Erscheinung konnte bereits in der Literatur bei verschiedenen Mikroorganismen beobachtet werden, welche in Anwesenheit von Gallensalzen Biofilme ausbilden (Prouty *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005; Hung *et al.*, 2006; Pumbwe *et al.*, 2007; Crawford *et al.*, 2008).

Der Biokatalysator verlor dadurch zwar nicht seine Biotransformationsleistung, jedoch stellen die Konglomerate verfahrenstechnische Probleme dar, wie beispielsweise eine erschwerte Durchmischung, Verklumpung des Rührorgans, sowie eine aufwändigere Aufarbeitung des Produkts und Reinigung des Reaktors. Des Weiteren kann es zu Limitationen des Stofftransports kommen.

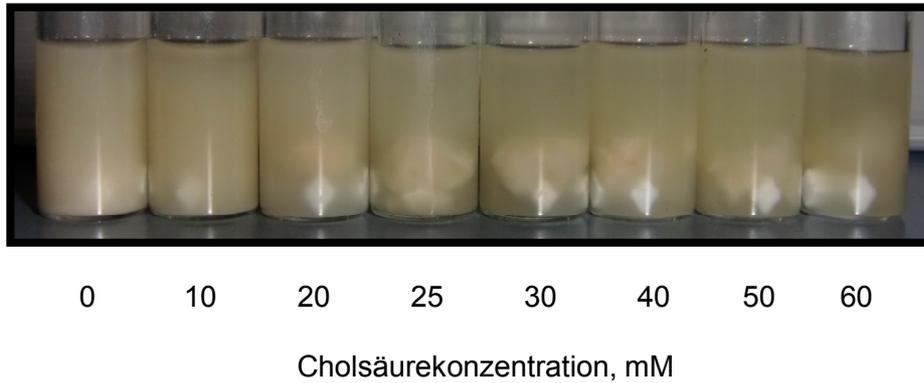


Abbildung 7.13: Zellaggregation bei der Umsetzung von Cholsäure mit 150 mM 2-Oxoglutarat und 100 mM Diammoniumhydrogenphosphat nach 24 h.

Aus diesem Grund sollte der Einfluss der eingesetzten Gallensalze und Kosubstrate auf eine Konglomeratbildung untersucht werden. Hierzu wurden Reaktionsmischungen mit den Komponenten aus Tabelle 7.2 angesetzt und die Aggregate visuell zu verschiedenen Zeitpunkten abgeschätzt.

Die Beobachtungen in Tabelle 7.2 belegen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Cholsäure und der Aggregatbildung. Die alleinige Inkubation mit 50 mM Cholsäure bewirkte eine starke Aggregation, wohingegen dies bei der Inkubation derselben Konzentration an Diammoniumhydrogenphosphat und 2-Oxoglutarat einzeln und kombiniert nicht gesehen werden konnte. Des Weiteren ist ein synergistischer Effekt von Cholsäure und der Kosubstrate zu erkennen, da die Inkubation von 50 mM Cholsäure in Kombination äquimolarer Mengen der beiden Kosubstrate einzeln oder kombiniert zu einer stärkeren Aggregation führten. Ein Grund hierfür könnte sein, dass 2-Oxoglutarat oder das entstehende Glutamat als Energie- und Kohlenstoffquelle für die Bildung der extrazellulären Polymermatrix dient.

Wurde 25 mM Cholsäure mit äquimolaren Mengen an Kosubstraten eingesetzt, fiel die Konglomeratbildung geringer aus. Diese wurde jedoch durch eine Erhöhung der Kosubstrate verstärkt. Auffällig ist zum einen, dass sich die Aggregate im Laufe der Zeit wieder lösten, wenn Cholsäure zu 12-Keto-Chenodesoxycholsäure umgesetzt wurde. Zum anderen zeigten die Zellen bei der Inkubation von 50 mM 12-Keto-Chenodesoxycholsäure keine Aggregation, sowie eine deutlich geringere Tendenz beim Zusatz äquimolarer Mengen der Kosubstrate. Dies kann mit dem amphipathischen Charakter von Cholsäure und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure erklärt werden. Cholsäure verfügt über drei, 12-Keto-Chenodesoxycholsäure hingegen nur über zwei Hydroxylgruppen in α -Konfiguration, wodurch die amphipathische Wirkung vermindert wird. Veränderungen der Stereochemie von Gallensäuren haben Auswirkungen auf deren physiologischen Eigenschaften (Armstrong & Carey,

1982; Heuman *et al.*, 1991). Es ist daher davon auszugehen, dass die Dihydroxygallensäure weniger schädlich zu sein scheint.

Tabelle 7.2: Aggregatbildung während der Biotransformation in Anwesenheit verschiedener Reaktanten. Die Konglomeratbildung wurde visuell bei einer Zellkonzentration von $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen abgeschätzt: (-) keine Aggregation, (+) leichte Aggregation um das Rührorgan, (++) starke Aggregation; mehrere, kleine Aggregate, (+++) sehr starke Aggregation

Substanz				Zeit, h				
DAHP	2-Oxoglutarat	Cholsäure	12-Keto-CDCS	1 h	2 h	3 h	22 h	45 h
50 mM	-	-	-	-	-	-	-	-
50 mM	50 mM	-	-	-	-	-	-	-
50 mM	50 mM	50 mM	-	+++	+++	+++	++	+
50 mM	50 mM	-	50 mM	+	+	+	-	-
-	50 mM	-	-	-	-	-	-	-
-	-	50 mM	-	+	++	++	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
50 mM	-	50 mM	-	+++	+++	+++	++	+
-	50 mM	50 mM	-	+++	+++	+++	+	-
25 mM	25 mM	25 mM	-	+	++	++	++	-
50 mM	50 mM	25 mM	-	+	++	++	+	-
50 mM	100 mM	25 mM		+++	+++	+++	+++	-
-	-	-	50 mM	-	-	-	-	-

Daraus ergeben sich zwei grundsätzliche Prozessansätze, die im Folgenden untersucht werden sollen. Einerseits kann die Biofilmbildung toleriert und ein einfaches Satzverfahren angewendet werden. Andererseits können verschiedene Strategien zur Vermeidung beziehungsweise Verminderung der Aggregation durchgeführt werden. Dazu kann der Biokatalysator immobilisiert werden. Ebenso kann ein Zulaufverfahren zur Minderung der Substratkonzentration im Reaktionsansatz zum Einsatz kommen, da festgestellt wurde, dass die Aggregation unter 20 mM Cholsäure nicht oder nur gering ausfällt. Diese verschiedenen Prozessstrategien sollen im Folgenden etabliert und diskutiert werden.

7.4 Satzverfahren mit immobilisierten Zellen

Der Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^-$ $KanR^+$ pET22b(+)-12 α -*hsdh* pCOLA(mod)-*sth* sollte immobilisiert werden, um die Aggregation der Zellen und die resultierenden, verfahrenstechnischen Schwierigkeiten zu vermeiden. Des Weiteren ist die Handhabung von Immobilisaten bei der Prozessvorbereitung erleichtert. Die Immobilisierung in eine Alginatmatrix wurde gewählt, da es sich hierbei um eine einfache, kostengünstige und etablierte Methode mit guter Biokompatibilität handelt (Chan *et al.*, 2002; Chan & Heng, 2002).

7.4.1 Charakterisierung

Der immobilisierte Biokatalysator, welcher in Abbildung 7.14 dargestellt ist, hatte einen Durchmesser von 3 mm und enthielt ausgehend von der eingesetzten Zellsuspension eine theoretische Biotrockenmasse-Konzentration von $0,052 \text{ g g}^{-1}$. Die Alginat-immobilisierten Zellen konnte mit dem in Kapitel 4.7.6 beschriebenen Verfahren mit einer Geschwindigkeit von 37 g h^{-1} hergestellt werden. Daher ist die Methode nur für die Herstellung geringer Mengen Immobilisat geeignet, da die optimale Inkubationszeit der Alginatkugeln in der Calciumchloridlösung mit 20 Minuten angegeben ist (Sankalia *et al.*, 2005). Für Herstellung größerer Mengen immobilisierter Zellen musste die Inkubationszeit auf bis zu 60 Minuten erhöht werden.

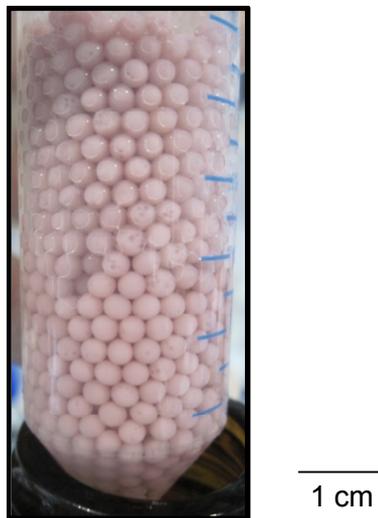


Abbildung 7.14: Alginat-immobilisierter Biokatalysator.

7.4.2 Vergleich von freien und immobilisierten Zellen

Um die Katalysefähigkeit der immobilisierten Zellen gegenüber freien Zellen zu vergleichen, wurden diese im 10 mL-Maßstab bei zwei verschiedenen Cholsäurekonzentrationen einge-

setzt. So wurde die Umsetzung von 50 mM Cholsäure mit 125 mM 2-Oxoglutarat und 100 mM Diammoniumhydrogenphosphat, als auch von 100 mM Cholsäure mit 250 mM 2-Oxoglutarat und 100 mM Diammoniumhydrogenphosphat, untersucht. Es kam jeweils eine Biotrockenmasse von $18,8 \text{ g L}^{-1}$ zum Einsatz. Die Biokatalyse wurde 96 h bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und 250 rpm durchgeführt. Da die Alginatepartikel durch Phosphationen destabilisiert werden, wurde die Biotransformation mit immobilisierten Zellen in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, durchgeführt.

In Abbildung 7.15 A konnten sowohl freie als auch immobilisierte Zellen 50 mM Cholsäure in vergleichbarer Zeit vollständig umsetzen. Freie Zellen erreichten nach 48 h vollen Umsatz, wobei das Immobilisat zu diesem Zeitpunkt 97 % der Cholsäure umgesetzt hatte. Innerhalb der nächsten 24 h wurde ebenfalls keine verbleibende Cholsäure detektiert.

Bei der Umsetzung von 100 mM Cholsäure in Abbildung 7.15 B konnten freie als auch immobilisierte Zellen unter den Prozessbedingungen keine vollständigen Umsetzungen zeigen. Innerhalb der ersten 16 h erreichten die Biokatalysatoren vergleichbare Umsätze von 48 % beziehungsweise 45 %. Anschließend verlangsamte sich die Reaktionsgeschwindigkeit des Immobilisats, so dass nach 96 h bei Verwendung freier Zellen 95 %, bei Gebrauch immobilisierter Zellen ein Umsatz von 87 % einstellte. Abbildung 7.15 B zeigt zugleich, dass im Ganzzellbiotransformationsverfahren potentiell Cholsäurekonzentrationen um die 100 mM umgesetzt werden können.

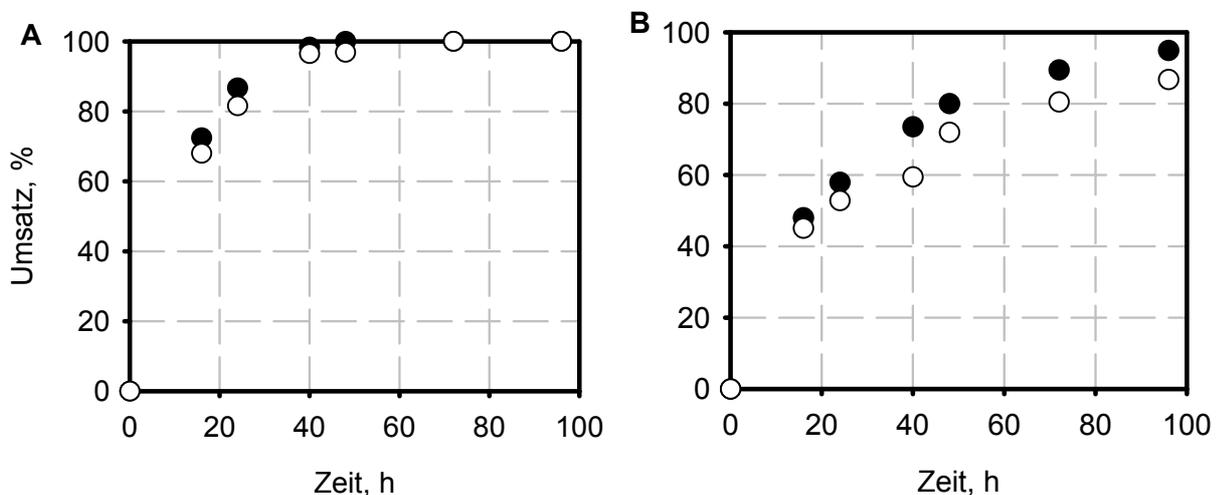


Abbildung 7.15: Vergleich von freien (●) und immobilisierten (○) Zellen in der Biotransformation von Cholsäure. Gezeigt ist der Umsatz über 96 h von 50 mM Cholsäure mit 125 mM 2-Oxoglutarat und 100 mM Diammoniumhydrogenphosphat (A), sowie von 100 mM Cholsäure mit 250 mM 2-Oxoglutarat und 100 mM Diammoniumhydrogenphosphat (B). Es wurden jeweils $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen beziehungsweise 360 g L^{-1} Immobilisat eingesetzt.

Der immobilisierte Biokatalysator ist damit in der Lage 50 mM Cholsäure in vergleichbarer Zeit wie freie Zellen umzusetzen. Beim Umsatz von 100 mM Cholsäure ist die Reaktionsgeschwindigkeit bei Verwendung des Immobilisats verlangsamt. Häufig kommt es bei immobi-

sierten Zellen zu Substrat- oder Produktinhibitionen (Carballeira *et al.*, 2009). Die verlangsamte Umsetzung kann zudem darauf zurückgeführt werden, dass beim Immobilisierungsprozess nicht quantifizierbare Zellverluste auftreten können. Dennoch konnte mittels Einsatz des Immobilisats eine Biofilmbildung vermieden werden.

7.5 Modellgestützte Prozessoptimierung des Satzverfahrens

In Abbildung 7.15 B konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung von 100 mM Cholsäure unter Verwendung des Ganzzellbiokatalysators *E. coli* BL21(DE3) *hdhA⁻ KanR⁺ pET22b(+)-12 α -hsdh pCOLA(mod)-sth* zu einem fast vollständigen Umsatz innerhalb von 96 h führte. Während den Ganzzellsteroidoxidationen wurde eine Substrat- und Kosubstrat-abhängige Zellaggregatbildung festgestellt, welche aber nicht zum Verlust der Biotransformationsleistung führte. Daher stellt die Aggregation weitestgehend ein verfahrenstechnisches Problem während der Durchführung und der Aufarbeitung dar. Wird dieses Problem im späteren Prozess beispielsweise durch ein geeignetes Reaktordesign und eine passende Aufarbeitungsstrategie vermindert, stellt ein Satzverfahren zur Synthese von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure die am einfachsten zu realisierende Biotransformationsstrategie dar. Aus diesem Grund sollte die Biotransformation im Satzverfahren zur Synthese von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure in Abhängigkeit der Kosubstrate optimiert werden, da 2-Oxoglutarat einen erheblichen Kostenanteil an den Zusätzen hat. In Abbildung 7.5 und Abbildung 7.11 konnte der signifikante Einfluss der Kosubstrate 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat gezeigt werden. Die Biokatalysatorkonzentration wurde als teuerste Komponente nach den Ergebnissen von Abbildung 7.12 bei einer Biotrockenmasse von $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ konstant gehalten, um anschließend den maximal möglichen Umsatz bei hoher Produktkonzentration aus der eingesetzten Biomasse zu erzielen. Hierzu sollte ein empirisches Modell basierend auf einem Polynomansatz 2. Ordnung genutzt werden, um den Einfluss der Variablen Cholsäure-, 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat-Konzentration auf den Umsatz im einfachen Satzverfahren zu beschreiben (Box & Wilson, 1951).

7.5.1 Modellierung mittels empirischen Polynomansatzes

Zur optimalen Versuchsplanung wurde basierend auf Vorversuchen (Kapitel A.2 und Tabelle 14.4) ein *Central Composite Designs* (CCD) verwendet. Hierzu wurden 15 Experimente im Dreifachansatz im 2 mL-Maßstab bei 25 °C, einer Rührerdrehzahl von 240 rpm und einer Prozesszeit von 96 h durchgeführt. Der Versuchsplan ist in Tabelle 7.3 dargestellt. Es kamen $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ des Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) *hdhA⁻ KanR⁺ pET22b(+)-12 α -hsdh*

pCOLA(mod)-*sth* zum Einsatz. Die mittels HPLC gemessenen Umsätze sind ebenfalls in Tabelle 7.3 eingetragen.

Tabelle 7.3: Experimente basierend auf einem Central Composite Design zur Analyse der Effekte von Cholsäure, 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat auf den Umsatz der Ganzzelloxidation von Cholsäure im Satzverfahren, sowie der Mittelwert mit Standardabweichung der gemessenen Umsätze nach 96 h im Dreifachansatz

Datenpunkt	Kodierte Variablen			Natürliche Variablen			Umsatz, %
	x_1	x_2	x_3	Cholsäure, mM	2-Oxoglutarat, mM	DAHP, mM	
1	-1	-1	-1	90	175	100	99,9 ± 0,1
2	-1	1	-1	90	375	100	99,4 ± 0,3
3	1	-1	-1	140	175	100	97,1 ± 1,0
4	1	1	-1	140	375	100	93,8 ± 1,8
5	-1	-1	1	90	175	180	99,4 ± 0,7
6	-1	1	1	90	375	180	99,4 ± 0,6
7	1	-1	1	140	175	180	98,1 ± 0,5
8	1	1	1	140	375	180	94,7 ± 0,9
9	0	0	$-\alpha$	115	275	73	98,8 ± 0,6
10	$-\alpha$	0	0	73	275	140	100,0 ± 0,0
11	0	0	α	115	275	207	99,1 ± n.v.
12	α	0	0	157	275	140	95,8 ± n.v.
13	0	$-\alpha$	0	115	107	140	97,0 ± n.v.
14	0	α	0	115	443	140	98,5 ± n.v.
15	0	0	0	115	275	140	98,9 ± n.v.

Die gewonnenen Daten wurden anschließend zur Identifikation der Parameter des Polynoms 2. Ordnung verwendet. Die Parameter des Modells (Gleichung 4.16) wurden mittels multipler linearer Regression aus den experimentellen Daten aus Tabelle 7.3 abgeleitet.

Dabei konnte ein Bestimmtheitsmass (R^2) von 0,85 erhalten werden. Jedoch lag das korrigierte Bestimmtheitsmass ($\overline{R^2}$) für das erstellte Modell bei 0,57. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Werten deutet unwichtige beziehungsweise insignifikante Parameter in der Antwortfunktion an (vgl. Montgomery, 2009). Der Signifikanzwert p (f-Test) des gesamten Modells wurde auf 0,116 bestimmt. Anschließend wurden drei Parameter aus Gleichung 4.16 mit hohen p -Werten entfernt: der quadratische Einfluss von Diammoniumhydrogenphosphat (0,85), die beiden Interaktionsterme der Konzentrationen von 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat (0,9) und von Cholsäure und Diammoniumhydrogenphosphat (0,55). Anschließend erfolgte eine erneute Identifikation der verbliebenen Modellparameter. Auf diese Weise konnte ein Modell mit einem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,831$ erhalten und das

korrigierte Bestimmtheitsmaß $\overline{R^2}$ auf 0,7 erhöht werden. Außerdem konnte durch die Modellrevision ein Signifikanzwert p für das gesamte Modell von 0,0091 erzielt werden.

Die identifizierten Parameter in Tabelle 7.4 deuten, wie zu erwarten, einen negativen Einfluss der Cholsäurekonzentrationen auf den zu erwartenden Umsatz innerhalb von 96 h Prozesszeit an. Des Weiteren ist der Interaktionsparameter β_{12} von Cholsäure und 2-Oxoglutarat im Vergleich zu den anderen Parametern hoch, so dass hier ein synergistischer Effekt vermutet werden kann. Als drittgrößter Parameter geht der quadratische Einfluss der 2-Oxoglutaratkonzentration ein.

Tabelle 7.4: Parameter β des Polynoms 2. Ordnung eines *Response Surface* Modells der Cholsäureoxidation im Ganzzellverfahren entsprechend Gleichung 4.16.

Koeffizient	Parameter
β_0	0,988
β_1	-0,016
β_2	-0,003
β_3	0,001
β_{12}	-0,008
β_{11}	-0,004
β_{22}	-0,005

Der Umsatz stellt bei einer Prozessoptimierung nicht die einzige Zielgröße dar, da das Modell die höchsten Umsätze für sehr kleine Substratkonzentrationen vorschlägt, weshalb die erreichte Produktkonzentration ebenfalls berücksichtigt werden muss. Die durch das Modell geschätzte Produktkonzentration kann aus dem Umsatz und der eingesetzten Substratmenge errechnet werden. Mit Hilfe des Modells können für jeden Datenpunkt sowohl Umsatz, als auch Produktkonzentration geschätzt werden. In Abbildung 7.16 ist der Umsatz (A) und die geschätzte Produktkonzentration (B) nach 96 h Prozesszeit in Abhängigkeit der 2-Oxoglutarat- und Cholsäurekonzentration bei fünf Diammoniumhydrogenphosphat-Konzentrationen dargestellt.

Wie zu erwarten, geht der Umsatz bei steigender Cholsäurekonzentration zurück. Hohe Umsätze werden zudem bei hohen 2-Oxoglutaratkonzentrationen vorhergesagt, wobei ein Optimum zwischen 300 – 400 mM zu erkennen ist. Bei Konzentrationen von 100 – 180 mM Diammoniumhydrogenphosphat scheint sich ein günstiger Bereich zu befinden. Eine hohe Produktkonzentration kann hingegen bei einer steigenden Cholsäurekonzentration bis 140 mM über den ganzen Kosubstrat-Konzentrationsbereich im Modellraum gefunden werden.

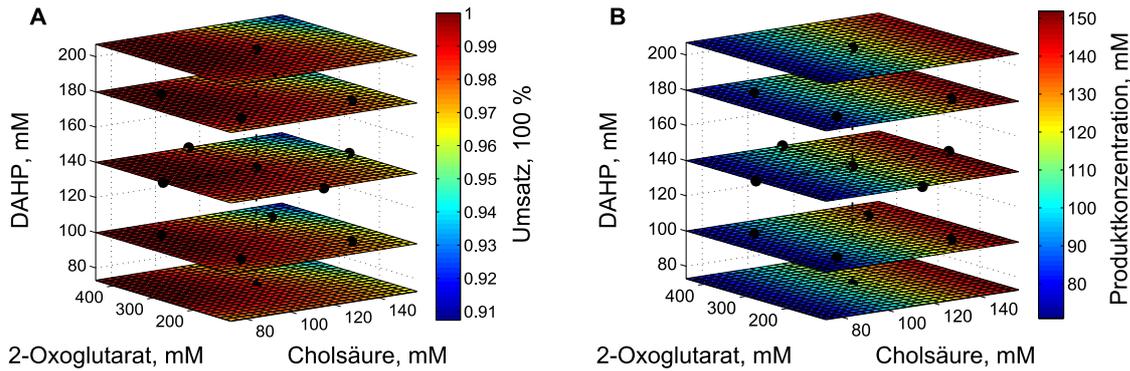


Abbildung 7.16: Modellierung der Ganzzelloxidation von Cholsäure mittels empirischen Polynomansatzes als Funktion der Cholsäure-, 2-Oxoglutarat- und Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP)-Konzentration. Zu sehen ist das Ergebnis der Vorhersage des Umsatzes (A) und der Produktkonzentration (B). Die zugrundeliegenden, experimentellen Datenpunkte des Versuchsdesigns sind gekennzeichnet (●).

7.5.2 Identifikation optimaler Betriebspunkte und Validierung des Modells

Für die Prozessoptimierung muss ein Mittelweg aus hoher Produktkonzentration und hohem Umsatz gefunden werden. Um das Pareto-Optimum des erstellten Modell aus Abbildung 7.16 möglichst genau zu ermitteln, wurde eine Mehrzieloptimierung mittels Genetischen Algorithmus durchgeführt. Hierfür wurde die Anzahl der Individuen pro Generation auf 45 festgelegt und nach 272 Generationen abgebrochen. Als Ergebnis wurden 15 Pareto-optimale Betriebspunkte mit Hilfe der Software Matlab (The Mathworks, Natwick, USA) ermittelt.

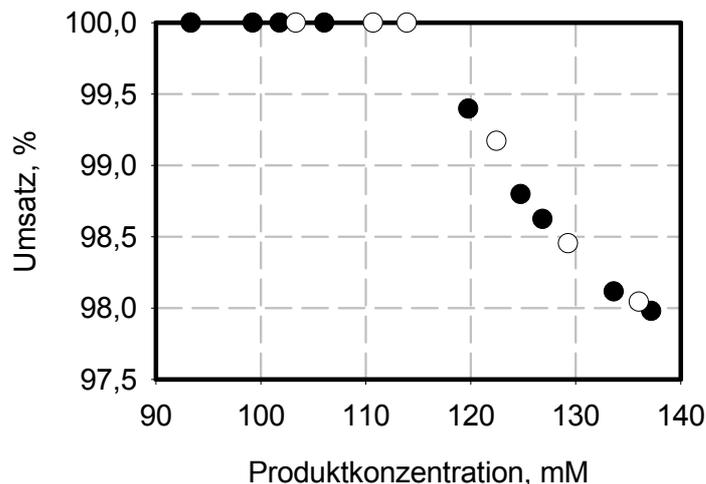


Abbildung 7.17: Pareto-optimale Betriebspunkte zur Maximierung von Umsatz und Produktkonzentration des Satzverfahrens zur Herstellung von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure mit ganzen Zellen. Die zur Validierung verwendeten Ansätze sind markiert (○).

Die Pareto-Front in Abbildung 7.16 und die dazugehörigen Ansätze in Tabelle 14.1 (Anhang) stellen den Umsatz in Abhängigkeit der Produktkonzentration dar. Es ergibt sich eine voll-

ständige Umsetzung der Cholsäure bis zu einer Produktkonzentration von 113,8 mM, bei höheren Konzentrationen werden leicht geringere Umsätze vorhergesagt. Zum Beispiel kann bei 122,4 mM Cholsäure noch ein Umsatz von 99 % erhalten werden. Die Synthese von 136 mM 12-Keto-Chenodesoxycholsäure ist bei einem Einsatz von 138,7 mM Cholsäure innerhalb von 96 h möglich. Um das Modell und die daraus abgeleiteten Ergebnisse zu bestätigen, wurden sechs Ansätze ausgewählt, um diese experimentell zu validieren.

Tabelle 7.5: Validierungsergebnisse ausgewählter Pareto-optimaler Betriebspunkte zur Ganzzellsteroidoxidation im Satzverfahren. Verglichen werden die experimentellen (exp.) Daten samt Standardabweichung mit den Vorhersagen des Modells; DAHP: Diammoniumhydrogenphosphat, 12-Keto-CDCS: 12-Keto-Chenodesoxycholsäure

Cholsäure, mM	2-Oxoglutarat, mM	DAHP, mM	Umsatz, exp., %	Umsatz, Modell, %	12-Keto-CDCS, exp., mM	12-Keto-CDCS, Modell, mM
101,6	283,3	169,7	100,0 ± 0,0	100,0	101,6 ± 0,0	101,6
110,0	279,1	170,6	100,0 ± 0,0	100,0	110,0 ± 0,0	110,0
113,8	278,9	166,2	100,0 ± 0,0	100,0	113,7 ± 0,0	113,8
123,5	271,9	171,2	99,8 ± 0,1	99,2	123,2 ± 0,1	122,4
131,3	265,1	146,5	99,6 ± 0,2	98,5	130,8 ± 0,2	129,3
138,7	263,4	140,2	99,6 ± 0,2	98,0	138,2 ± 0,2	136,0

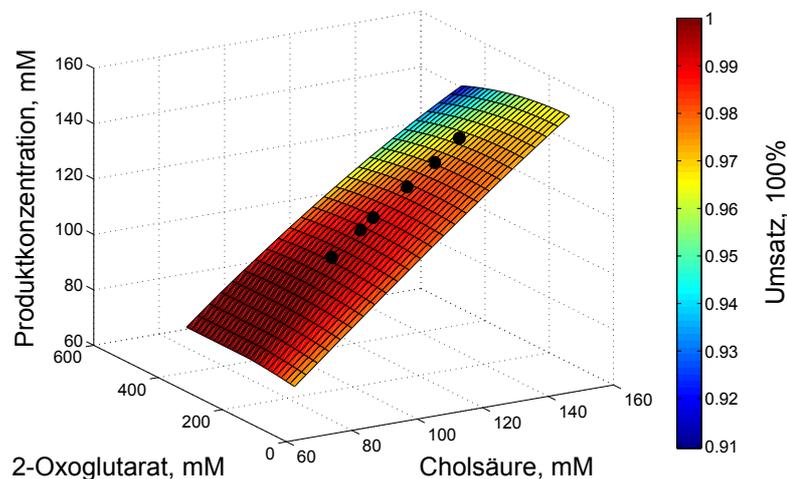


Abbildung 7.18: Modellierung der Produktkonzentration und des Umsatzes bei 140 mM Diammoniumhydrogenphosphat bei der Ganzzelloxidation von Cholsäure. Die Ergebnisse der Validierungsexperimente sind eingezeichnet (●).

In Abbildung 7.18 ist die mittels Modellvorhersage ermittelte Produktkonzentration und der errechnete Umsatz in Abhängigkeit der 2-Oxoglutarat- und Cholsäurekonzentration bei einer

konstanten Diammoniumhydrogenphosphat-Konzentration von 140 mM dargestellt. Die experimentellen Datenpunkte zur Validierung, welche in Tabelle 7.5 aufgeführt sind, sind mittels Punkte gekennzeichnet. Es ergibt sich eine gute Übereinstimmung des Modells mit den experimentellen Daten. Die Vorhersagen mit vollständigem Umsatz bis zu einer Cholsäurekonzentration von 113,8 mM konnten im Experiment ebenso bestätigt werden, wie der nahezu vollständige Umsatz bis zu einer Substratkonzentration von 138,7 mM.

7.5.3 Steroidoxidation im 200 mL- und 1000 mL-Maßstab

Da das Modell im Maßstab von 2 mL generiert wurde, sollte die Übertragbarkeit auf größere Volumina bestätigt werden. Hierzu wurde ein Pareto-optimaler Ansatz im 200 mL-Maßstab untersucht. Für diesen Zweck wurde die Biotransformation von 101,6 mM Cholsäure mit $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ des Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ *pET22b(+)-12 α -hsdh* *pCOLA(mod)-sth* über einen Prozesszeitraum von 96 h betrachtet. Die Reaktion wurde in einem Enghalskolben ($V = 500 \text{ mL}$) bei 25 °C und 300 rpm durchgeführt. Für die Biotransformation im 1000 mL-Ansatz wurde ein Weithals-Erlenmeyerkolben ($V = 3000 \text{ mL}$) eingesetzt. Die Verwendung von Kolben wurde bevorzugt, um mittels Oberflächen-Sauerstoffeintrag ein oxidatives Milieu im Reaktionsansatz aufrecht zu erhalten. Eine Begasung im Rührkesselreaktor war auf Grund der auftretenden Zellaggregation und der Biofilmbildung über den Begasungsöffnungen nicht möglich.

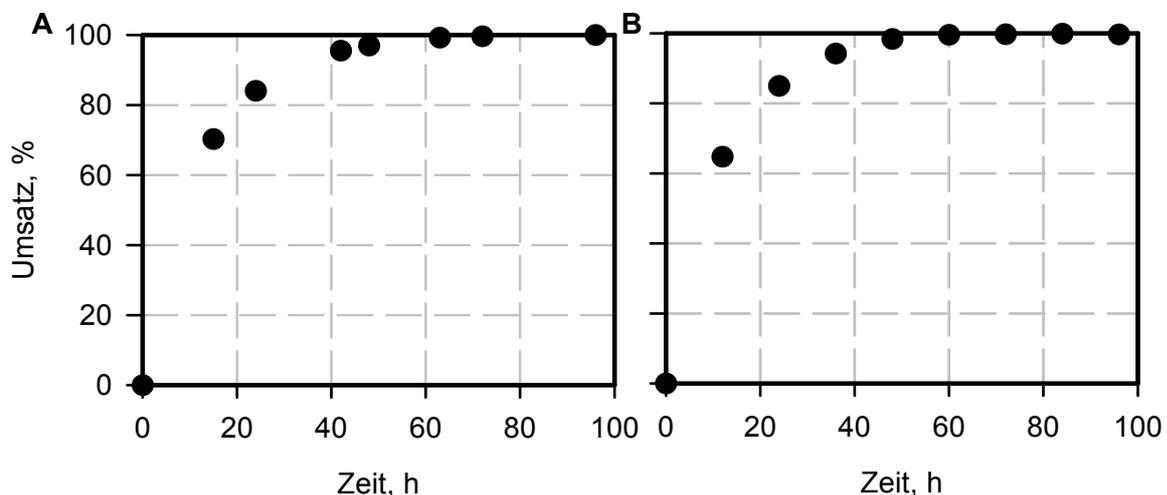


Abbildung 7.19: Ganzzell-Biotransformation von 101,6 mM Cholsäure im 200 mL-(A) und 1000 mL (B)-Satzverfahren. Gezeigt ist der Umsatz über 96 h Prozesszeit mit $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$, sowie 283 mM 2-Oxoglutarat und 169,7 mM Diammoniumhydrogenphosphat.

In Abbildung 7.19 A konnte für den ausgewählten Ansatz bestätigt werden, dass die Ergebnisse aus dem 2 mL-Maßstab auf größere Volumina übertragbar waren. Bereits nach 15 h waren 70 % der Cholsäure umgesetzt, nach 24 h konnten 84 % Umsatz erzielt werden. Inner-

halb der folgenden 18 h erreicht der Umsatz 95,5 %. Nach 48 h waren bereits über 97 % der Cholsäure zu 12-Keto-Chenodesoxycholsäure oxidiert. Es ist zu erkennen, dass die folgenden 48 h benötigt werden um die geringe Restmenge Cholsäure nahezu vollständig umzusetzen.

Übereinstimmende Ergebnisse wurden für die Biotransformation im Volumen von 1 L in Abbildung 7.19 B gefunden. Auch hier konnte, wie im 2 ml-Maßstab, ein vollständiger Umsatz in der 96 h Prozesszeit erreicht werden. Nach 24 h waren bereits 85 %, nach 48 h 98 % Umsatz erzielt worden.

7.6 Biotransformation mit modellbasiertem Substratzulaufverfahren

Während der Biotransformation von Cholsäure mit dem Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+ pET22b(+)-12\alpha-hsdh pCOLA(mod)-sth$ wurde in den Satzexperimenten eine Zellaggregation in Abhängigkeit der Substratkonzentration beobachtet, wie in Abbildung 7.13 und Tabelle 7.2 gezeigt wurde. Dabei wurde festgestellt, dass das Produkt 12-Keto-Chenodesoxycholsäure diesen Effekt deutlich weniger hervorruft. Da die Zellaggregation verfahrenstechnische Schwierigkeiten verursacht, sollte ein Zulaufverfahren untersucht und prozesstechnisch optimiert werden, um die Substratkonzentration während des Prozesses gering zu halten. Aus den vorangegangenen Experimenten, wie beispielhaft in Abbildung 7.13 zu erkennen, wurde eine kritische Cholsäurekonzentration von 20 mM beobachtet, unterhalb der keine oder eine verringerte Aggregatbildung induziert wurde.

7.6.1 Zulaufverfahren mit wiederholter Substratzugabe

Um die Machbarkeit eines Zulaufverfahrens zu untersuchen, wurde zunächst eine Biotransformation mit wiederholter Substratzugabe durchgeführt. Hierzu wurde eine Biotransformation mit $23,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen im 8 mL-Maßstab mit 12,5 mM Cholsäure angesetzt, wobei zu fortlaufenden Zeitpunkten jeweils 0,1 mmol Cholsäure zugegeben wurde. Hierzu wurde das Probenahmenvolumen von 500 μL durch die Substratzugabe ausgeglichen, so dass stets ein konstantes Volumen vorlag.

Abbildung 7.20 gibt den Verlauf der Cholsäure- und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration über die Prozesszeit wieder. Es ist zu erkennen, dass bis zum Zeitpunkt 148 h eine Umsetzung erfolgt und die Cholsäurekonzentration bis zum Prozessende unter 20 mM verbleibt. Die 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration steigt kontinuierlich an, wobei die höchste Produktkonzentration von 82,7 mM nach 148 h erreicht wurde. Anschließend ging

die 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration leicht zurück, wobei der Unterschied im experimentellen Fehlerbereich liegt. Es ist also davon auszugehen, dass nach 148 h kaum oder keine Biotransformationsaktivität mehr vorliegt. Dabei ist zu beachten, dass durch die Probenahme Biokatalysator aus dem System entnommen wurde, wodurch sich die Abnahme der Biotransformationsleistung teilweise erklären lässt.

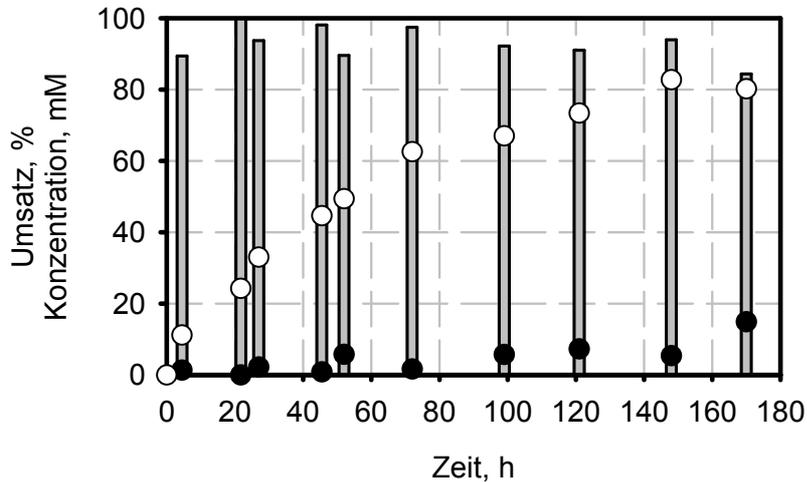


Abbildung 7.20: Ganzzellbiotransformation mit wiederholter Cholsäurezugabe. Zu Beginn und zu jedem Messzeitpunkt wurde 0,1 mmol Cholsäure zugegeben. Gezeigt ist der Umsatz (■), sowie die Cholsäure- (●) und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration (○) über 170 h mit 187,5 mM 2-Oxoglutarat, 93,75 mM Diammoniumhydrogenphosphat und 23,5 g_{BTM} L⁻¹ Biokatalysator (bezogen auf die Startbedingungen) bei 24 °C und 350 rpm im Reaktionsvolumen V = 8 mL.

Das Prozessverfahren mit intermittierender Zugabe von Cholsäure ist folglich prinzipiell in der Lage Biotransformationen mit beträchtlichen Umsätzen und hohen Produktkonzentrationen zu erzielen. Allerdings besitzt das Verfahren mit einer Prozesszeit von 170 h und einer Produktkonzentration von 80,2 - 82,7 mM bei Umsätzen um 90 % gegenüber dem optimierten Satzverfahren Optimierungspotential.

7.6.2 Parallelbetriebene Biotransformationen im Zulaufverfahren

Um den Substratzulauf für die Biotransformation von Cholsäure im Ganzzellverfahren zu optimieren, sollte das Zulaufverfahren zunächst mit Hilfe künstlicher, neuronaler Netzwerke (KNN) beschrieben und anschließend optimiert werden. Die Anwendung künstlicher, neuronaler Netzwerke bietet sich an, wenn kein oder nur ein geringes systematisches Wissen über den grundlegenden Mechanismus des betrachteten Problems existiert, wie beispielsweise detaillierte, kinetische Daten. Intrazellulär finden neben der betrachteten Oxidation von Cholsäure und der Kofaktorregeneration über die zelleigene Glutamatdehydrogenase viele

biochemische Prozesse statt, die sich auf die Aktivität der Enzyme und die Konzentrationen der Kofaktoren NAD(P)H auswirken können.

Zur experimentellen Datenerhebung wurde das Parallelbioreaktorsystem angewandt, wie in Kapitel 4.7.5 beschrieben. Dieses erlaubt die Einstellung reproduzierbarer Bedingungen in parallelen Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab, welche über eine Laborrobotereinheit beprobt und mit Flüssigkeiten beschickt werden können. Auf diese Weise konnten 16 parallelbetriebene Biotransformationen mit intermittierendem Zulauf durchgeführt werden, wobei durch ein geringes Zugabevolumen ein quasikontinuierlicher Zulauf realisiert werden kann. Die Prozessdauer wurde, analog zum optimierten Satzverfahren, auf 96 h festgelegt, wobei jeweils im 12-Stunden-Intervall ein Wechsel der Zulauftrate für jeden einzelnen Ansatz über die Steuersoftware eingestellt wurde. Die Beprobung erfolgte jeweils zu den Wechseln der Zulauftrate, wobei der Umsatz mittels HPLC analysiert und die Substrat- und Produktkonzentrationen daraus errechnet wurden.

Die generelle Einsetzbarkeit dieses Parallelreaktors zur Untersuchung der Biotransformation im Zulaufverfahren wurde in Vorversuchen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Basierend auf den Vorversuchen wurde eine Biokatalysatorkonzentration von $23,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$, bezogen auf das Endvolumen nach 96 h, gewählt. Des Weiteren wurden die Startbedingungen auf 20 mM Cholsäure, 50 mM 2-Oxoglutarat und 150 mM Diammoniumhydrogenphosphat eingestellt. Der Zulauf enthielt 250 mM Cholsäure und 625 mM 2-Oxoglutarat. Außerdem war aus den Vorversuchen ersichtlich, dass fallende Zulaufraten mit fortschreitender Prozesszeit für einen hohen Umsatz vorteilhaft sind, weshalb diese vorzugsweise verwendet wurden.

Es wurden 16 Biotransformationen im Zulaufverfahren zur Datenerhebung für eine spätere Modellierung durchgeführt. Die manuell vorgegebenen Zulaufprofile im 12 h-Intervall sind in Abbildung 7.21 über die Prozesszeit dargestellt. Dabei kamen hauptsächlich Zulaufprofile zum Einsatz, bei denen der Volumenstrom mit zunehmender Zeit abnahm. Auf diese Weise sollten genug Trainingsdaten für die Parameteridentifikation des eingesetzten künstlichen, neuronalen Netzwerks erhoben werden. Die Experimente wurden so ausgelegt, dass am Ende bei vollständigem Umsatz eine Produktkonzentration von bis zu 120 mM erreicht werden könnte.

Die Produkt- und Substratkonzentrationen der 16 Biotransformationen sind in Abbildung 7.22 und Abbildung 7.23 zu erkennen. Abgesehen von der Negativkontrolle in Ansatz 1 konnten im Zulaufverfahren hohe Umsätze von bis zu 99,7 % und Produktkonzentrationen von bis zu 111,1 mM erzielt werden. In fünf Reaktionsansätzen wurde die kritische Cholsäurekonzentration zur Aggregatbildung von 20 mM mindestens einmal überschritten.

In der Tendenz zeigen die Prozesse innerhalb der ersten 12 h bis 24 h eine gegenüber der Ausgangskonzentration von 20 mM verringerte Cholsäurekonzentration, was daraufhin deutet,

dass der Biokatalysator in der Anfangsphase besonders aktiv ist. Die Produktkonzentration stieg bei sämtlichen Prozessen bis zum Ende hin an, so dass innerhalb der Prozesszeit von 96 h ein aktiver Biokatalysator vorlag.

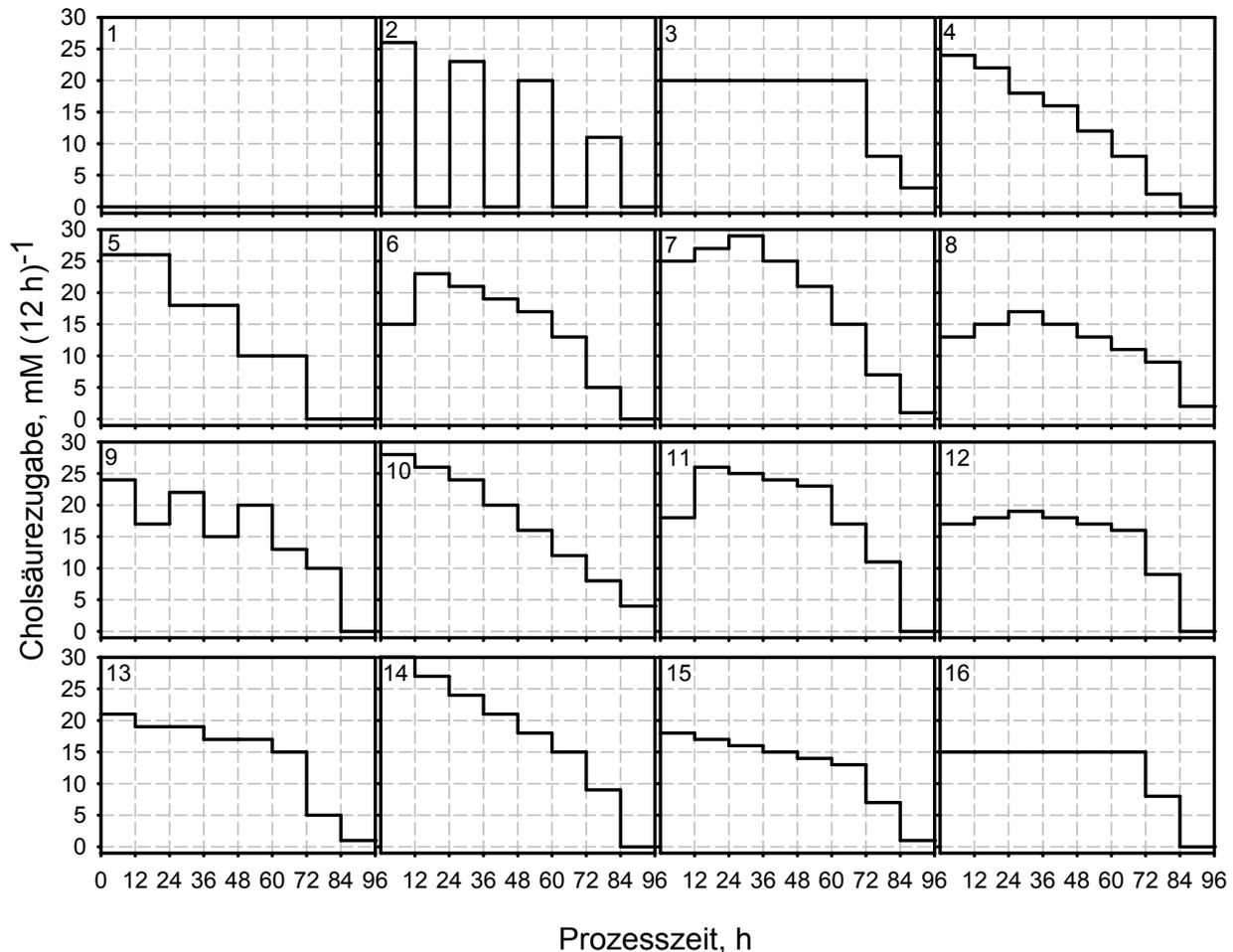


Abbildung 7.21: Manuell vorgegebene Zulaufprofile von 16 parallelbetriebenen Biotransformationen zur Generierung von Trainingsdaten für die Parameteridentifikation des eingesetzten künstlichen, neuronalen Netzes im mL-Maßstab. Zu sehen ist die Cholsäure-Konzentrationserhöhung in mM innerhalb von 12 h-Intervallen durch den Zulauf über 96 h Prozesszeit, jeweils bezogen auf das vorliegende Reaktionsvolumen.

In Prozess 13 konnte neben einem Umsatz von 99,4 % eine hohe Produktkonzentration von 102 mM erhalten werden. Daher soll dieses Zulaufverfahren im Folgenden exemplarisch beschrieben werden. Der Zulauf wird mit zunehmender Prozesszeit von 21 mM (12 h)⁻¹ auf 1 mM (12 h)⁻¹ reduziert, wobei im vorletzten Intervall die Zulauftrate stark vermindert wurde. Im letzten Intervall wurde die Substratkonzentration kaum erhöht. Innerhalb des ersten 12 h-Intervalls wurden 36,5 mM Cholsäure zu 12-Keto-Chenodesoxycholsäure oxidiert, was einem Umsatz von 95,5 % entspricht. Während der folgenden 60 h akkumulierte Cholsäure bis zu einer Konzentration von 9 mM im Reaktionsmedium, obwohl die Zulaufraten bis zum diesem Zeitpunkt bereits reduziert wurden. Die anschließend starke Verminderung der Zulaufraten

bewirkte eine Cholsäurekonzentration von 0,66 mM zum Prozessende. Die Produktbildungsrate im ersten Intervall betrug $3,03 \text{ mM h}^{-1}$, in Intervall 4 noch $0,82 \text{ mM h}^{-1}$ und im letzten Intervall reduzierte sie sich auf $0,36 \text{ mM h}^{-1}$. Ursachen für die Abnahme der Produktbildungsrate könnten sein: zunehmende Inaktivierung des Biokatalysators, die Reduzierung der zugegebenen Cholsäure, hohe Produktkonzentrationen und / oder verbrauchte Kosubstrate.

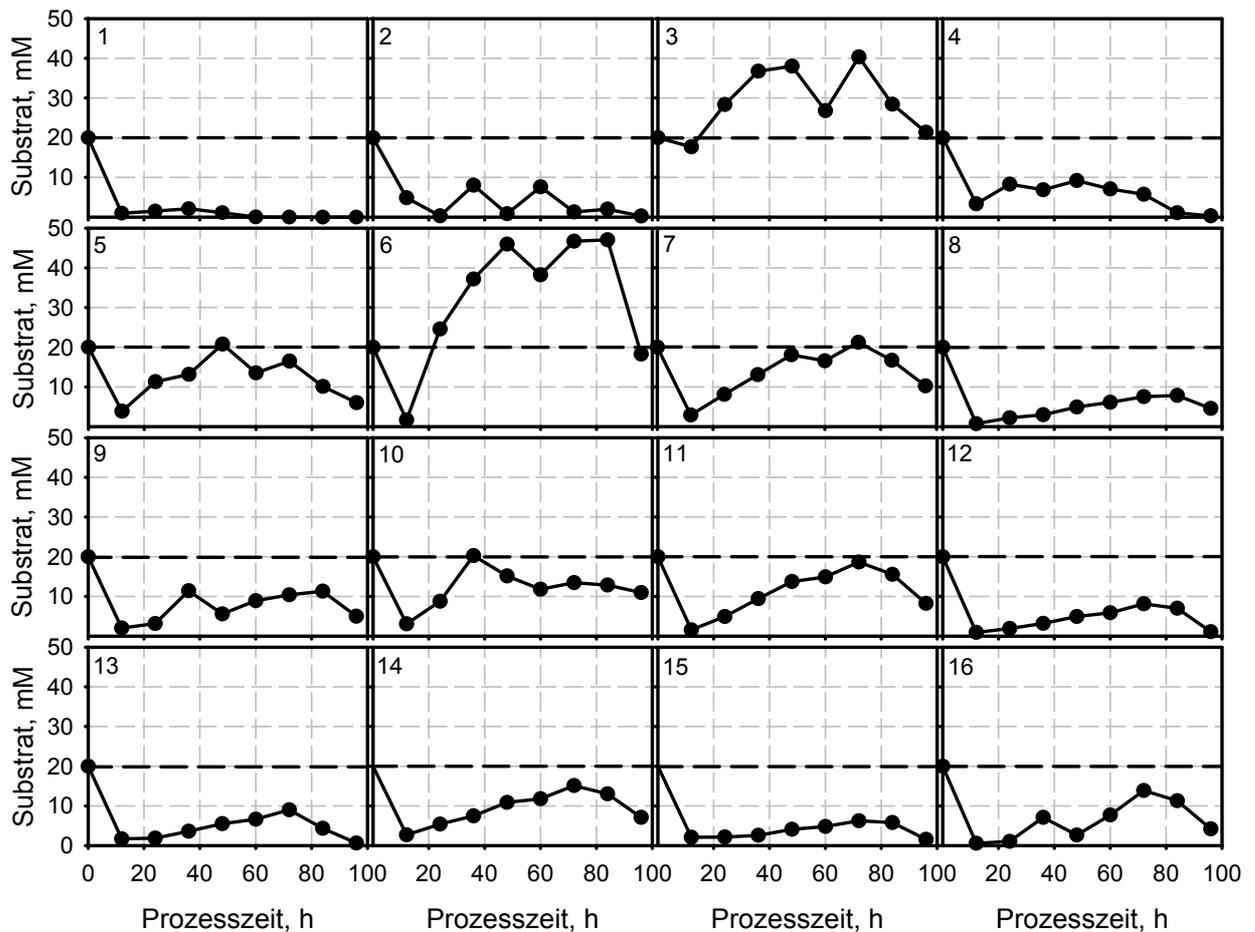


Abbildung 7.22: Verlauf der Substratkonzentration der parallelbetriebenen Biotransformationen im Zulaufverfahren. Die Biotransformationen wurden mit 20 mM Cholsäure, 50 mM 2-Oxoglutarat und 150 mM Diammoniumhydrogenphosphat gestartet. Die Biokatalysatorkonzentration wurde auf $23,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ bezogen auf das Endvolumen eingestellt. Es wurden die Zulaufprofile aus Abbildung 7.21 angewandt. Die für die Zellaggregation kritische Cholsäurekonzentration von 20 mM ist gekennzeichnet.

In Prozess 7 hingegen konnten 110,9 mM 12-Keto-Chenodesoxycholsäure synthetisiert werden, wobei jedoch nur ein Umsatz von 91,5 % erhalten wurde. Im Vergleich zu Ansatz 13 konnten hier im ersten Zeitintervall 38,2 mM Cholsäure, bedingt durch einen höheren Zulauf, umgesetzt werden, wobei 2,9 mM Cholsäure verblieben. Während der folgenden fünf Intervalle stieg die Substratkonzentration im Medium auf 21,2 mM an, so dass die gewünschte Maxi-

malkonzentration von 20 mM leicht überschritten wurde. Bis zum Prozessende verblieben trotz abfallendem Zulaufprofil noch 10,2 mM im Reaktionsansatz. Daher scheint es auch für die anfänglichen Zulaufdaten optimale Werte im untersuchten Versuchsraum zu geben. Die Produktbildungsdaten von Ansatz 7 waren durchgehend höher als in Ansatz 13, wobei der Umsatz während und zum Prozessende nicht den Zielwerten entspricht.

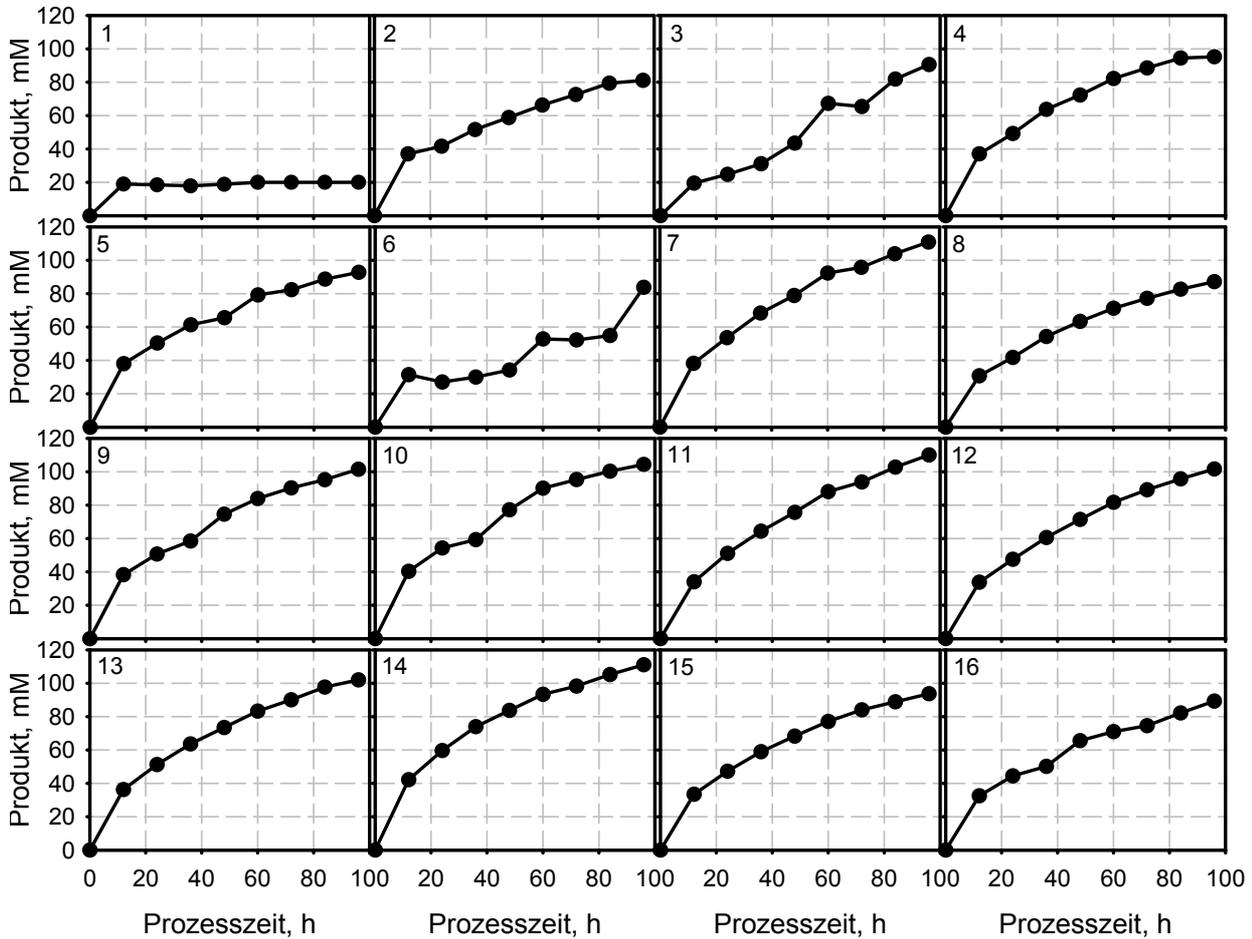


Abbildung 7.23: Verlauf der Produktkonzentration der parallelbetriebenen Biotransformationen im Zulaufverfahren. Die Biotransformationen wurden mit 20 mM Cholsäure, 50 mM 2-Oxoglutarat und 150 mM Diammoniumhydrogenphosphat gestartet. Die Biokatalysatorkonzentration wurde auf $23,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ bezogen auf das Endvolumen eingestellt. Es wurden die Zulaufprofile aus Abbildung 7.21 angewandt.

7.6.3 Erstellung eines Prozessmodells des Zulaufverfahrens mittels künstlichen neuronalen Netzwerks

Zur Modellierung des Zulaufverfahrens wurde dasselbe künstliche neuronale Netzwerk mit den zu jedem Zeitintervall erhaltenen Daten aus Kapitel 7.6.2 trainiert. Da die Prozesszeit als Eingabegröße eingeht, kann jedes Zeitintervall unabhängig beschrieben werden. Das künstli-

che neuronale Netz verfügt, wie in Abbildung 7.24 dargestellt, über fünf Eingabeneuronen: Cholsäure- und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration, konstante Zulauf rate während eines 12 h-Intervalls und Prozesszeit zu Beginn des Intervalls, sowie Reaktionsvolumen zu Beginn des Intervalls. Über die Berücksichtigung der Prozesszeit soll der Inaktivierung des Biokatalysators über die Zeit Rechnung getragen werden. Der Verringerung der Biokatalysatorkonzentration durch das Zulaufvolumen wird mittels Eingabe des Reaktionsvolumens berücksichtigt. Auf diese Weise können vom künstlichen neuronalen Netzwerk sämtliche prozessrelevanten Veränderungen über die Zeit beachtet werden.

Die Eingabeneuronen sind mit vier Neuronen in der versteckten Schicht verknüpft, deren Anzahl sich in Vorversuchen als günstig erwiesen hat. Diese sind wiederum mit zwei Ausgabeneuronen verknüpft, welche die Ausgangsgrößen der geschätzten Cholsäure- und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration am Ende des betrachteten 12 h-Intervalls wiedergeben. Das Training des Netzwerks erfolgte, wie in Kapitel 4.10.1 beschrieben, mittels *Backpropagation* und Levenberg-Marquardt-Lernalgorithmus. Die 16 untersuchten Biotransformationen mit je acht Zeitintervallen ergeben 128 Trainingsdatensätze.

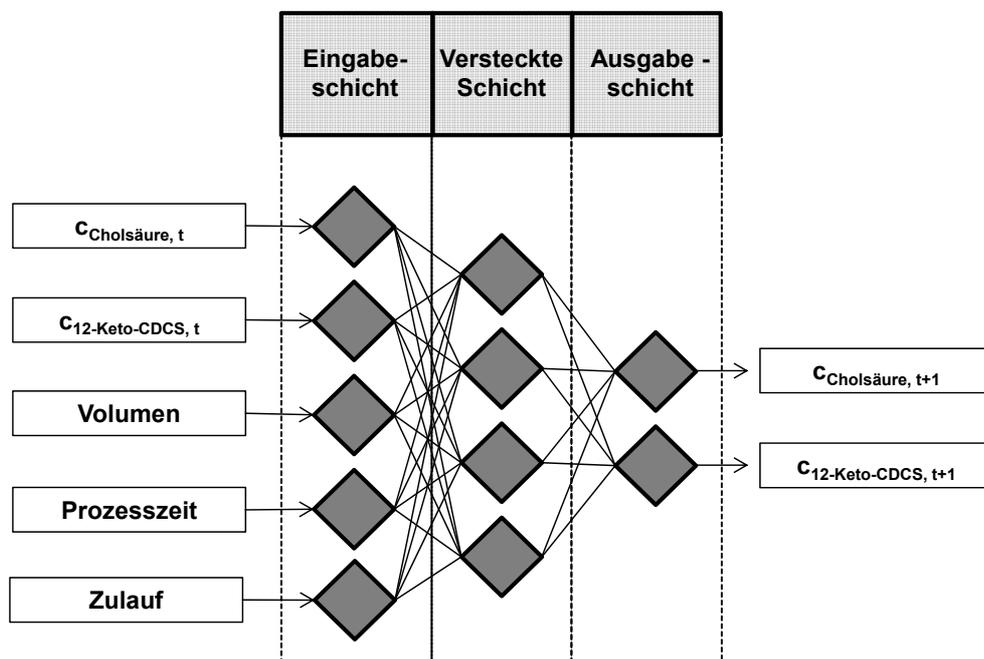


Abbildung 7.24: Künstliches neuronales Netz zur Modellierung der Biotransformation im Zulaufverfahren. Die fünf Prozessgrößen Cholsäurekonzentration, die 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration, das Volumen und die Prozesszeit zu Beginn jedes 12 h-Intervalls und die Zulauf rate im jeweiligen 12 h-Intervall gehen als fünf Eingabeneuronen ein. In der versteckten Schicht sind vier Neuronen verknüpft. Die zwei Ausgabeneuronen geben die Konzentrationen für Substrat und Produkt zum Ende des 12 h-Intervalls aus.

Für das Prozessmodell des Zulaufverfahrens wurde das trainierte Einzelnetzwerk achtmal konsekutiv für jedes Intervall angewandt, wie es in Abbildung 7.25 schematisch aufgeführt ist. Dabei werden die Ausgaben des vorgeschalteten, künstlichen neuronalen Netzes als Eingabegröße des folgenden verwendet. Das Reaktionsvolumen zum Zeitpunkt t ($V_{\text{Ansatz}, t}$) errechnet sich aus dem im vorigen Intervall zugegebenen Zulaufvolumens und des vorangegangenen Ansatzvolumens. Der Prozess kann nun in Abhängigkeit des Zulaufprofils beschrieben werden, da die Produkt- und Substratkonzentration ebenso wie die Prozesszeit und das Reaktionsvolumen modellintern be- und verrechnet werden.

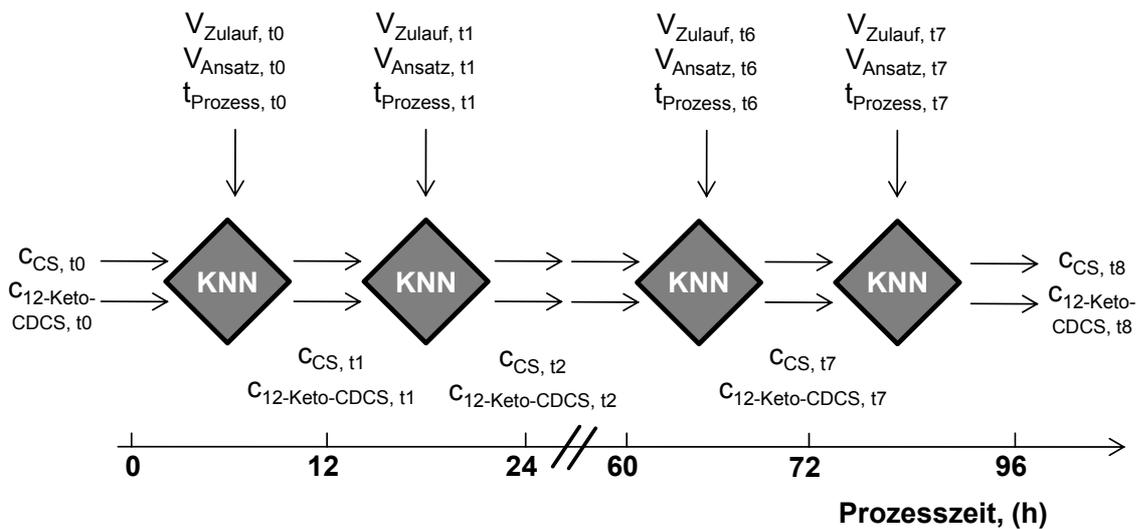


Abbildung 7.25: Konsekutives, künstliches neuronales Netz-basiertes Modell der Biotransformation im Zulaufverfahren. Jedes künstliche neuronale Netz aus Abbildung 7.24 wird achtmal konsekutiv durchlaufen. Dabei schätzt jedes künstliche neuronale Netz die Substrat- und Produkt-Konzentrationen am Ende eines Zeitintervalls, welche als neue Eingabegrößen des folgenden künstlichen neuronalen Netzes dienen. Jeweils gehen noch die Zulaufrate $V_{\text{Zulauf}, t}$, das Reaktionsvolumen $V_{\text{Ansatz}, t}$, sowie die Prozesszeit $t_{\text{Prozess}, t}$ ein. Die vom Modell geschätzten Endkonzentrationen von Cholsäure und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure werden vom letzten künstlichen neuronalen Netz ausgegeben.

Das künstliche neuronale Netzwerk aus Abbildung 7.24 wurde mit den experimentellen Datensätzen unter Verwendung der Software Matlab (The Mathworks, Natwick, USA) trainiert. Hierbei dienen 70 % der Daten zum Training, 15 % für die interne Validierung und 15 % zum Test des Modells. Da eine interne Validierung durchgeführt wurde, welche in Abbildung 7.26 A zu sehen ist, konnte festgestellt werden, dass die Ansätze 3 und 6 ungewöhnlich niedrige Umsätze aufwiesen. Dies könnte auf einem Ausfall des Rührorgans während der Biotransformation beruhen, wenn dieses durch Zellaggregation in dessen Beweglichkeit eingeschränkt wurde. Aus diesem Grund wurden diese beiden Prozessverläufe in einem zweiten Training

nicht berücksichtigt, wodurch eine verbesserte Modellierung mit Hilfe eines künstlichen neuronalen Netzwerks möglich wurde, wie in Abbildung 7.26 B ersichtlich ist.

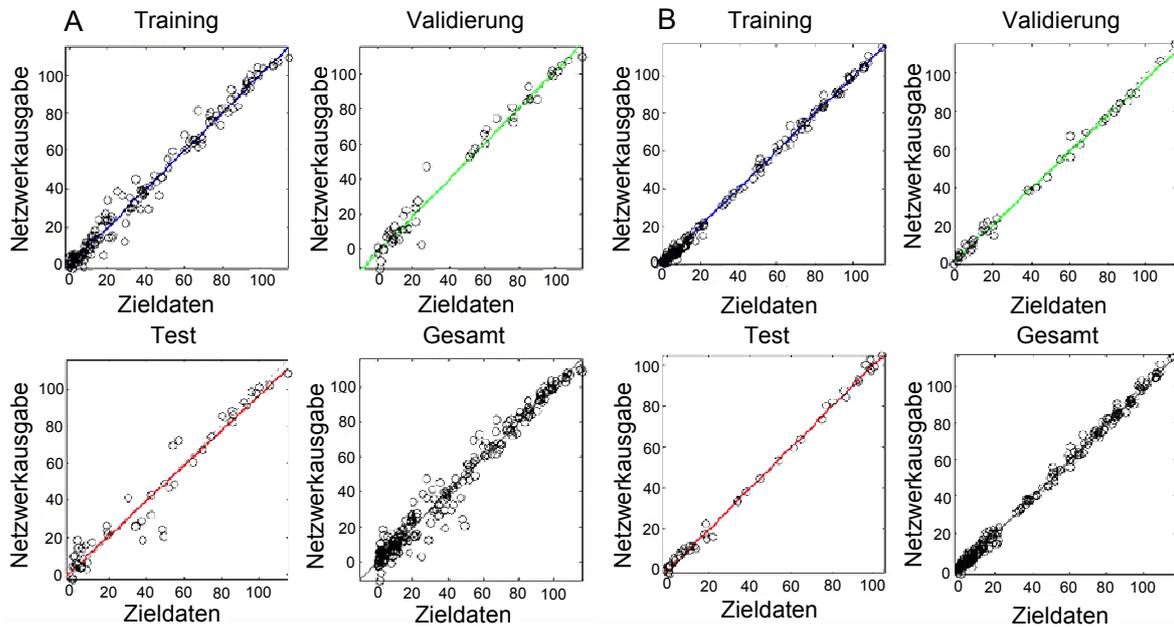


Abbildung 7.26: Training des künstlichen neuronalen Netzes und Darstellung des Vergleichs von Ziel- und vorhergesagten Netzwerkausgaben. Zu sehen sind die Ergebnisse von Training, Validierung und Test des künstlichen neuronalen Netzes von 16 Zulaufexperimenten (A), beziehungsweise 14 Zulaufexperimenten unter Vernachlässigung von Ansatz 3 und 6 (B).

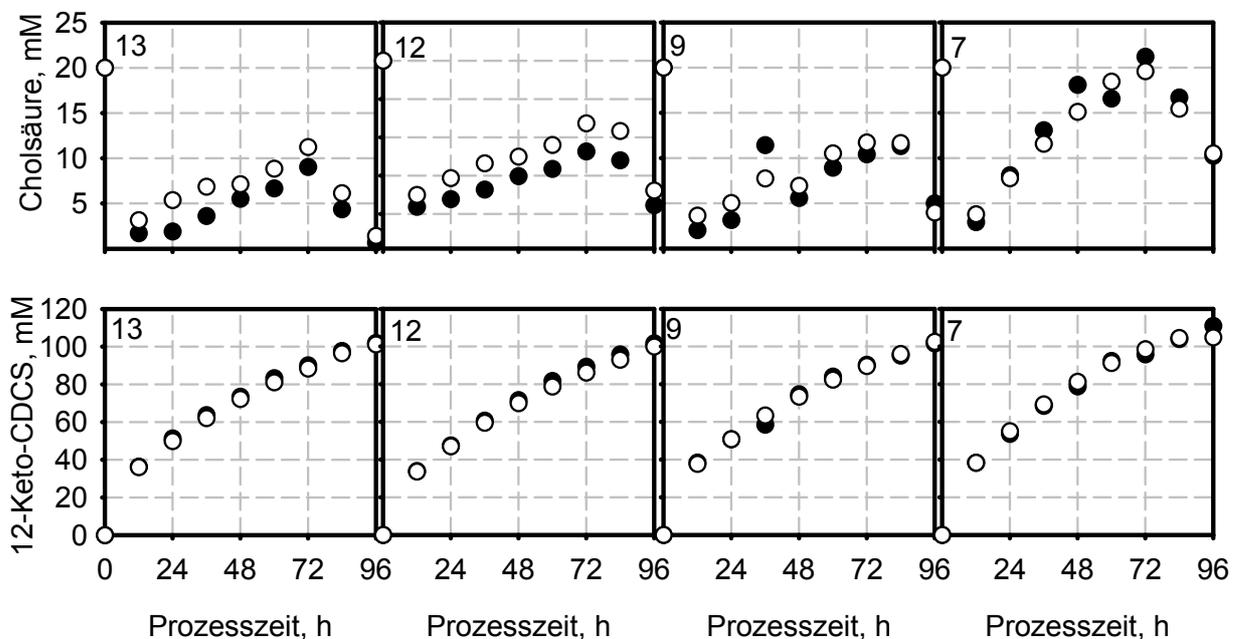


Abbildung 7.27: Vergleich der experimentellen Daten mit den Schätzungen des künstlichen neuronalen Netzes der Biotransformation im Zulaufverfahren. Gezeigt sind die gemessenen (●) und geschätzte (○) Konzentration von Cholsäure- und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure in den Ansätzen 13, 12, 9 und 7 zu jedem Zeitintervall. Die Biotransformationen wurden mit 20 mM Cholsäure, 50 mM 2-Oxoglutarat und 150 mM Diammoniumhydrogenphosphat gestartet. Die Biokatalysatorkonzentration wurde auf 23,5 gBTM L-1 bezogen auf das Endvolumen eingestellt.

Abbildung 7.27 vergleicht die geschätzten Produkt- und Substrat-Konzentrationen mit den experimentellen Daten für vier repräsentative Beispiele. Die Konzentrationen der Trainingsdatensätze konnten mit dem künstlichen neuronalen Netzwerk gut beschrieben werden. Die mittlere quadratische Abweichung betrug $2,48 \text{ mM}^2$ für die Cholsäure- und $2,34 \text{ mM}^2$ für die 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration. Daraus kann geschlossen werden, dass das identifizierte, künstliche neuronale Netz zur Simulation der Biotransformation im Zulaufverfahren geeignet ist.

7.6.4 Optimierung und Validierung

Das identifizierte künstliche neuronale Netz wurde genutzt, um eine Prozessoptimierung mit Hilfe eines Genetischen Algorithmus vorzunehmen. Das Ziel der Optimierung war die Maximierung von Produktkonzentration und Umsatz nach 96 Stunden mittels Variation der konstanten Zulaufvolumenströme in den acht Dosierintervallen von jeweils 12 h. Als weitere Randbedingung wurde ein Maximalwert von 20 mM Cholsäure am Ende jedes Zeitintervalls zur Vermeidung von Zellaggregation hinzugefügt. Der Genetische Algorithmus variierte hierzu die Zulaufvolumenströme in den acht Zeitintervallen zwischen $0 - 83,3 \text{ } \mu\text{L h}^{-1}$. Es wurde eine Populationsgröße von 150 Individuen (parallelen Simulationen) vorgegeben und insgesamt wurden 247 Generationen durchgeführt.

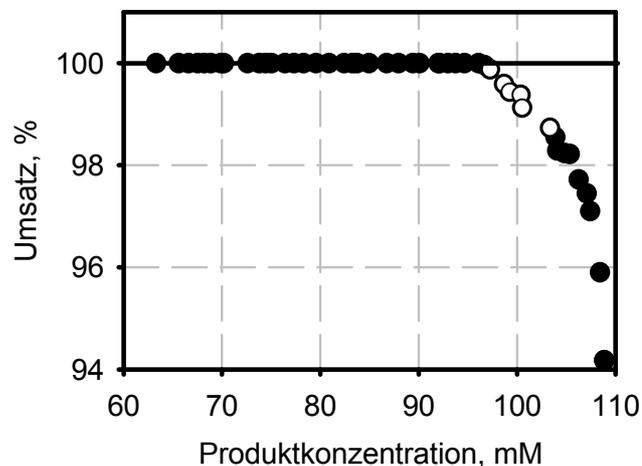


Abbildung 7.28: Pareto-optimale Datensätze der simulierten Zulaufverfahren. Gezeigt sind die geschätzte Produktkonzentration in Abhängigkeit des zu erwartenden Umsatzes (●), sowie die zur Validierung verwendeten Daten (○).

Die erhaltenen Pareto-optimalen Datensätze zählte 48 Individuen, welche in Abbildung 7.28 dargestellt sind. Geschätzte Umsätze von über 100 % werden im Folgenden als 100 % gewertet. Es ist zu erkennen, dass vollständige Umsätze bis zu einer Produktkonzentration von 95 mM mittels Zulaufverfahren erreicht werden können. Bei einem Umsatz von 98 % können

zwischen 105 – 106 mM 12-Keto-Chenodesoxycholsäure unter Vermeidung einer Obergrenze von 20 mM Cholsäure nach jedem Zeitintervall erhalten werden.

Aus den Pareto-optimalen Datensätzen wurden sechs Prozesse zur experimentellen Validierung ausgewählt. Die Zulaufprofile wurden im Parallelbioreaktorsystem untersucht (siehe Abbildung 7.29). Bei sämtlichen Zulaufprofilen fällt auf, dass zunächst mit hohen Zulaufraten in den beiden ersten Intervallen begonnen und im dritten Intervall vermindert wird. Die auffälligste Unterscheidung zwischen den Profilen findet sich im fünften Intervall. Des Weiteren sind sehr geringe Zulaufraten am Prozessende notwendig, um einen hohen Umsatz zu erhalten.

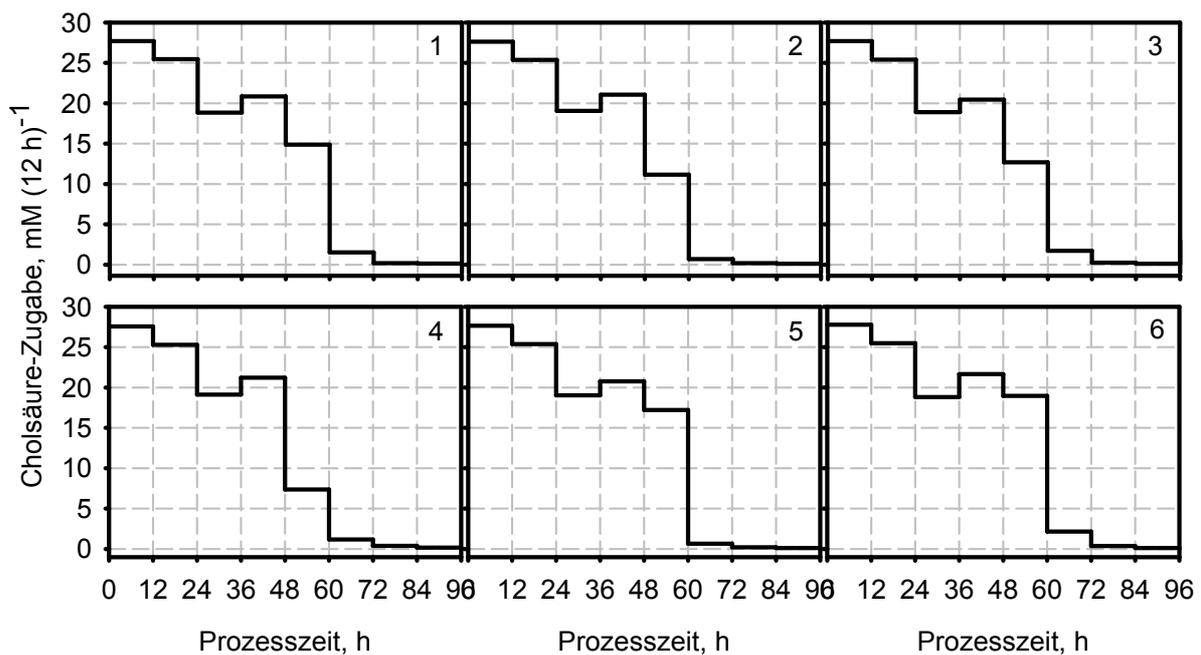


Abbildung 7.29: Ausgewählte Zulaufprofile aus der Pareto-optimalen Lösung zur Validierung.

Die sechs Zulaufprofile wurden experimentell validiert. In Abbildung 7.30 zeigt sich eine gute Übereinstimmung der geschätzten Produktkonzentrationen mit den gemessenen Produktkonzentrationen. 20 mM Cholsäure wurde nur leicht überschritten. Es ist zu erkennen, dass sich die 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration besser als die Cholsäurekonzentration abschätzen lässt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das erstellte künstliche neuronale Netz-basierte Modell zur dynamischen Simulation der Biotransformation im Zulaufverfahren geeignet ist.

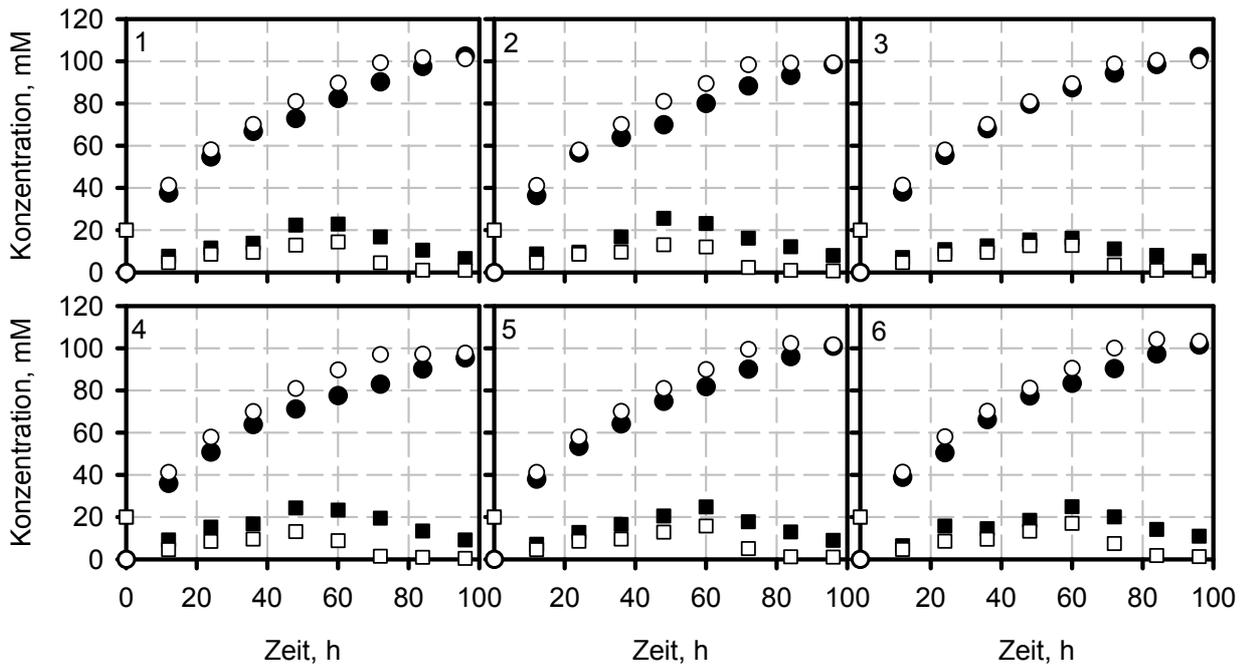


Abbildung 7.30: Substrat- und Produktkonzentration der sechs aus den Pareto-optimalen Prozessen ausgewählten Biotransformationen im Zulaufverfahren. Gezeigt sind die gemessene (●) und geschätzte (○) 12-Keto-Chenodesoxycholsäure-Konzentration, sowie die gemessene (■) und geschätzte (□) Cholsäurekonzentration im Parallelbioreaktor. Die Biotransformationen wurden mit 20 mM Cholsäure, 50 mM 2-Oxoglutarat und 150 mM Diammoniumhydrogenphosphat gestartet. Die Biokatalysatorkonzentration wurde auf $23,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ bezogen auf das Endvolumen eingestellt.

7.6.5 Steroidoxidation im 200 mL-Maßstab

Ein ausgewähltes Zulaufverfahren aus den Pareto-optimalen Prozessen wurde anschließend im 200 mL-Ansatz durchgeführt, um die Skalierbarkeit zu überprüfen. Hierzu wurde das Zulaufprofil aus Ansatz 4 (Abbildung 7.29) ausgewählt. Es wurden 20 mM Cholsäure, sowie 50 mM 2-Oxoglutarat und 150 mM Diammoniumhydrogenphosphat bei einer Biotrockenmasse von zu Beginn $33,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ *pET22b(+)-12 α -hsdh* *pCOLA(mod)-sth* eingesetzt, was einer finalen Biotrockenmasse von $23,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ entspricht. Der kontinuierliche Zulauf wurde mit einer kalibrierten Pumpe realisiert, die Wechsel der Zulaufraten in 12 h-Intervallen wurden durch die Software Iris-NT Pro Version 4.11 (Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz) gesteuert. Der Prozess wurde bei 25 °C und 300 rpm in einem Enghalskolben ($V = 500 \text{ mL}$) durchgeführt.

In Abbildung 7.31 ist das Zulaufverfahren im 200 mL-Maßstab in zwei Durchführungen verglichen. In Experiment A wurde ein Ausfall der Pumpe von ca. 4 h im Zeitintervall 36 – 48 h festgestellt, weshalb eine leicht geringere Gesamtkonzentration von Substrat und Produkt zu erwarten sein dürfte. Aus diesem Grund wurde das Experiment mit länger gelagerten Zellen wiederholt (B).

Abbildung 7.31 A und B zeigt die erfolgreiche Maßstabsübertragung des ausgewählten Zulaufverfahrens in den 200 mL-Maßstab. In Ansatz A konnte nach 96 h ein Umsatz von 96,7 % erreicht werden. Vom Modell wurde für diesen Zeitpunkt ein Umsatz von 98,9 % geschätzt, so dass nur eine geringe Abweichung von Modellschätzung und Experiment zu beobachten ist. Des Weiteren wurde zu keinem Zeitpunkt die kritische Cholsäurekonzentration von 20 mM überschritten. Die höchste Cholsäurekonzentration wurde in Intervall 5 bestimmt, die sich in den folgenden 36 h verringerte. Während der Biotransformation wurde daher keine Zellaggregation festgestellt.

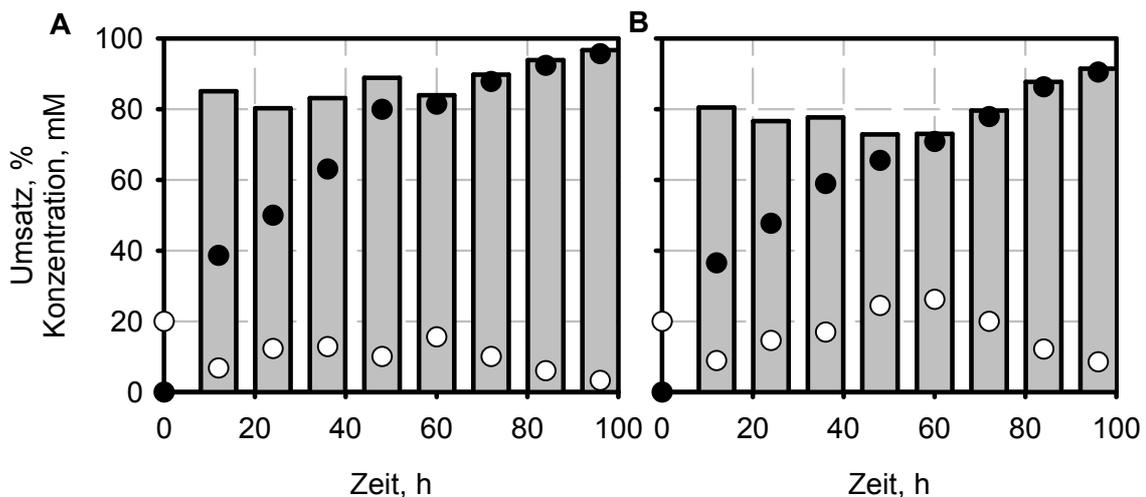


Abbildung 7.31: Steroidoxidation im 200 mL-Zulaufverfahren mit modelloptimierten Zulaufprofil im Doppelansatz A und B. Es wurde das Profil von Ansatz 4 (Abbildung 7.29) verwendet. Gezeigt ist der gemessene Umsatz (■), sowie die Konzentrationen von Cholsäure (○) und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure (●). Die Biotransformation wurde mit 20 mM Cholsäure, 50 mM 2-Oxoglutarat und 150 mM Diammoniumhydrogenphosphat gestartet. Die Biokatalysatorkonzentration wurde auf $23,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ bezogen auf das Endvolumen eingestellt.

In Experiment B zeigen die Substrat- und Produktverläufe ein ähnliches Verhalten, wobei sich hier in der Tendenz jeweils leicht geringere Umsätze feststellen ließen. Dies könnte durch die längere Lagerungsdauer des eingesetzten Biokatalysators begründet sein. Dennoch überschritt die Cholsäurekonzentration nur kurzzeitig die 20 mM-Grenze, so dass auch in diesem Prozess keine Aggregation beobachtet wurde. Zum Prozessende verblieben weniger als 9 mM Cholsäure im Ansatz. Auch hier kann im Rahmen der experimentellen Varianz beim Einsatz von ganzen Zellen von einer zufriedenstellenden Übertragung der modellbasierten Optimierung ausgegangen werden.

Damit konnte das Zulaufverfahren mit wiederholter Substratzugabe aus Abbildung 7.20 modellbasiert erweitert und optimiert werden. Die Prozesszeit wurde von 170 auf 96 h reduziert. Außerdem konnte der Umsatz von 84,3 % der eingesetzten 95,1 mM Cholsäure nach 170 h mit dem modellgestützten Verfahren deutlich verbessert werden.

7.7 Diskussion

In der Literatur sind nur wenige Möglichkeiten zur Regeneration von NADP^+ beschrieben (Kroutil *et al.*, 2004a). Zur Oxidation von Cholsäure im Ganzzellverfahren wurde daher in Durchmusterungsversuchen der Vorteil einer heterologen, löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase untersucht und in verschiedenen Experimenten bestätigt. Es ist daher davon auszugehen, dass die lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase das günstige intrazelluläre Verhältnis von NAD^+ zu NADH nutzt und in geeigneter Weise Reduktionsäquivalente zwischen dem intrazellulären $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ -Pool und $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$ -Pool zur Oxidation von Cholsäure transferiert. Lengeler *et al.* (1999) beschreiben ein Verhältnis von $[\text{NADH}] : [\text{NAD}^+] + [\text{NADH}] \approx 0,05$, der vom Zellmetabolismus aufrecht erhalten wird. Unter Hungerbedingungen, wie es bei der vorliegenden Biotransformation der Fall ist, sinkt außerdem die anabole Reduktionskraft (Verhältnis $[\text{NADPH}]$ zu $[\text{NADP}^+] + [\text{NADPH}]$) bei *E. coli* (Andersen & von Meyenburg, 1977). Die *E. coli*-Zellen können womöglich von dem in der Oxidation von Cholsäure erzeugten NADPH profitieren und es zur Energiegewinnung nutzen. Dadurch könnte die Reaktion vorangetrieben werden.

Ebenfalls führten die Kosubstrate der Glutamatdehydrogenase 2-Oxoglutarat und Ammonium zu besseren Umsätzen. Die Aktivität der zelleigenen Glutamatdehydrogenase reichte dabei offensichtlich aus, um den oxidierten Kofaktor für die Biotransformation zu regenerieren. Anhand der Ergebnisse aus Kapitel 7.1.4 lässt sich das Regenerationssystem in Abbildung 7.32 darstellen.

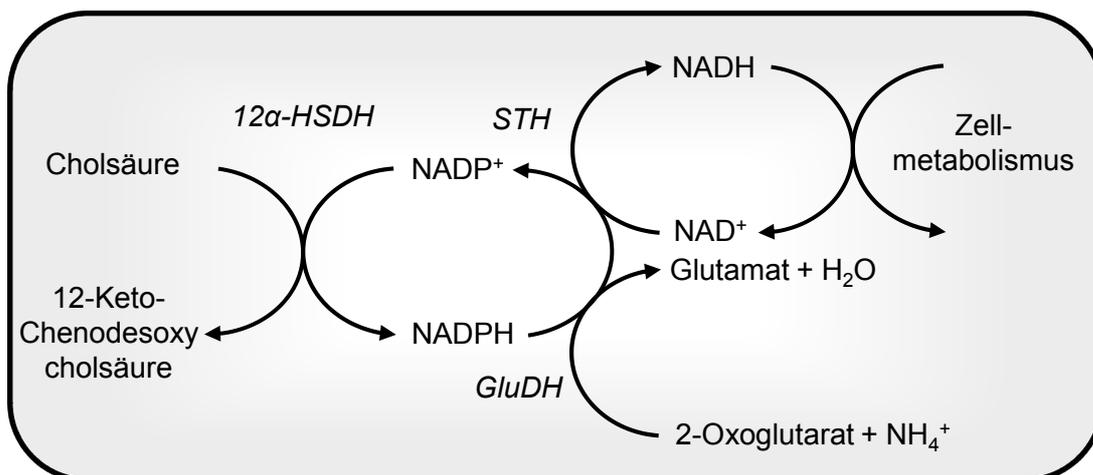


Abbildung 7.32: Cholsäureoxidation und Kofaktorregenerierung im entwickelten *E. coli*-Stamm. Cholsäure wird mit einer $12\alpha\text{-HSDH}$ zu 12-Keto-Chenodesoxycholsäure umgesetzt. NADP^+ wird anschließend mit einer Glutamatdehydrogenase (GluDH) und einer löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase (STH) regeneriert. Die lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase transferiert Reduktionsäquivalente zwischen $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ und $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$. Eine hohe NAD^+ -Konzentration wird vom Zellmetabolismus aufrecht erhalten.

Die Verringerung der Umsatzleistung durch die Zugabe von Glucose kann mit dem Primärstoffwechsel von *E. coli* erklärt werden. Glucose wird über die Glycolyse metabolisiert, wodurch ATP, aber auch 2 Moleküle NADH erzeugt werden. Der bei aeroben Verhältnissen nachfolgende Tricarbonsäurezyklus wiederum erzeugt weiteres NADH. Über den Pentosephosphatweg werden aus einem Molekül Glucose zwei Moleküle NADPH generiert (Berg *et al.*, 2003), welche sich negativ auf das Gleichgewicht der Cholsäureoxidation auswirken.

Es wurden drei Verfahren unter Anwendung des Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁺ *KanR*⁺ *pET22b(+)-12 α -hsdh* *pCOLA(mod)-sth* vorgestellt, nachdem das Gen einer 7 α -HSDH ausgeschaltet wurde, um eine unerwünschte Nebenproduktbildung zu vermeiden. Abhängig von den industriellen Ansprüchen kann zwischen einem Satzfahren mit freien Zellen, einem Satzverfahren mit immobilisierten Zellen und einem Substratzulaufverfahren gewählt werden.

Die Ergebnisse im Satzverfahren zeigen, dass der erstellte Stamm in der Ganzzellbiokatalyse erfolgreich zur Oxidation von Cholsäure eingesetzt werden kann. Während das zellfreie Verfahren von Fossati *et al.* (2006) 92 % Umsatz von 100 mM Cholsäure erlaubt, konnten im Ganzzellverfahren mit Hilfe des identifizierten Polynoms 2. Ordnung 113,8 mM Cholsäure vollständig und 138,7 mM Cholsäure zu 99 % umgesetzt werden, wobei eine längere Prozesszeit die verbliebende Substratmenge vermutlich weiter reduzieren dürfte. Ein hoher Umsatz ist deshalb wichtig, weil Restmengen an Cholsäure die weiteren Syntheseschritte zu Ursodesoxycholsäure erschweren. Carrea *et al.* (1985) konnten innerhalb von vier Tagen 98 mM Cholsäure vollständig umsetzen. Zwar wurde dabei eine verhältnismäßig geringe 12 α -HSDH-Menge eingesetzt, jedoch muss bei diesem zellfreien Verfahren eine teure Glutamatdehydrogenase aus *Proteus* sp. zusätzlich zu dem teuren Kofaktor NADP⁺, zugesetzt werden. Der Glutamatdehydrogenase-Preis für 1 kg Produkt beträgt hierbei über 4400 € (ohne MwSt., Sigma Aldrich, Stand: 21.02.2011). Des Weiteren erzeugen die Isolation und die anschließende Immobilisierung der 12 α -HSDH und Glutamatdehydrogenase weitere Kosten.

Insgesamt konnte mit dem vorgestellten Verfahren eine Steigerung der erreichten Produktkonzentration von über 16 % bei vollständigem Umsatz (113,8 mM) beziehungsweise von sogar 42 % bei einem Umsatz von über 99 % (138,7 mM) gegenüber den literaturbekannten Prozessen erreicht werden (Carrea *et al.*, 1985; Fossati *et al.*, 2006).

Das Anwendungsspektrum des Parallelbioreaktorsystem konnte in geeigneter Weise zur Datengenerierung für eine Identifikation eines künstlichen neuronalen Netzes, mit dem ein Zulaufverfahren simuliert werden konnte, erweitert werden. Nach Optimierung des Zulaufverfahrens konnte im Vergleich zum einfachen Satzverfahren zwar eine geringere Raum-Zeit-Ausbeute erzielt werden, jedoch konnte die Zellaggregation erfolgreich verhindert werden. Ein abschließender Vergleich der vorgestellten Verfahren erfolgt in Kapitel 9.1.

8 Asymmetrische Steroidreduktion mittels ganzer Zellen

Als alternativen Biokatalyseprozess zur Synthese von Ursodesoxycholsäure kann Cholsäure zunächst an C-3, C-7 und C-12 des Steroidgerüsts chemisch oxidiert werden, wodurch Dehydrocholsäure entsteht. Anschließend müssen die Ketogruppen in Position 7 in β -Konfiguration und in Position 3 in α -Konfiguration reduziert werden. Im Anschluss wird die Ketogruppe in Position 12 mittels Wolff-Kishner-Reduktion entfernt, wodurch die Ursodesoxycholsäure entsteht. Dieses Verfahren erspart gegenüber dem Verfahren ausgehend von Cholsäure und einer 12α -HSDH-Oxidation eine Epimerisierung an C-7, welche chemisch nur schwer zu realisieren ist.

Für die beiden asymmetrischen Reduktionen an C-3 und C-7 können Hydroxysteroiddehydrogenasen eingesetzt werden. Für letztere Position liegt seit kurzem erstmals ein rekombinantes Enzym vor (Liu *et al.*, 2011). Es sollte daher zunächst ein neuer Ganzzellprozess unter Verwendung der 7β -HSDH etabliert werden, um 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure zu synthetisieren. Anschließend sollte eine zusätzliche 3α -HSDH aus *Comamonas testosteroni* (Oppermann & Maser, 1996) in den Stamm eingebracht werden, um die Machbarkeit einer zweistufigen Biotransformation in einem Prozessschritt zu untersuchen.

8.1 Stammentwicklung und Wachstumsversuche

8.1.1 Wachstumsversuche

Bei der Wahl eines geeigneten Organismus wurde auf den bereits beschriebenen Knockout-Stamm *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^-$ $KanR^+$ zurückgegriffen. Um die Einflüsse von Dehydrocholsäure und Formiat auf diesen Stamm zu untersuchen, wurden Wachstumsversuche in Anwesenheit beider Substanzen durchgeführt, da in der Biokatalyse im Satzverfahren gegebenenfalls hohe Konzentrationen beider Substrate eingesetzt werden könnten. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 0 – 100 mM Dehydrocholsäure und von 0 – 1000 mM Formiat untersucht. Die Versuche wurden wiederholt und vergleichbare Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt).

Bei der Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^-$ $KanR^+$ konnte keine Wachstumsinhibierung bis 50 mM Dehydrocholsäure festgestellt werden (siehe Abbildung 8.1), wohingegen 100 mM Dehydrocholsäure zu einer verringerten Wachstumsrate führte. Es fällt auf, dass die Zellen bei Inkubation geringer Dehydrocholsäure-Mengen innerhalb der ersten 8 h schneller wachsen als in reinem LB-Medium. Die Zellkonzentrationen gegen Ende des Versuchs waren mit Ausnahme von 100 mM Dehydrocholsäure vergleichbar. Eine Verstoffwechslung des Gallensalzes konnte vernachlässigt werden (Nachweis mit HPLC). Das verbesserte Wachstum kann womöglich mit veränderten Puffereigenschaften und einer höheren Ionenstärke erklärt werden. Beim Vergleich des Wachstums von *E. coli* BL21(DE3) in Anwesenheit von Cholsäure zeigt sich, dass Dehydrocholsäure einen weniger schädlichen Effekt auf das Wachstum ausübt (siehe Abbildung 7.1).

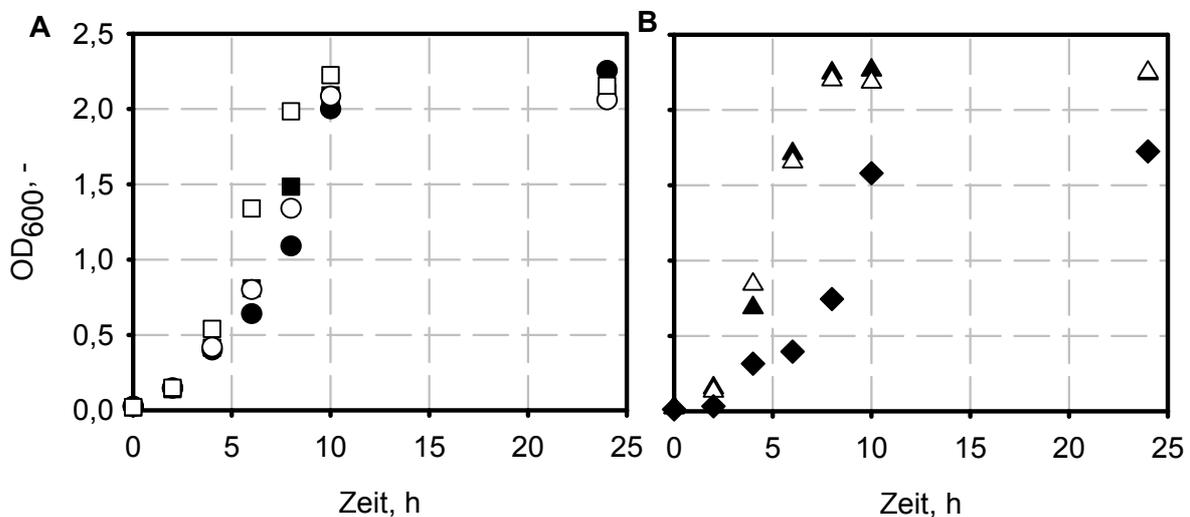


Abbildung 8.1: Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^-$ $KanR^+$ in Anwesenheit von niedrigen (A) und hohen (B) Dehydrocholsäurekonzentrationen. Gezeigt sind OD_{600} im Satzexperiment mit LB-Medium von *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^-$ $KanR^+$ in Anwesenheit von 0 mM (●), 1 mM (○), 5 mM (■) und 10 mM (□), sowie 25 mM (▲), 50 mM (△) und 100 mM (◆) Dehydrocholsäure bei 37 °C.

In Abbildung 8.2 ist zu erkennen, dass 0 - 100 mM Formiat keinen negativen Effekt auf das Wachstum zeigten. Ab einer Konzentration von 300 mM war das Wachstum jedoch eingeschränkt, bei 1000 mM wurde kein Wachstum mehr beobachtet. Es ist daher davon auszugehen, dass bis 100 mM keine zellschädigenden Eigenschaften von Formiat zu erwarten sind. Auch höhere Konzentrationen müssen hingegen kein zwangsläufiges Hindernis für einen Einsatz als Ganzzellbiokatalysator darstellen, da diese als ruhende Zellen verwendet werden sollen.

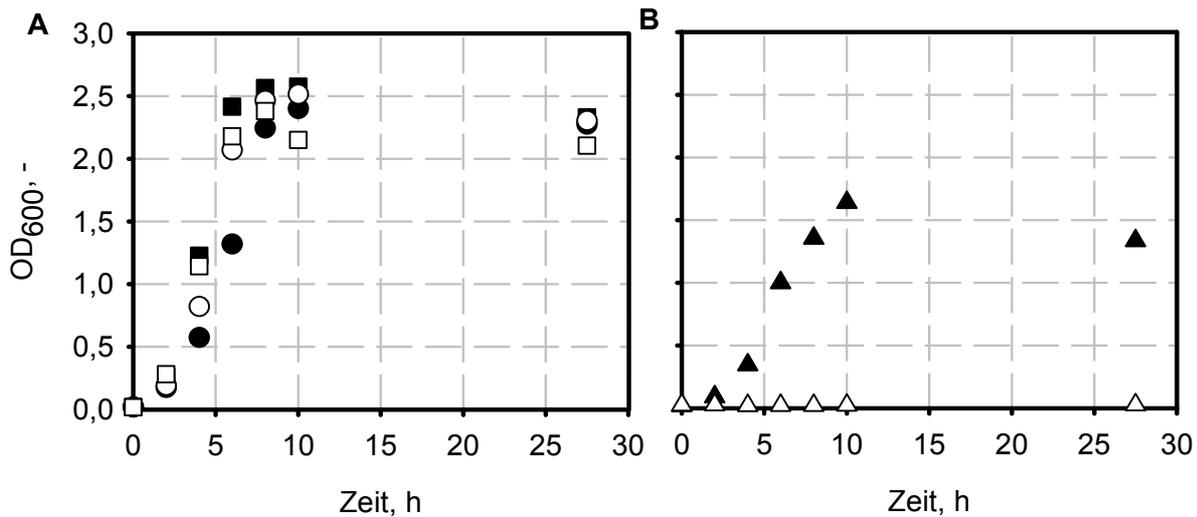


Abbildung 8.2: Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+$ in Anwesenheit von niedrigen (A) und hohen (B) Formiatkonzentrationen. Gezeigt sind OD_{600} im Satzexperiment mit LB-Medium von *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+$ in Anwesenheit von 0 mM (●), 10 mM (○), 30 mM (■) und 100 mM (□), sowie 300 mM (▲) und 1000 mM (△) Formiat bei 37 °C.

8.1.2 Vektorkonstrukte

Für die Reduktion von Dehydrocholsäure im einstufigen Verfahren zur 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure, beziehungsweise im zweistufigen Verfahren zur 12-Keto-Ursodesoxycholsäure, wurden mittels Klonierung folgende Vektorkonstrukte erstellt:

- **pET21a(+)- fdh_{D221G} -7 β - $hsdh$** : In den bestehenden Vektor pET21a(+)- fdh_{D221G} wurde die Gensequenz der 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* nachgeschaltet von der FDH_{D221G} einkloniert. Hierzu musste im Ausgangsvektor am 5'-Ende ein Stoppcodon eingebracht werden (s. Abschnitt 4.2.2). Während die Originalsequenz aus Lys-Lys-Ala-Val-Stopp besteht, wurde im vorliegenden Konstrukt der C-terminale Valinrest durch einen Alaninrest ausgetauscht, sowie drei weitere Aminosäuren angehängt, wodurch folgender C-Terminus erhalten wurde: Lys-Lys-Ala-Ala-Gly-Asn-Ser-Stopp. Zusätzlich wurde für eine bessere Translation der 7 β -HSDH eine ribosomale Bindestelle (RBS) zwischen die Gensequenzen der FDH_{D221G} und 7 β -HSDH eingefügt. Die Amplifikation der Sequenz 7 β - $hsdh$ wurde mit den Oligonukleotiden 7 β _fwd_EcoRI und S_7 β _rev_HindIII und die Klonierung über die Schnittstellen EcoRI und HindIII durchgeführt.
- **pET22b(+)-7 β - $hsdh$ - fdh_{D221G}** : Bei diesem pET-Vektor wurde die Gensequenz der FDH_{D221G} umgekehrt zum oben genannten Vektor bicistronisch einkloniert. Durch die unterschiedliche Anordnung zweier identischer Gene wurde eine veränderte Expressionsstärke erwartet. Es wurde ebenfalls eine zusätzliche Ribosomale Bindestelle eingeführt.

- **pCOLA(mod)-7 β -*hsdh***: In den zum pET-System kompatiblen Vektor pCOLA(mod) wurde die Gensequenz der 7 β -HSDH in die *multiple cloning sites* 1 über *Nco*I und *Hind*III einkloniert.
- **pCOLA(mod)-3 α -*hsdh***: Für die zweistufige Biotransformation von Dehydrocholsäure zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure muss zusätzlich zu den Sequenzen der 7 β -HSDH und FDH_{D221G} eine 3 α -HSDH einkloniert werden. Hierzu wurde das Gen der 3 α -HSDH aus dem Vektor pET22b(+)-3 α -*hsdh* mittels *Nde*I und *Bln*I geschnitten und über dieselben Schnittstellen in die *multiple cloning sites* 2 des Vektors pCOLA(mod) einkloniert. Nach Sequenzierung des Vektors wurde eine stille Mutation an Position 45 der DNA-Sequenz von Guanin zu Cytosin beobachtet.

8.2 Prozessentwicklung

8.2.1 Formiatkonzentration

Zur Bewertung der Machbarkeit der Reduktion von Dehydrocholsäure im Ganzzellsystem mit rekombinanter 7 β -HSDH wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ pET21a(+)-*fdh*_{D221G}-7 β -*hsdh*, wie in Abschnitt 4.6.1 beschrieben, hergestellt, wobei die Umdrehungszahl des Schüttelinkubators während der Expression bei 250 rpm verblieb.

Für die Durchmusterungsversuche wurde der 2 mL-Maßstab im Einfachansatz bei pH 8,0 und einer Zelldichte von 4,6 g_{BTM} L⁻¹ gewählt, wobei fünf verschiedene Substratkonzentrationen von 1 – 60 mM untersucht wurden. Zusätzlich wurde jeweils die 0,3-, 1- oder 3-fache Konzentration an Formiat zugegeben. Des Weiteren wurde ein Luftaustausch mit der Umgebung bei Raumtemperatur ermöglicht. Die Beprobung erfolgte nach 64 h.

Wie zu erwarten zeigten Änderungen sowohl in der Substrat- als auch Kosubstratkonzentration Auswirkungen auf den gezeigten Umsatz (siehe Abbildung 8.3). Bei sämtlichen Ansätzen führte eine höhere Formiatkonzentration zu höheren Umsätzen. Betrachtet man die Umsätze bei verschiedenen Dehydrocholsäurekonzentrationen mit 0,3-facher Konzentration an Formiat, zeigte sich wie zu erwarten ein Trend von geringerer Umsetzung bei höherer Substratkonzentration. Bei Betrachtung der Umsätze unter Zugabe der dreifachen Menge an Formiat fällt auf, dass der höchste Umsatz bei 10 mM Dehydrocholsäure erreicht wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Kosubstrat bei 1 und 3 mM Dehydrocholsäure vorzeitig verbraucht war, da jeweils die Formiatkonzentration relativ zur Dehydrocholsäure zugegeben wurde.

Die Ergebnisse aus Abbildung 8.3 zeigen klar, dass der erzeugte Stamm in der Lage ist, Dehydrocholsäure umzusetzen. Die unterschiedlichen Umsätze bei verschiedenen

Kosubstratkonzentrationen verdeutlichen, dass die Kofaktorregenerierung mit der rekombinanten FDH_{D221G} gelingt. Aus diesem Grund sollte der Einfluss der Kosubstratkonzentration hinsichtlich maximal möglicher Umsätze eingehender untersucht werden. Basierend auf den Ergebnissen von Abbildung 8.3 wurde eine Dehydrocholsäurekonzentration von 10 mM mit Formiatkonzentrationen zwischen 10 und 100 mM im Dreifachansatz untersucht. Die Beprobung erfolgt nach 64 h.

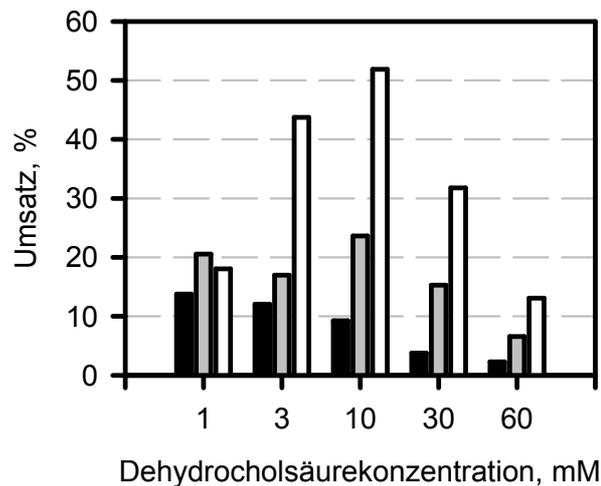


Abbildung 8.3: Durchmusterung der Dehydrocholsäure-Reduktion bei verschiedenen Substrat- und Kosubstratkonzentrationen. Gezeigt sind die Umsätze nach 64 h bei Raumtemperatur von $4,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- \text{ KanR}^+ \text{ pET21a(+)-fdh}_{D221G}\text{-}7\beta\text{-hsdh}$ bei verschiedenen Dehydrocholsäurekonzentrationen, sowie der 0,3-fachen (■), 1-fachen (▒) und 3-fachen (□) Formiatkonzentration.

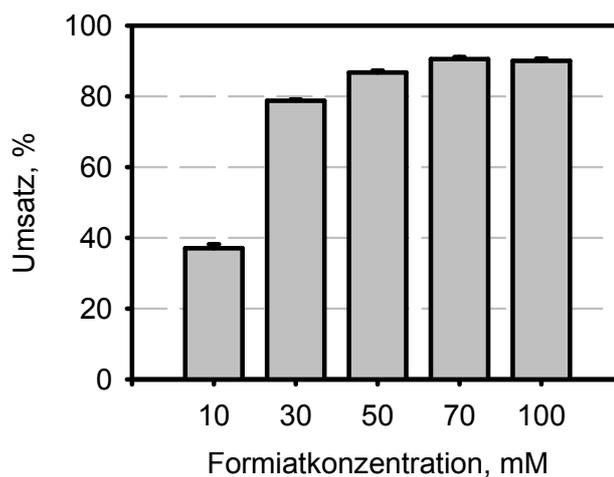


Abbildung 8.4: Durchmusterung der Reduktion von 10 mM Dehydrocholsäure bei verschiedenen Kosubstratkonzentrationen. Gezeigt sind die Umsätze im Dreifachansatz samt Standardfehler nach 64 h bei Raumtemperatur. Es wurden $4,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- \text{ KanR}^+ \text{ pET21a(+)-fdh}_{D221G}\text{-}7\beta\text{-hsdh}$ eingesetzt.

Bei Vergleich der Ergebnisse aus Abbildung 8.3 und Abbildung 8.4 fallen bei letzterem die höheren Umsätze bei gleichen Bedingungen auf. Dies kann auf die veränderten Herstellungsbedingungen des Biokatalysators bei der Expression zurückgeführt werden. Die Aktivitäten der 7 β -HSDH und FDH_{D221G} wurden vor Einsatz im Ganzzellsystem bestimmt, wobei für die 7 β -HSDH eine um 120 % und für die FDH_{D221G} eine um 30 % erhöhte Aktivität bestimmt wurde. Deshalb wurden für die weitere Herstellung des Biokatalysators im Schüttelkolben die Bedingungen aus Abschnitt 4.6.1 beibehalten.

Es lässt sich in Abbildung 8.4 erkennen, dass eine Erhöhung des Umsatzes bis zu einer Formiatkonzentration von 70 mM zu beobachten ist. Bei einem Einsatz von 100 mM Formiat konnte keine Umsatzsteigerung von 10 mM Dehydrocholsäure mehr erreicht werden. Dieses Ergebnis zeigt an, dass es eine Formiatkonzentration gibt, bei der ein maximal möglicher Umsatz erreicht werden kann. Diese muss aber bei verschiedenen Substratkonzentrationen und Zelldichten jeweils ermittelt werden.

8.2.2 Biomassekonzentration

Als weiteren Einflussfaktor sollte die Konzentration des eingesetzten Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ *pET21a(+)-fdh_{D221G}-7 β -hsdh* untersucht werden. Die Reaktionen wurden analog zu den vorherigen im 2 mL-Maßstab bei pH 8,0, Raumtemperatur und unter Luftaustausch im Dreifachansatz durchgeführt. Auf Grundlage des Ergebnisses aus Abbildung 8.4, wonach bei einer Formiatkonzentration unter 70 mM geringere Umsätze erhalten wurden, wurde zur Reduktion von 25 mM Dehydrocholsäure 100 mM Formiat eingesetzt. Die Beprobung erfolgte bereits nach 3 h, um Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit besser feststellen zu können. Zum Einsatz kamen 4,6, sowie 13,9 und 46,2 g_{BTM} L⁻¹ Biokatalysator.

Es zeigt sich in Abbildung 8.5, dass eine Erhöhung der Biomassekonzentration von 4,6 auf 13,9 g_{BTM} L⁻¹ eine gesteigerte Umsetzung hervorruft. Der Einsatz von 46,2 g_{BTM} L⁻¹ führte zu keiner weiteren Umsatzsteigerung innerhalb der ersten drei Stunden.

Zu beachten ist der Zeitpunkt der Probenahme nach 3 h, weshalb eine endgültige Aussage über den Endpunkt der Umsetzung daraus nicht abgeleitet werden kann. Beim Vergleich mit Abbildung 8.4 fällt auf, dass die Umsätze dort nach 64 h ebenfalls im Bereich von ca. 90 % liegen. Dies deutet daraufhin, dass die Umsetzung nach 3 h in Abbildung 8.5 bei einer Biotrockenmasse-Konzentration von 13,9 g_{BTM} L⁻¹ und 46,2 g_{BTM} L⁻¹ bereits beendet war. Für einen effektiven Prozess zur Reduktion von Dehydrocholsäure spielt jedoch nicht nur die Prozessdauer eine Rolle, sondern auch die Kosten, die durch den Einsatz des Biokatalysators entstehen. Daher ist die Aussage wichtig, dass innerhalb einer Prozessdauer von 3 h im Rahmen

eines Arbeitstages ein maximal möglicher Umsatz mit einer bestimmten Biomasse erreicht werden kann.

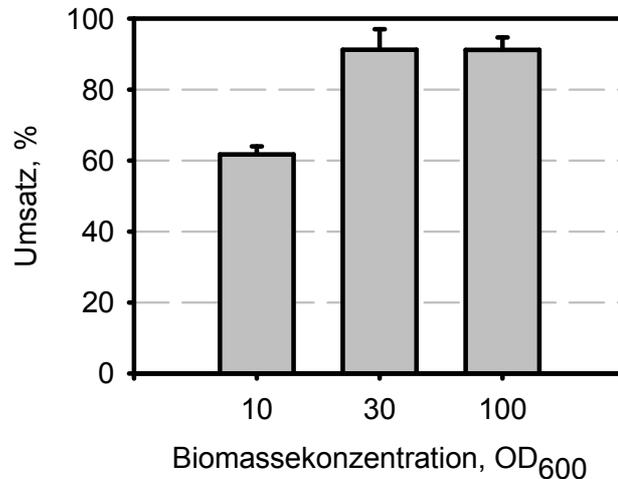


Abbildung 8.5: Einfluss der Biomassekonzentration auf die Reduktion von 25 mM Dehydrocholsäure. Gezeigt sind die Umsätze im Dreifachansatz samt Standardfehler nach 3 h bei Raumtemperatur. Es wurden $4,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ (OD_{600} 10), $13,9 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ (OD_{600} 30) und $46,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ (OD_{600} 100) Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) $\text{hdhA}^- \text{ KanR}^+ \text{ pET21a(+)-fdh}_{\text{D221G}}-7\beta\text{-hsdh}$ und 100 mM Formiat eingesetzt.

8.2.3 Reaktionsbedingungen

Unter Verwendung des Stamms *E. coli* BL21(DE3) $\text{hdhA}^- \text{ KanR}^+ \text{ pET21a(+)-7}\beta\text{-hsdh}$ ohne das Kofaktorregenerierungssystem $\text{FDH}_{\text{D221G}}$ wurde bei Zugabe von Citrat beobachtet, dass höhere Umsätze erhalten wurden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren zeigte die Zugabe von Glucose bei der Ganzzelloxidation von Cholsäure Nachteile bei der Umsetzung, wie in Abbildung 7.7 zu sehen, da vermutlich entstehendes NAD(P)H im Primärstoffwechsel für die Oxidation ungünstig ist. Für die Reduktion von Dehydrocholsäure könnte dies jedoch von Vorteil sein.

Beide Substanzen sind Substrate des Primärstoffwechsels, wobei bei der Verstoffwechslung von Glucose 10 mol mol^{-1} NADH regeneriert und im Falle des Citrats 3 mol mol^{-1} (Berg *et al.*, 2003). Für viele Organismen konnte ein vielseitiges Netzwerk beschrieben werden, worüber die Redoxäquivalenten NADH und NADPH ausbalanciert werden (Fuhrer & Sauer, 2009), wodurch vermutet wurde, dass eine indirekte NADPH-Regeneration stattfinden kann. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob ein offenes Reaktionssystem, welches den Luftaustausch mit der Umgebung erlaubt, oder ein geschlossenes Reaktionssystem zu höheren Umsätzen führt, da so ein eher reduktives Milieu erreicht wird.

Die Durchmusterungsversuche wurden unter Einsatz von 10 mM Dehydrocholsäure und 50 mM Formiat wiederum im 2 mL-Maßstab bei pH 8,0 und Raumtemperatur im Doppelansatz durchgeführt. Der Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) $\text{hdhA}^- \text{ KanR}^+ \text{ pET21a(+)-fdh}_{\text{D221G}}-7\beta\text{-hsdh}$

wurde in einer Zelldichte von $4,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ eingesetzt, wobei die Reaktionsbedingungen variiert wurden, so dass die Reaktion unter Luftaustausch (Referenz), unter Luftabschluss, unter Luftaustausch und Zugabe von 25 mM Glucose, sowie unter Luftaustausch und Zugabe von 25 mM Ammoniumcitrat untersucht wurde. Die Beprobung erfolgte nach 64 h.

In Abbildung 8.6 ist zu erkennen, dass ein höherer Umsatz im geschlossenen Reaktionssystem bei Verhinderung von Luftaustausch erzielt wurde. Die Zugabe von Glucose und Citrat hatte keine positiven Auswirkungen auf den Gesamtumsatz gegenüber der Referenz.

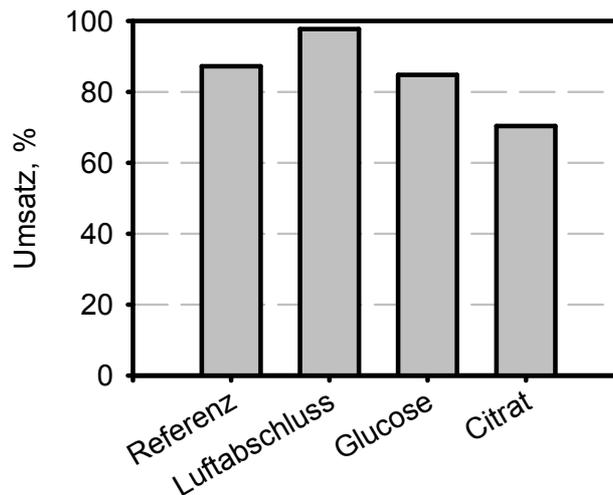


Abbildung 8.6: Durchmusterung bei verschiedenen Reaktionsbedingungen zur Reduktion von 10 mM Dehydrocholsäure mit 50 mM Formiat. Gezeigt sind die Mittelwerte der Umsätze im Doppelansatz nach 64 h bei Raumtemperatur. Es wurden $4,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- \text{ KanR}^+$ $pET21a(+)-fdh_{D221G}-7\beta\text{-hsdh}$ eingesetzt. Die Reaktion wurde mit Luftaustausch (Referenz), unter Luftabschluss, sowie mit Luftaustausch und 25 mM Glucose, beziehungsweise 25 mM Citrat durchgeführt.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die rekombinante FDH_{D221G} effizienter zur Kofaktorregenerierung geeignet ist, als die zellinterne, indirekte Regenerierung mittels Glucose- beziehungsweise Citrat-Zugabe. Bei Biotransformationen im Ganzzellsystem ist hierfür in der Literatur beschrieben, dass die intrinsische Kofaktorregenerierung bei Enzymaktivitäten $>100 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ geschwindigkeitslimitierend werden kann (Duetz *et al.*, 2001; van der Donk & Zhao, 2003).

Der verbesserte Umsatz unter Luftabschluss kann damit erklärt werden, dass die Elektronen von NADH aus dem Primärstoffwechsel bei aeroben Verhältnissen über die oxidative Phosphorylierung auf Sauerstoff übertragen wird. Das auf diese Weise entstandene NAD^+ ist vermutlich ungünstig für die betrachtete Steroidreduktion. Zwar lagen während der Biotransformation keine strikt anaeroben Verhältnisse vor, jedoch kann von einer Sauerstoffreduzierung ausgegangen werden, welche sich positiv auf die Umsetzungen auswirkt.

8.2.4 Durchmusterung verschiedener *E. coli*-Stämme

Die in Abschnitt 8.1.2 hergestellten und beschriebenen Vektorkonstrukte wurden in den Stamm *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+$ transformiert und kotransformiert. Des Weiteren wurden die in Abschnitt 7.1.3 zur Prozessentwicklung der Steroidoxidation erstellten Vektoren pCOLA(mod)-*baiG* und pCOLA(mod)-*sth* zur Stammentwicklung eingesetzt. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+$ pET22b(+)-*7 β -hsdh* wurde als Referenz verwendet.

Zum Vergleich der Stämme wurden Reaktionen im 2 mL-Maßstab im Doppelansatz bei pH 8,0 und Raumtemperatur durchgeführt. Die bisherigen Ergebnisse aus 8.1.1 und 8.2 wurden zusammengefasst, weshalb für die weiteren Experimente 25 mM Dehydrocholsäure, 100 mM Formiat und eine Zelldichte von $9,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ im geschlossenen System eingesetzt wurde. Dies sollte als Kompromiss fungieren, um einen schnellen Prozess bei einer gering gehaltenen Zelldichte zu erhalten. Die Probenahme erfolgte nach 1 h und 4,25 h. Außerdem wurde die Aktivität von 7β -HSDH und FDH_{D221G} nach Zellaufschluss der einzelnen Stämme gemessen.

Vergleicht man in Abbildung 8.7 die Stämme mit den Plasmiden pET21a(+)-*fdh_{D221G}-7 β -hsdh* und pET22b(+)-*7 β -hsdh-fdh_{D221G}*, welche sich in der Anordnung der beiden Gene unterscheiden, fällt auf, dass das pET21a(+)-Konstrukt eine etwa 10-fache Formiatdehydrogenase-Aktivität und um 2,5 – 5-fach verringerte 7β -HSDH-Aktivitäten aufweisen. Es ist daher davon auszugehen, dass das erste Gen in dem bicistronischen System häufiger abgelesen wird. Bei sämtlichen Stämmen wurde jeweils eine deutlich geringere Formiatdehydrogenase-Aktivität gegenüber der 7β -HSDH-Aktivität unter den genannten Bedingungen zur Aktivitätsbestimmung in Kapitel 4.6.4 festgestellt. Während die Formiatdehydrogenase -Aktivität bei Stämmen mit pET21a(+)-Konstrukt zwischen 14 % und 18 % der 7β -HSDH-Aktivität zu finden war, ist diese bei den pET22b(+)-Konstrukten weniger als 1 %. Dies war so zu erwarten, da die eingesetzte FDH_{D221G} -Mutante ca. 10 % der Wildtypaktivität aufweist (Gebhardt, 2006).

Sämtliche entwickelten Stämme erreichten höhere Umsätze in der Ganzzellbiotransformation gegenüber dem Referenzstamm ohne FDH_{D221G} . Des Weiteren wiesen die Stämme, welche mit einem pET21a(+)-Konstrukt transformiert waren, einen deutlich höheren Umsatz gegenüber den mit pET22b(+)-Konstrukten transformierten Zellen auf. Dies deutet darauf hin, dass die FDH_{D221G} -Aktivität bei der Verwendung des pET22b(+)-Konstrukt der geschwindigkeitslimitierende Faktor ist. Eine Aussage über eine FDH_{D221G} -Limitierung bei der Verwendung des pET21a(+)-Konstrukts ist aus diesem Versuch nicht möglich. Jedoch geben die Aktivitätsmessungen einen Hinweis darauf.

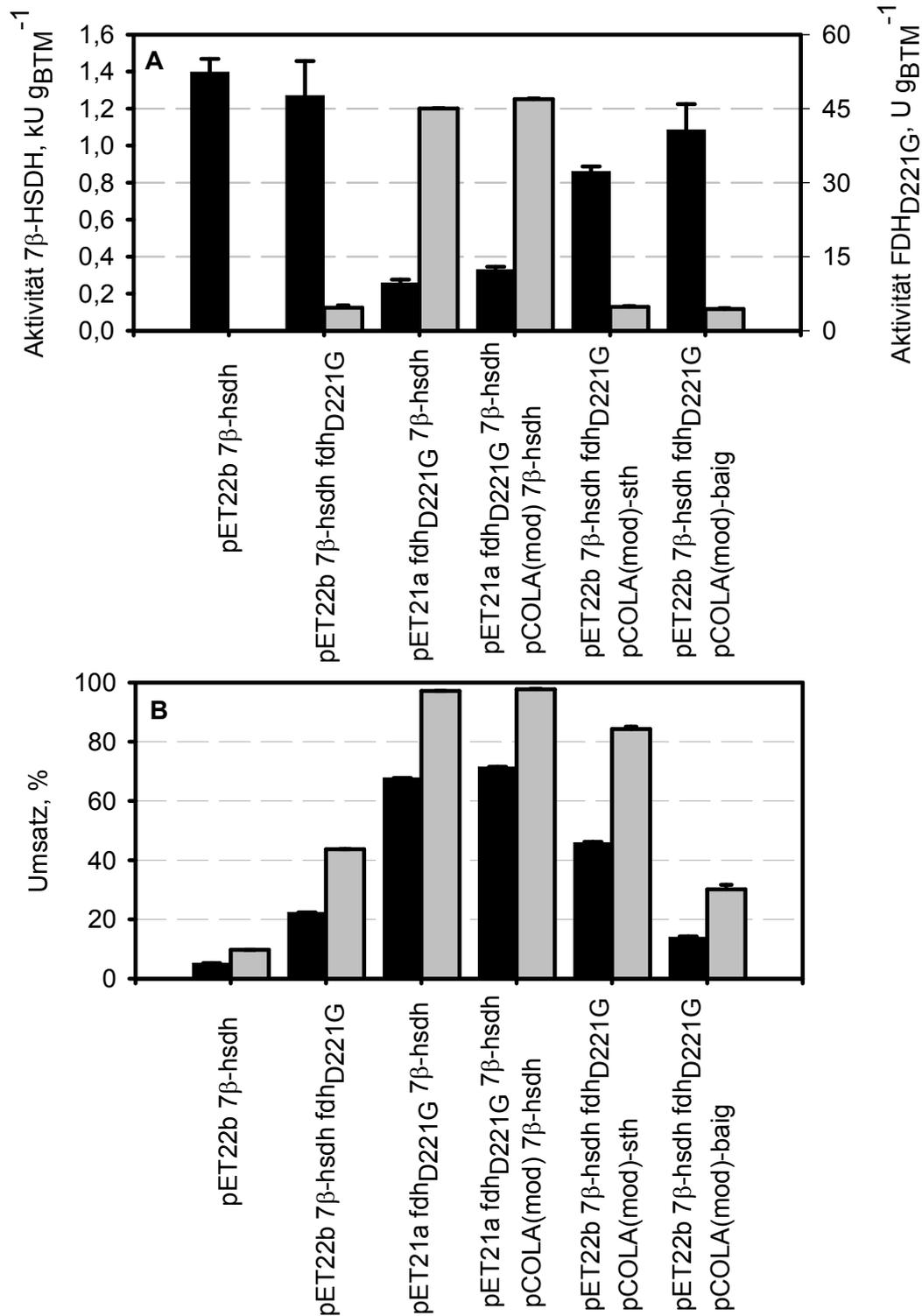


Abbildung 8.7: Aktivitäten und Umsätze verschiedener *E. coli*-Stämme. Gezeigt sind die Mittelwerte der Aktivität (A) der 7β-HSDH (■) und FDH_{D221G} (□) im Dreifachansatz samt Standardfehler, sowie die Mittelwerte der Umsätze (B) im Doppelansatz von 25 mM Dehydrocholsäure und 100 mM Formiat mit 9,2 g_{BTM} L⁻¹ Zellen. Die Probenahme erfolgte nach 1 h (■), beziehungsweise 4,25 h (□).

Beim Vergleich der Stämme mit identischem Hauptplasmid pET21a(+)-*fdh*_{D221G}-7β-*hsdh* zeigt die zusätzliche Gendosis der 7β-HSDH nur einen geringfügigen Unterschied. So zeigte der

Stamm *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+ pET21a(+)-fdh_{D221G}-7\beta-hsdh$ nach 1 h einen Umsatz von 67,8 % und nach 4,25 h von 97,2 %. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+ pET21a(+)-fdh_{D221G}-7\beta-hsdh pCOLA(mod)-7\beta-hsdh$, welcher eine höhere Gendosis der 7β -HSDH besitzt, setzte nach 1 h 71,4 % und nach 4,25 h 97,7 % um. Bei Transformation des Vektors $pET22b(+)-7\beta-hsdh-fdh_{D221G}$ hingegen fallen Unterschiede auf. So bewirkte die Koexpression des Steroidtransporters aus *Clostridium scindens* eine Verringerung des Umsatzes von 22 % auf 14 % nach 1 h. Dies deutet daraufhin, dass der Stofftransport über die Membran nicht geschwindigkeitslimitierend ist oder durch den Transporter nicht verbessert wurde. Der eingesetzte Transporter zeigt eine Präferenz für primäre Gallensalze (Mallonee & Hylemon, 1996), so dass dieser womöglich nur eine geringe Transportleistung für Dehydrocholsäure aufweist. Daher scheinen die Probleme der Zellintegrität durch den zusätzlichen Transporter zu überwiegen. Positiv wirkt sich hingegen die Koexpression der löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase aus, so dass nach 4,25 h eine Erhöhung des Umsatzes von 44 % auf 84 %, was auf die verbesserte Kopplung des NADP(H)- und NAD(H)-Pools zurückzuführen ist.

Die beiden geeignetsten Stämme aus der Stammdurchmusterung für die Reduktion von Dehydrocholsäure waren *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+ pET21a(+)-fdh_{D221G}-7\beta-hsdh$ und *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+ pET21a(+)-fdh_{D221G}-7\beta-hsdh pCOLA(mod)-7\beta-hsdh$. Letzterer zeigte geringfügig höhere Umsätze nach 1 h und 4,25 h, wobei die Signifikanz ungeklärt bleibt. Da bei einem Ein-Plasmid-System gegenüber der Verwendung von zwei Plasmiden Vorteile hinsichtlich der Antibiotikakosten und der Wachstumsraten zu erwarten sind, wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+ pET21a(+)-fdh_{D221G}-7\beta-hsdh$ für die weitere Bearbeitung ausgewählt.

8.2.5 Einfluss des pH

Um festzustellen, ob die Veränderung des pH einen Einfluss auf die Umsatzleistung des Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+ pET21a(+)-fdh_{D221G}-7\beta-hsdh$ hat, wurden Ganzzellbiotransformationen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0, sowie in 50 mM Tris-Puffer mit pH 9,0 unter Luftabschluss im Doppelansatz durchgeführt. Die Reaktionen fanden im 2 mL-Maßstab bei Raumtemperatur unter Einsatz von 25 mM Dehydrocholsäure und 100 mM Formiat, sowie einer Zelldichte von $9,2 g_{BTM} L^{-1}$ statt. Die Beprobung erfolgte nach 1 h und 24 h, um eine Aussage über die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit und den endgültigen Umsatz treffen zu können.

Während der enzymkinetischen Untersuchung der 7β -HSDH wurde in Kapitel 5.4 eine Substratinhibierung durch Dehydrocholsäure festgestellt. Das Absenken des pH auf 7,0 und 6,0

bewirkte, dass die eingesetzte Menge von 25 mM Dehydrocholsäure nicht mehr vollständig gelöst wurde, sondern als Substratsuspension vorlag. Dabei muss geklärt werden, ob sich Substrat aus der Festphase während der Biotransformation nachlöst.

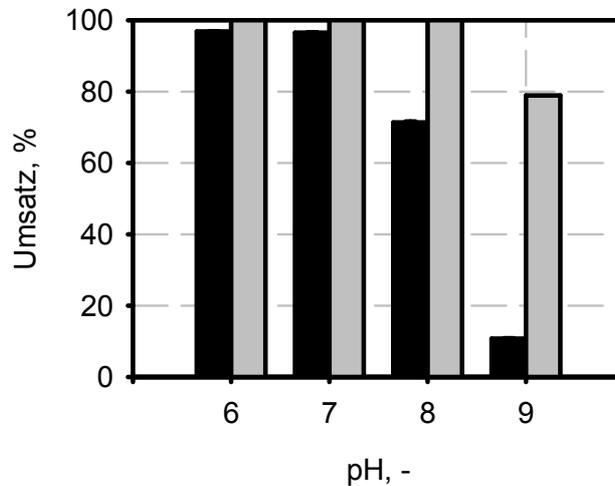


Abbildung 8.8: Einfluss des pH auf die Ganzzellreduktion von 25 mM Dehydrocholsäure. Gezeigt sind die Mittelwerte der Umsätze nach 1 h (■) und 24 h (▒) im Doppelsatz unter Verwendung von $9,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ *pET21a(+)-fdh_{D221G}-7β-hsdh* bei Raumtemperatur.

Bei pH 6,0 - 8,0 konnte nach 24 h keine Dehydrocholsäure mit der in Kapitel 4.9.4 beschriebenen HPLC-Analysenmethode detektiert werden (siehe Abbildung 8.8), so dass von einem vollständigen Umsatz ausgegangen werden kann. Bei pH 9,0 konnte nur ein Umsatz von 79 % ermittelt werden. Die Reaktionsgeschwindigkeiten bei pH 6,0 und 7,0 sind gegenüber den höheren pH deutlich erhöht, so dass hier nach 1 h jeweils 97 % gegenüber 71 % (pH 8,0) und 11 % (pH 9,0) erreicht wurden. Ob die Verwendung eines anderen Puffersystems für die schlechteren Umsätze bei pH 9,0 verantwortlich ist, konnte nicht geklärt werden. Jedoch lässt sich aussagen, dass die Umsetzungen bei pH < 8,0 schneller ablaufen. Hierfür können pH-Abhängigkeiten der eingesetzten Enzyme, als auch die geringere Menge gelöster Dehydrocholsäure verantwortlich sein, so dass womöglich die Substrathemmung der 7β-HSDH umgangen wird, da nur ein geringer Substratanteil gelöst vorliegt. Des Weiteren zeigt sich, dass in Suspension befindliches Substrat umgesetzt wird, da gelöste Dehydrocholsäure nach Reduktion erkennbar schnell genug aus der Festphase ersetzt wird. Der gerührte Milliliterreaktor scheint ausreichend zu sein, um eine schnelle Lösung zu ermöglichen, so dass eine gesättigte Substratlösung vorliegt. Das Produkt 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure besitzt eine Hydroxylgruppe, weshalb von einer höheren Löslichkeit gegenüber der Dehydrocholsäure ausgegangen werden kann. Bei der Versuchsreihe wurde eine nicht quantifizierte Verringerung der optischen Dichte (Biokatalysator- und Substratsuspension) erfasst.

8.3 Modellgestützte Prozessoptimierung

In den bisherigen Experimenten wurden verschiedene Bedingungen untersucht, wobei jeweils nur eine Variable verändert wurde. Da auf diese Weise beispielsweise keine Interaktionen zwischen einzelnen Variablen aufgeklärt werden kann, sollte dies mittels statistischer Versuchsplanung untersucht werden, um geeignete Bedingungen für die Ganzzellreduktion von Dehydrocholsäure zu finden.

8.3.1 Empirischer Polynomansatz

Als wichtige Einflussgrößen wurden die vorgelegte Substrat- und Kosubstratkonzentration, sowie der pH gewählt. Der Einfluss dieser Variablen sollte mit einem Polynomansatz 2. Ordnung beschrieben werden. Die Experimente erfolgten im 2 mL-Maßstab unter Luftabschluss. Zum Einsatz kam der Stamm *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+$ pET21a(+)-*fdh_{D221G}-7 β -hsdh*.

Tabelle 8.1: Versuchsplan und Messergebnisse zur Identifikation der empirischen Modellparameter (Polynom 2. Ordnung)

Datenpunkt	Natürliche Variablen			Umsatz 3 h, -	Umsatz 48 h, -
	Dehydrocholsäure, mM	Formiat, mM	pH, -		
1	70,6	141,2	6,4	69,6 ± 0,7 %	99,2 ± 0,2 %
2	70,6	141,2	7,6	28,4 ± 0,6 %	73,7 ± 1,3 %
3	70,6	408,8	6,4	96,2 ± 0,3 %	99,2 ± 0,1 %
4	70,6	408,8	7,6	44,9 ± 1,7 %	84,8 ± 0,5 %
5	204,4	141,2	6,4	12,6 ± 0,7 %	21,7 ± 1,6 %
6	204,4	141,2	7,6	7,9 ± 0,1 %	12,6 ± 0,0 %
7	204,4	408,8	6,4	22,7 ± 1,4 %	32,3 ± 1,4 %
8	204,4	408,8	7,6	18,3 ± 2,2 %	23,1 ± 1,8 %
9	25,0	275,0	7,0	97,6 ± 0,2 %	100,0 ± 0,0 %
10	250,0	275,0	7,0	14,7 ± 1,4 %	21,2 ± 1,3 %
11	137,5	50,0	7,0	6,3 ± 0,1 %	16,7 ± 0,1 %
12	137,5	500,0	7,0	44,9 ± 3,1 %	54,9 ± 1,1 %
13	137,5	275,0	6,0	42,6 ± 2,6 %	63,6 ± 3,4 %
14	137,5	275,0	8,0	10,0 ± 1,1 %	24,6 ± 0,3 %
15	137,5	275,0	7,0	32,4 ± 0,8 %	47,7 ± 0,8 %

Als optimaler Versuchsplan zur Identifikation der Modellparameter wurde ein *Central Composite Design* (Typ: *circumscribed*) eingesetzt und die Satzexperimente im Dreifachansatz durchgeführt (siehe Tabelle 8.1).

Die Daten aus Tabelle 8.1 wurden zur Identifikation zweier Polynome 2. Ordnung zur Schätzung des Umsatzes nach 3 h und nach 48 h unter Verwendung von MATLAB 2009a (The Mathworks, Natick, USA) verwendet. So kann einerseits eine Abschätzung über die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit nach 3 h, als auch über den Endumsatz erfolgen. Die identifizierten Modellparameter sind in Tabelle 8.2 aufgeführt. Die Berechnung der Produktkonzentration basierte auf dem geschätzten Umsatz unter Berücksichtigung des eingesetzten Substrates.

Für das Modell nach 3 h wurde ein Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9915$, sowie ein korrigiertes Bestimmtheitsmaß $\bar{R}^2 = 0,9761$ ermittelt, was auf ein in sich konsistentes Modell hinweist. Die beiden Werte unterscheiden sich nur geringfügig, woraus geschlossen werden kann, dass keiner der untersuchten Parameter außer Acht gelassen werden darf (Montgomery, 2009).

Tabelle 8.2: Identifizierte Modellparameter β des Polynoms 2. Ordnung zur Beschreibung des Umsatzes nach 3 h und 48 h bei der Reduktion von Dehydrocholsäure im Satzverfahren

Koeffizient	Parameter Modell, 3h	Parameter Modell, 48 h
β_0	0,321	0,460
β_1	-0,232	-0,293
β_2	0,094	0,071
β_3	-0,115	-0,091
β_{12}	-0,028	0,013
β_{13}	0,104	0,027
β_{23}	-0,013	0,014
β_{11}	0,087	0,069
β_{22}	-0,021	-0,018
β_{33}	-0,018	0,011

Die Simulation des Umsatzes für 3 h Prozesszeit ist in Abbildung 8.9 A dargestellt. Es ist ersichtlich, dass geringere Substrat- und höhere Kosubstratkonzentrationen zu höheren Umsätzen führen. Des Weiteren können die Ergebnisse der Durchmusterung bestätigt werden, dass niedrige pH zu besseren Umsetzungen beitragen. Für einen effizienten Prozess ist allerdings die Produktkonzentration von hoher Bedeutung, wobei auffällt, dass diese mit zunehmender Dehydrocholsäuremenge erst ansteigt und nach Erreichen eines Maximalwertes wieder abfällt.

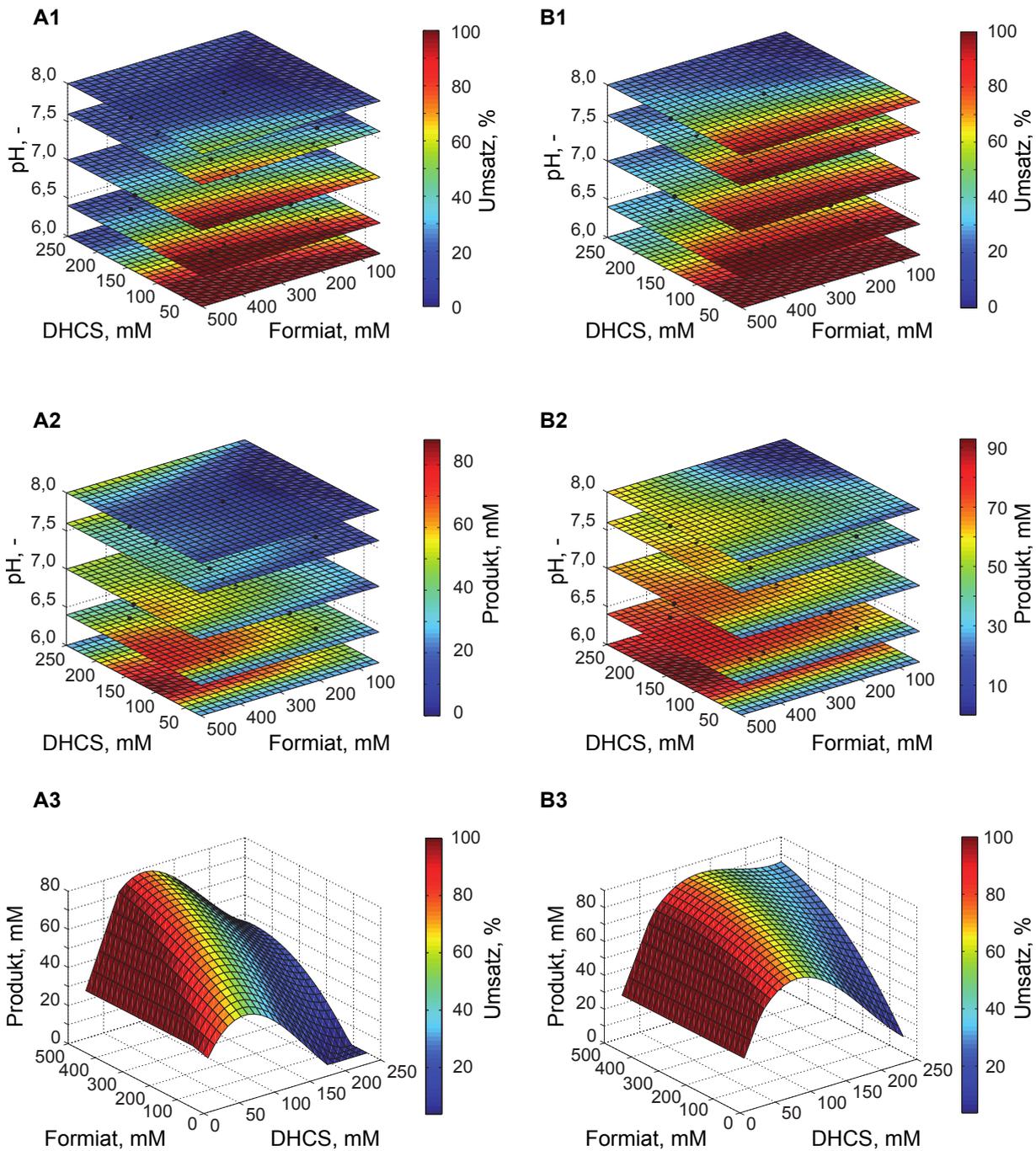


Abbildung 8.9: Simulation des Umsatzes bei der Ganzzellreduktion von Dehydrocholsäure im Satzverfahren. Gezeigt sind die Ergebnisse nach 3 h (A) und nach 48 h (B). In der oberen Reihe (1) ist der farbkodierte Umsatz für die pH-Ebenen pH 6,0, pH 6,4, pH 7,0, pH 7,6 und pH 8,0, sowie die experimentellen Datenpunkte dargestellt. In der mittleren Reihe (2) wird die farbkodierte Produktkonzentration dargestellt. In der unteren Reihe (3) sind die Produktkonzentration in Abhängigkeit von Dehydrocholsäure (DHCS) und Formiat, sowie der farbkodierte Umsatz der pH-Ebene 6,4 exemplarisch gezeigt.

Die Simulation nach 48 h zeigt mit $R^2 = 0,9442$ und $\bar{R}^2 = 0,8439$ schlechtere statistische Werte, was auf weniger wichtige, beziehungsweise insignifikante Terme innerhalb der polynomi-

schen Modellgleichung hinweist (Montgomery, 2009). Beim Vergleich mit dem 3 h- Modell fallen die gleichen Tendenzen auf, wobei nach 48 h höhere Umsätze erzielt werden konnten.

Die identifizierten Polynome 2. Ordnung wurden nun hinsichtlich einer Optimierung der Prozessbedingungen angewendet. Hierzu wurde das Maximum der Produktkonzentration gesucht, wobei verschiedene Mindestumsätze (Schwellenwerte) vorgegeben wurden. Als Schwellenwerte wurden Mindestumsätze von 90 %, 95 % und 99 % untersucht. Die optimalen Betriebspunkte für die drei Schwellenwerte sind in Tabelle 8.3 aufgelistet. Die Suche nach optimalen Betriebspunkten wurde dabei einerseits für den Modellraum (normierter Bereich $\pm 1,682$ vom Zentrum des dreidimensionalen *Central Composite Designs* des Typs *circumscribed*), als auch für den Designraum (normierter Bereich ± 1 vom Zentrum des dreidimensionalen *Central Composite Designs* des Typs *circumscribed*) durchgeführt.

Tabelle 8.3: Simulation der maximalen Produktkonzentration in Abhängigkeit von Mindestumsätzen (Schwellenwerte) von 90 %, 95 % und 99 %, sowie die entsprechenden Prozessbedingungen.

Modellraum						
Modell	Schwellenwert, -	Vorhersage		Prozessbedingungen		
		Umsatz, %	Produkt, mM	Substrat, mM	Kosubstrat, mM	pH, -
3 h	≥90 %	95,9 %	87	91	500	6,0
	≥95 %	95,9 %	87	91	500	6,0
	≥99 %	100,0 %	81	81	444	6,0
48 h	≥90 %	93,7 %	85	91	425	6,0
	≥95 %	99,7 %	81	81	425	6,0
	≥99 %	99,7 %	81	81	425	6,0
Designraum						
Modell	Schwellenwert, -	Vorhersage		Prozessbedingungen		
		Umsatz, %	Produkt, mM	Substrat, mM	Kosubstrat, mM	pH, -
3 h	≥90 %	91,2 %	69	76	409	6,4
	≥95 %	95,7 %	68	71	409	6,4
	≥99 %	-	-	-	-	-
48 h	≥90 %	90,5 %	74	82	409	6,4
	≥95 %	97,8 %	69	71	409	6,4
	≥99 %	-	-	-	-	-

Es fällt auf, dass sich die geschätzten Optima außerhalb des betrachteten Designraums befinden. Bei Einschränkung auf den Designraum konnte für einen Mindestumsatz von 99 %, wie in Tabelle 8.3 ersichtlich, keine Prozessbedingung gefunden werden. Der optimale pH von 6,0 im Modellraum muss kritisch betrachtet werden, da er sich am Rand des gewählten Versuchsraums befindet und nur durch einen experimentellen Datenpunkt beschrieben wird. Damit kann er nicht genau durch das Modell wiedergegeben werden. Deshalb soll im Folgenden eine experimentelle Validierung des empirischen Modells erfolgen.

8.3.2 Modellvalidierung

Zur Validierung des Modells wurden acht Datenpunkte zufällig generiert, welche im Dreifachansatz experimentell untersucht werden sollten. Um eine umfassende Validierung zu gewährleisten, wurden Versuchspunkte im gesamten Modellraum gewählt. Zwei Ansätze wurden zur Reproduzierbarkeitskontrolle (R1 und R2) durchgeführt. Die experimentellen Ergebnisse der Umsätze nach 3 h und 48 h sind in Tabelle 14.2 aufgelistet und in Abbildung 8.10 dargestellt.

Die Datensätze R1 und R2 konnten gut reproduziert werden. Bei Vergleich der experimentellen und vorhergesagten Umsätze der acht zufallsgenerierten Versuchsdatenpunkte in Abbildung 8.10 und Tabelle 14.2 ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,8673$, wobei vor allem der Datenpunkt 7 mit 34 % gemessenem und 64 % vorhergesagtem Umsatz stark divergieren. Dieser Punkt liegt mit pH 6,0 am Rand des Modellraums. Der Modellraum erstreckt sich über den Bereich $\pm 1,682$ vom Zentrum des dreidimensionalen *Central Composite Designs* des Typs *circumscribed*, der gegenüber dem Designraum im Bereich ± 1 schlechtere prädiktive Eigenschaften aufweist (NIST/SEMATECH, 2010). Des Weiteren sind die Puffereigenschaften des Kaliumphosphatpuffers bei pH 6,0 ausgeschöpft (Harris, 1995). Zusätzlich ist anzumerken, dass der Verbrauch von Formiat zu CO_2 zu einer Alkalisierung des Reaktionsansatzes und damit einem pH-Anstieg führen könnte.

Wird dieser Datenpunkt daher entfernt, verbessert sich das Bestimmtheitsmaß auf $R^2 = 0,9532$. Es konnte also für $\text{pH} \geq 6,4$, welche sich im Bereich ± 1 des *Central Composite Designs* eine zufriedenstellende Validierung gezeigt werden.

Beim Modell nach 48 h erhält man ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,8377$. Bei Betrachtung der Datenpunkte fällt auf, dass sämtliche Umsätze außer Ansatz 4 höher vorhergesagt wurden. Dies könnte mit dem Einsatz unterschiedlich hergestellter Biokatalysatoren erklärbar sein, die jeweils für die Modellidentifikation und die Validierung unterschiedlich waren. Da die Umsätze nach 3 h besser vorhergesagt wurden, ist davon auszugehen, dass die Zellen bei der Validierung früher inaktiv wurden, so dass nach 48 h nicht die geschätzten Umsätze erreicht wurden.

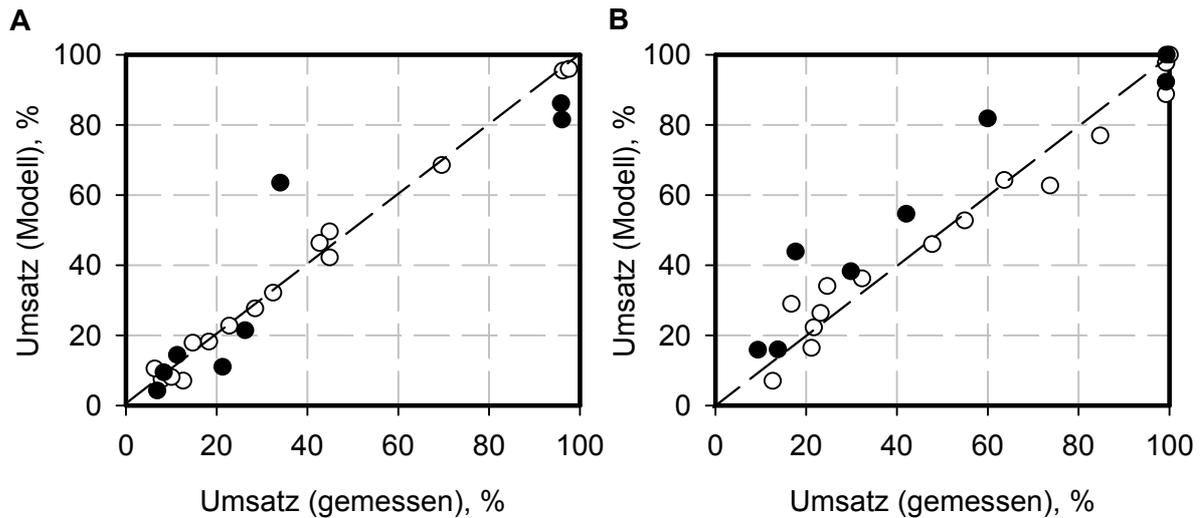


Abbildung 8.10: Validierung des empirischen Modells zur Reduktion von Dehydrocholsäure im Satzverfahren. Gezeigt sind die vom empirischen Modell geschätzten Umsätze (y-Achse) und die Mittelwerte der gemessenen Umsätze für diese Datenpunkte (x-Achse) im Dreifachansatz. Zu sehen sind die Datenpunkte zur Parameteridentifikation (○) und zur Modellvalidierung (●) nach 3 h (A) und 48 h (B).

8.3.3 Maßstabsvergrößerung

In Tabelle 8.3 wurde für die Prozessbedingungen 70,6 mM Dehydrocholsäure und 408,8 mM Formiat bei pH 6,4 die höchste Produktkonzentration bei einem gewünschten Umsatz von mindestens 95 % geschätzt. Die experimentelle Validierung zeigte einen Umsatz nach 3 h von $96,2 \pm 0,3 \%$ und 48 h von $99,2 \pm 0,1 \%$. Für diese Prozessbedingungen wurde eine Maßstabsvergrößerung in den 10 mL-Maßstab durchgeführt. Hierzu wurden wie in den vorangegangenen Experimenten $9,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ des Stamms *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ *pET21a(+)-fdh₂₂₁-7β-hsdh* eingesetzt.

Des Weiteren sollte in diesem Versuch ein Vergleich des Ganzzellsystems und der Verwendung von isolierten Enzymen stattfinden. Um einen kostenäquivalenten Herstellungsprozess der Biokatalysatoren zu gewährleisten, wurde eine definierte Zellsuspension hergestellt, die anschließend aufgeteilt wurde. Ein Teil wurde als Ganzzellbiokatalysator eingesetzt, der andere Teil wurde mittels Glasperlen aufgeschlossen. Anschließend wurde das gleiche Volumen entweder an Zellsuspension oder Zelllysat dem jeweiligen Reaktionsansatz zugegeben, um anschließend die Reaktionsgeschwindigkeiten vergleichen zu können.

Die Reaktionsverläufe wurden im Doppelansatz aufgenommen, wobei neben dem Ganzzeleinsatz von $9,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen und dem zellfreien Äquivalent, ein weiterer zellfreier Ansatz mit der Zugabe von 0,1 mM NADPH untersucht wurde. Die Reaktion wurde unter Luftabschluss mit einer Substratsuspension angesetzt.

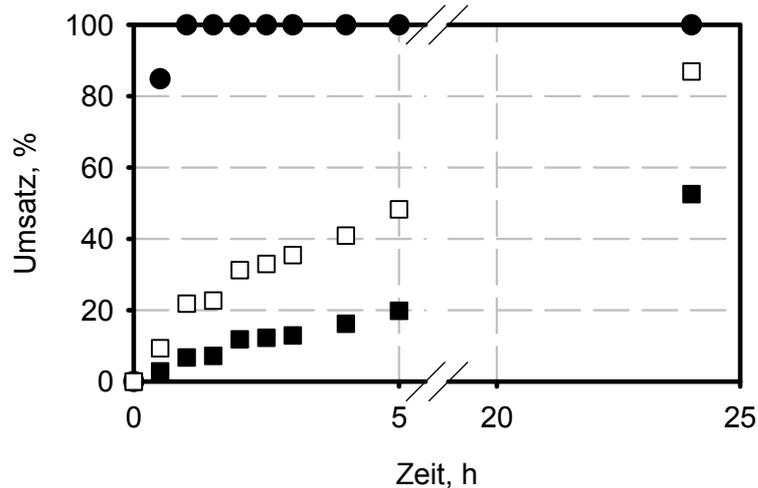


Abbildung 8.11: Maßstabsvergrößerung der Reduktion von Dehydrocholsäure zu 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure im Ganzzellsystem. Gezeigt sind die Mittelwerte der Umsätze im Doppelansatz der Biotransformation von 70 mM Dehydrocholsäure über 24 h bei Raumtemperatur ($V = 10$ mL) mit 400 mM Formiat bei pH 6,4. Es werden die Ganzzellbiotransformation (●) mit der Verwendung eines Zelllysats verglichen, wobei kein (■) oder 0,1 mM (□) NADPH zugegeben wurde. Es kamen $9,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ oder ein aufgeschlossenes Äquivalent zum Einsatz.

Im Ganzzellansatz konnte bereits nach 1 h kein verbleibendes Substrat im 10 mL-Maßstab beobachtet werden (siehe Abbildung 8.11). Im 2 mL-Maßstab wurden nach 3 h $96,2 \pm 0,3$ % und nach 48 h $99,2 \pm 0,1$ % erreicht. Die experimentellen Unterschiede könnten mit der Qualität des eingesetzten Biokatalysators oder auch veränderten Reaktionsbedingungen aufgrund des größeren Reaktorvolumens erklärt werden. Die Biotransformationen mit Zelllysats verlaufen mit deutlich langsameren Geschwindigkeiten. So konnte nach 24 h im zellfreien Ansatz ohne Kofaktorzugabe ein Umsatz von 53 % und mit Kofaktorzugabe ein Umsatz von 87 % errechnet werden. Zum Vergleich der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten wurden für die zellfreien Ansätze die Datenpunkte von 0 h, 0,5 h und 1 h über lineare Regression ausgewertet. Da die Ganzzellbiotransformation bereits nach 1 h beendet war, kann hier nur eine Verbindungsgerade zum Abschätzen der Reaktionsgeschwindigkeit dienen. Es ist davon auszugehen, dass die tatsächliche Anfangsreaktionsgeschwindigkeit höher liegt. Auf diese Weise errechnet sich für die Ganzzellbiotransformation eine um mindestens 26-fach erhöhte Anfangsgeschwindigkeit gegenüber dem zellfreien Ansatz. Die Zugabe von 0,1 mM NADPH erhöht zwar die Reaktionsgeschwindigkeit bei Verwendung des Zelllysats, blieb aber mindestens um das 8-fache gegenüber den ganzen Zellen zurück. Der Stofftransport über die Membranen scheint kein maßgebliches Hindernis darzustellen. Die Ergebnisse aus Abbildung 8.11 zeigen, dass ein Satzverfahren unter Verwendung von ganzen Zellen sinnvoller ist.

8.4 Ganzzellbiotransformationen mit rekombinanter 7 β - und 3 α -HSDH

Nachdem ein geeigneter Versuchsaufbau zur Reduktion von Dehydrocholsäure mittels rekombinanter 7 β -HSDH gefunden werden konnte, sollte die zweistufige Biotransformation zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure unter Verwendung einer heterologen 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni* in einem Schritt untersucht werden. Hierzu wurde der Vektor pCOLA(mod)-3 α -hsdh in den vorhandenen Stamm *E. coli* BL21(DE3) hdhA⁻ KanR⁺ pET21a(+)-fdh_{D221G}-7 β -hsdh kotransformiert. Dabei erweist sich die bispezifische FDH_{D221G}-Mutante von Vorteil, die sowohl NADH als auch NADPH regeneriert (Gebhardt, 2006), da die 3 α -HSDH eine NADH-Abhängigkeit zeigt. 18,5 g_{BTM} L⁻¹ Biokatalysator wurden im 10 mL-Maßstab eingesetzt, wobei 50 mM Dehydrocholsäure mit 600 mM Formiat bei pH 6,5 umgesetzt werden sollten. Die Auswertung erfolgte mit HPLC und Referenzsubstanzen der beteiligten Gallensalze.

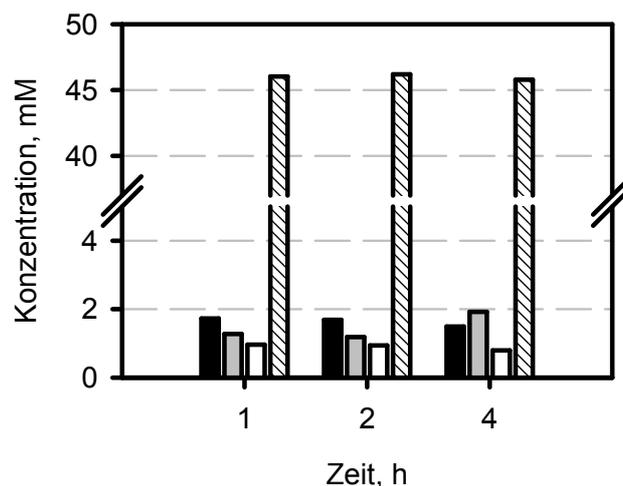


Abbildung 8.12: Verteilung der Konzentration der Reaktionspartner bei der zweistufigen Reduktion von 50 mM Dehydrocholsäure mit 600 mM Formiat und 18,5 g_{BTM} L⁻¹ Biokatalysator bei pH 6,5. Gezeigt sind die Konzentrationen von Dehydrocholsäure (■), 7,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure (■), 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure (□) und 12-keto-Ursodesoxycholsäure (▨) zu verschiedenen Prozesszeiten.

Wie in Abbildung 8.12 zu erkennen, konnte Dehydrocholsäure bereits nach einer Stunde zu über 96 % umgesetzt werden. Der weitaus größte Anteil ist dabei zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure reduziert wurden, welche mit 46 mM einen Anteil von 92 % an den beteiligten Reaktionspartner ausmacht. Des Weiteren konnten ebenfalls die beiden möglichen Intermediate 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure und 7,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure detektiert werden, die 1,9 % beziehungsweise 2,6 % an der Gesamtmenge der Gallensäuren ausmachen. Das Verhältnis der Reaktionspartner veränderte sich in den folgenden drei Stunden nur wenig, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Reaktion nach einer Stunde

beendet war. Als Gründe können der Verbrauch von Formiat oder die Inaktivierung des Biokatalysators in Frage kommen. Hierzu ist eine weitergehende Analytik notwendig, um Ameisensäure zu quantifizieren.

Die Ergebnisse in Abbildung 8.12 zeigen eindeutig, dass der Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+$ pET21a(+)-*fdh_{D221G}*-*7 β -hsdh* pCOLA(mod)-*3 α -hsdh* in der Lage ist, die beiden Ketogruppen an C-3 und C-7 von Dehydrocholsäure in einem Schritt asymmetrisch zu reduzieren, wodurch 12-Keto-Ursodesoxycholsäure erhalten werden kann. Das Verfahren kann damit potenziell vier chemische Schritte einsparen, wodurch sich die Gesamtsynthese ausgehend von Cholsäure auf drei Verfahrensschritte reduziert. Um den Umsatz von den erzielten 96 % noch weiter zu verbessern, sowie die Konzentrationen beider Intermediate zu verringern, bedarf es weitergehender Untersuchungen und Optimierungen.

8.5 Diskussion

Die kürzlich aufgeklärte 7 β -HSDH (Liu *et al.*, 2011) konnte erstmals in ein Ganzzellsystem übertragen werden, wobei der Knockoutstamm *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+$ als Ausgangsstamm verwendet wurde. Zur Kofaktorregenerierung kam eine FDH-Mutante zum Einsatz, welche sowohl NADP⁺, als auch NAD⁺ akzeptiert. Verschiedene Stämme wurden erstellt, in welchen die Anordnung der beiden Gene auf den Vektoren gewechselt wurde. Sie verblieben jedoch unter der Kontrolle desselben Induktionssystems. Diese Vorgehensweise ist gegenüber der Verwendung verschiedener Induktoren vorzuziehen, um die Genexpression zu variieren, da die Induktoren auch einen Einfluss auf den Zellmetabolismus haben. Um reproduzierbare Bedingungen zu erhalten, ist es daher angebracht, vergleichbare Induktionsbedingungen zu wählen.

Die Biotransformation unter Verwendung des Stammes *E. coli* BL21(DE3) $hdhA^- KanR^+$ pET21a(+)-*fdh_{D221G}*-*7 β -hsdh* wurde in Durchmusterungen untersucht, wobei besonders der Einfluss des pH auffiel. Bei pH 6 – 7 konnten höhere Umsätze erzielt werden, wobei das Substrat auf Grund der Protonierung der Dehydrocholsäure als Substratsuspension vorlag. Es ist davon auszugehen, dass das Produkt 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure bessere Lösungseigenschaften aufweist. Der Vorteil der Substratsuspension ist bei der Substratinhibierung der 7 β -HSDH, als auch bei der Zellintegrität zu suchen. In Kapitel 7.3.4 stellte sich heraus, dass hohe, gelöste Gallensalzkonzentrationen zu einer Aggregation der Zellen führen.

Die Maßstabsvergrößerung eines ausgewählten optimalen Satzverfahrens in den 10 mL-Maßstab konnte erfolgreich durchgeführt werden. Nach bereits 1 h waren 70 mM Dehydrocholsäure umgesetzt. Der Vergleich mit einem Äquivalent aufgeschlossener Zellen

zeigte selbst mit Zugabe von 0,1 mM NADPH schlechtere Reaktionsgeschwindigkeiten. Ursachen könnten sein, dass der Zellaufschluss nicht vollständig war oder die Enzyme während der Behandlung denaturiert wurden. Bei biokatalytischen Prozessen bedeutet der Einsatz von isolierten Enzymen stets zeit- und kostenintensive Aufarbeitungsschritte (Duetz *et al.*, 2001). Zusätzlich fallen dabei Kosten für benötigte Kofaktoren an (Koeller & Wong, 2001). Im Gegensatz dazu kann bei Ganzzellsystemen der Stofftransport über die Zellmembran verlangsamt sein, was schlechtere Raum-Zeit-Ausbeuten zur Folge hat (Jeromin & Bertau, 2005). Letzteres scheint beim vorliegenden Ganzzellansatz nicht ausschlaggebend zu sein. Daher ist der Ganzzellprozess zur Reduktion von Dehydrocholsäure im Satzverfahren ökonomisch sinnvoller.

Erstmals konnte ein neuartiger Biokatalysator erstellt und eingesetzt werden, der die zweistufige Reduktion von Dehydrocholsäure mittels 3 α - und 7 β -HSDH in einem Organismus durchgeführt. Dabei wird die Bispezifität der verwendeten Formiatdehydrogenase-Mutante ausgenutzt, so dass kein weiteres Enzym inkloniert werden musste. Um die statistische Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass ein Steroidmolekül von der 3 α - und 7 β -HSDH umgesetzt wird, wurde für die Machbarkeitsstudie eine höhere Zelldichte eingesetzt. Auf diese Weise konnten innerhalb einer Stunde Prozesszeit 50 mM Dehydrocholsäure direkt zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure umgesetzt werden, wobei nur geringe Mengen der Intermediate der Einzelreduktionen und des Substrats festgestellt werden konnten. Das Produkt 12-Keto-Ursodesoxycholsäure kann anschließend direkt mittels Wolff-Kishner-Reduktion zu Ursodesoxycholsäure umgesetzt werden. Monti *et al.* (2009) erreichten ausgehend von Cholsäure in einer multienzymatischen Synthese in einem Schritt eine Produktkonzentration von 12,5 mM innerhalb von 5 h. Höhere Ausgangskonzentrationen wurden nicht vollständig umgesetzt. Des Weiteren müssen hier fünf verschiedene Enzyme eingesetzt werden, die im Normalfall fünf Herstellungsverfahren bedürfen. Im dort gezeigten Fall wurden drei Enzyme käuflich erworben, ein Enzym rekombinant in *E. coli* hergestellt und die 7 β -HSDH aus dem Wildtypstamm gewonnen. Anschließend erfolgten Enzymisolation und eine teilweise Aufreinigung. Zwar kann in diesem Fall auf die Totaloxidation von Cholsäure zu Dehydrocholsäure verzichtet werden, doch ist diese chemisch leicht zu realisieren, da keine Stereo- oder Regioselektivitäten berücksichtigt werden müssen. Dehydrocholsäure wurde bereits mit isolierten Enzymen und einem Regenerationssystem bestehend aus einer Glucosedehydrogenase ohne messbare Intermediate umgesetzt, wobei ebenfalls nur 12,4 mM eingesetzt wurden (Carrea *et al.*, 1992). Damit stellt das hier vorgestellte Verfahren eine wesentliche Verbesserung gegenüber bisherigen Verfahren dar.

9 Diskussion der untersuchten Prozessstrategien

9.1 Prozessstrategien zur Produktion von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure

Zur biokatalytischen Synthese von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure wurden vier grundlegende Prozessansätze untersucht und etabliert:

- Satzverfahren mit isolierten Enzymen
- Satzverfahren mit immobilisierten Zellen
- Satzverfahren mit freien Zellen
- Zulaufverfahren mit freien Zellen

Je nach Prozessausrichtung, -anforderung und wirtschaftlichen Interessen kann eines der in dieser Arbeit erarbeiteten Verfahren gewählt werden und zum Einsatz kommen. Im Folgenden werden verschiedene Aspekte der untersuchten Prozesse zur Synthese von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure diskutiert.

9.1.1 Modelloptimierte Synthese mit isolierten Enzymen

Der Prozess mit isolierten Enzymen zeichnet sich dadurch aus, dass die beiden Enzyme in individuellen Verhältnissen eingesetzt werden können. Bei Ganzzellsystemen sind hierzu meist gentechnische Arbeiten oder modifizierte Herstellungsstrategien notwendig, um die Hauptreaktion und die Kofaktorregenerierung aufeinander abzustimmen. Das in dieser Arbeit vorgestellte mechanistische Prozessmodell (Kapitel 6) kann dabei helfen, optimale Verhältnisse der beiden Enzyme zu ermitteln. Hierfür können auch die spezifischen Kosten der einzelnen Enzyme berücksichtigt werden. Des Weiteren zeigen die Enzyme 12 α -HSDH und *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase gute Lagereigenschaften nach Lyophilisation. Dies kann dazu genutzt werden die Enzyme in größeren Mengen herzustellen und den Transport vom Enzymhersteller zum Produktionsort zu erleichtern. Allerdings ist die Gefriertrocknung energie- und damit kostenaufwändig und muss daher in der Kostenkalkulation berücksichtigt werden.

Als weiteren Vorteil weist das zellfreie Verfahren schnellere Reaktionsgeschwindigkeiten gegenüber dem Ganzzellverfahren auf. So sind kurze Prozesszeiten von 12 – 48 h vorstellbar.

Für ökonomische Produktkonzentrationen und Umsätze werden hohe Konzentrationen des Kosubstrats Aceton benötigt, um das thermodynamische Gleichgewicht auf Seite des Produkts 12-Keto-Chenodesoxycholsäure zu bringen. Aceton stellt damit einen wichtigen Kostenfaktor dar und kann auf Grund der denaturierenden Eigenschaften nicht in beliebiger Menge zugesetzt werden. Bei der Produktaufarbeitung können Aceton und Isopropanol zudem ein Problem darstellen. Zusätzlich fallen Kosten für die Wiederverwendung der beiden Lösungsmittel an.

Ein weiterer Nachteil besteht in den Kosten für den Kofaktor, der trotz Regenerierungsreaktion in katalytischen Konzentrationen benötigt wird. Wie in Abbildung 6.5 und Abbildung 6.7 deutlich wird, hängt die Reaktionsgeschwindigkeit von der NADP^+ -Konzentration ab. NADP^+ kann in gewissen Bereichen durch Erhöhung der Enzymkonzentration ausgeglichen werden, um bei einer festen Prozesszeit dennoch maximale Umsätze zu erzielen. Das mechanistische Prozessmodell kann dazu verwendet werden, diese Optionen *in silico* in Abhängigkeit der Kosten zu optimieren.

Ferner wirkt sich die Verwendung zweier Enzyme nachteilig aus, da diese im Normalfall in zwei verschiedenen Kultivierungen hergestellt werden müssen. Dabei benötigt jedes der Enzyme eine eigene Herstellungsstrategie, welche nicht einfach von einem Enzym auf das andere übertragen werden kann. Auch bei der Aufarbeitung sind für jedes Enzym gesonderte Protokolle zu beachten, wie beispielsweise individuelle Stabilitätseigenschaften. Beispielsweise kann die *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase aufgrund ihrer Thermostabilität einfach teilaufgereinigt werden, andererseits ist dieses Enzym Zink-abhängig, was bei der Enzymgewinnung berücksichtigt werden muss. Bei der Enzymherstellung entstehen im Allgemeinen weitere, hohe Kosten bei der Aufarbeitung. Die Zellen müssen großtechnisch, meist mittels Hochdruckhomogenisatoren, aufgeschlossen werden. In Anschluss müssen Zelltrümmer abgetrennt und die Enzyme in eine lagerstabile Form gebracht werden.

Das von Fossati *et al.* (2006) vorgestellte, zellfreie Verfahren zeigt zwar hohe Reaktionsgeschwindigkeiten, jedoch werden wegen des thermodynamischen Gesamtgleichgewichts keine vollständigen Umsätze erreicht. Je nach geeigneter Acetonkonzentration können Umsätze von 92 % erhalten werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden (Kapitel 6.4), dass selbst bei sehr hohen Acetonkonzentrationen keine vollständigen Umsetzungen erzielt werden können. Isopropanol kann nicht auf einfachem Weg mittels destillativer Verfahren abgetrennt werden, da es mit Wasser ein azeotropes Gemisch bildet und Aceton einen höheren Dampfdruck aufweist.

9.1.2 Synthese mit ganzen Zellen

Die Anwendung ganzer Zellen führt zu einer Änderung der Prozessanforderungen und der anfallenden Kosten einzelner Zwischenstufen. Nachteilig wirkt sich beispielsweise der allgemein höhere Aufwand an Biotrockenmasse im Vergleich zum Verfahren mit aufgeschlossenen Zellen aus, da womöglich der Kofaktor NADP^+ im Ganzzellsystem nur langsam regeneriert wird. Des Weiteren stellt das benötigte Kosubstrat 2-Oxoglutarat eine weitere Kostenbelastung dar. Individuelle Großkundenpreise müssen dabei klären, ob und inwieweit diese höher liegen als die Kosten für Aceton im zellfreien Prozess.

Daneben ist die Reproduzierbarkeit von Prozessen mit ganzen Zellen geringer als bei Verfahren mit isolierten Enzymen. Bei den komplexeren Ganzzellsystemen können veränderte Bedingungen bei der Kultivierung zum Beispiel zu Änderungen der Membranintegrität, des Enzymhaushalts und des Metabolismus führen, die die Biotransformationsleistung der Cholsäureoxidation beeinflussen können.

Im Gegensatz zum Verfahren mit isolierten Enzymen erscheint die Prozessdauer bei Verwendung ganzer Zellen mit 96 h deutlich länger. Berücksichtigt man hingegen, dass zum Erreichen hoher Umsätze im zellfreien Prozess mindestens zwei bis drei aufeinanderfolgende Umsetzungen notwendig sind, ist davon auszugehen, dass beide Prozessstrategien in etwa vergleichbare Prozesszeiten benötigen.

Ein wichtiger Vorteil des in dieser Arbeit entwickelten Ganzzellsystems besteht in der Fähigkeit, hohe Substratkonzentrationen vollständig umzusetzen, obwohl das thermodynamische Gleichgewicht der Oxidation auf Seite der Cholsäure liegt (Braun *et al.*, 1991). Daraus resultiert, dass nur ein Prozessschritt notwendig ist. Im 2 mL-Maßstab konnten 138 mM mit 99,6 % Umsatz innerhalb von 96 h umgesetzt werden; eine Maßstabsvergrößerung erfolgte für 101,6 mM Cholsäure, welche vollständig oxidiert wurde. Dabei wurde bereits nach 48 h ein Umsatz von 97 % beziehungsweise 98 % erzielt. Der hohe Umsatz erlaubt es, das Produkt direkt für den nächsten Verfahrensschritt einzusetzen, ohne es zwischenzeitlich zu isolieren.

Für die Ganzzellbiotransformation ist außerdem keine Kofaktorzugabe notwendig, woraus ein großer Kostenvorteil resultiert. Die zelleigenen Kofaktoren reichen für eine erfolgreiche Umsetzung aus und sind im intrazellulären Milieu zumindest über den Prozesszeitraum von 96 h ausreichend stabil.

Zur Kostensenkung trägt auch bei, dass nur eine Kultivierungsstrategie für den Biokatalysator notwendig ist, um die Biokatalyse durchzuführen. Eine zweite Biokatalysatorherstellung für das Kofaktorregenerierungssystem wird vermieden. Von Vorteil erweist sich zusätzlich der überflüssige Zellaufschluss, wodurch die Aufarbeitungskosten drastisch reduziert werden. Hinsichtlich der Lagerfähigkeit sind ganze Zellen im Gegensatz zu lyophilisierten Enzymen im

Nachteil, da sie im Allgemeinen weniger stabil und schwieriger zu lagern sind. Dabei besteht beispielsweise das Problem von Kontaminationen der Ganzzellsuspensionen während längerer Lagerungen bei 4 °C. Eine Lagerung bei -20 °C wäre daher wünschenswert, was allerdings zu Membranschädigungen führen kann. Zusätze wie Glycerol können diese Beeinträchtigung reduzieren, jedoch muss der Zusatzstoff anschließend vermutlich wieder entfernt werden, da bei der Ganzzelloxidation von Cholsäure eine Umsatzverringering bei der Zugabe der Kohlenstoff- und Energiequelle Glucose beobachtet wurde. Auch die Stabilität der intrazellulären Kofaktoren ist bei längeren Lagerungen kritisch und muss optimiert werden.

9.1.3 Vergleich der untersuchten Prozessstrategien mit ganzen Zellen

Wie beim Vergleich isolierter Enzyme oder ganzer Zellen für den Einsatz zur Cholsäureoxidation, weisen die untersuchten Ganzzellbiokatalysestrategien verschiedene Merkmale auf, die die Entscheidung des endgültigen Verfahrens beeinflussen. Je nach Anforderung können diese unterschiedlich bewertet und gewichtet werden.

In vergleichenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass immobilisierte Zellen zur Oxidation von Cholsäure verwendet werden können und in der Lage sind, vollständige Umsätze zu generieren. Jedoch wurden bei höheren Substratkonzentrationen geringere Reaktionsgeschwindigkeiten im Vergleich zu freien Zellen beobachtet, die womöglich auf nicht-quantifizierbare Zellverluste bei der Herstellung zurückzuführen sind. Die Herstellung der immobilisierten Zellen mit gleichbleibender Qualität ist dabei aufwändig und großtechnisch schwer zu realisieren. Von Vorteil ist die gegenüber freien Zellen einfachere Handhabung bei der Prozessvorbereitung, da die Zellen beispielsweise nicht resuspendiert werden müssen. Des Weiteren erlauben die Immobilisate eine leichte Prozessführung. Außerdem konnte mittels Einsatz der Alginatepartikel erfolgreich eine Zellaggregation unterbunden werden, wodurch die technischen Anforderungen verringert und die Produktaufarbeitung erleichtert wird.

Der Einsatz freier Zellen im Satzverfahren stellt ebenfalls einen einfach zu realisierenden Prozess dar, wobei die Herstellungskosten gegenüber immobilisierten Biokatalysatoren geringer ausfallen. Die Prozessvorbereitung des Biokatalysators ist etwas aufwändiger, da die Zellen erst resuspendiert und umgepuffert werden müssen. Zudem neigen die eingesetzten Zellen bei erhöhten Substratkonzentrationen zur Konglomeratbildung, woraus verfahrenstechnische Probleme resultieren. Die aggregierten Zellen sind jedoch biokatalytisch aktiv und zeigen über 96 h eine ausreichende Biotransformationsleistung. Für die beiden Fälle, dass die Zellaggregation verfahrenstechnisch toleriert werden kann oder umgangen werden soll, konnte in dieser Arbeit modellgestützt ein Ganzzellsystem im Satzverfahren etabliert werden. Dieses führt zu vollständigen Umsätzen von deutlich über 100 mM Cholsäure, wobei bereits

innerhalb der ersten 48 h Umsätze von über 90 % erhalten werden können. Das in Kapitel 7.5 vorgestellte empirische Modell kann dazu genutzt werden, die Einflüsse der Substrat- und Kosubstratkonzentration *in silico* zu untersuchen, um beispielsweise die 2-Oxoglutaratkosten zu senken.

Das Satzverfahren mit freien Zellen ist von Vorteil, da es sich durch eine einfache Realisierung und Robustheit auszeichnet. Soll jedoch die Zellaggregation vermieden werden, konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Zulaufverfahren zur Oxidation von Cholsäure etabliert werden, welches die Substratkonzentration im Reaktionsansatz gering hält. Dabei wird die geringere Schädlichkeit des Produkts 12-Keto-Chenodesoxycholsäure auf die Zellen ausgenutzt. Die Prozessführung ist beim Zulaufverfahren zwar aufwändiger als beim Satzverfahren, jedoch konnte das Zulaufprofil modellgestützt optimiert werden, so dass Zellkonglomerate vermieden und hohe Produktkonzentrationen erzielt wurden. Das Verfahren konnte erfolgreich in den 200 mL-Maßstab übertragen werden, wobei ebenfalls keine Zellaggregation beobachtet werden konnte. Jedoch wurden etwas geringere endgültige Produktkonzentrationen als im Satzverfahren erzielt. Da auch während der letzten Prozessphase noch ausreichende Umsatzraten erreicht werden müssen, um die am Prozessende zugegebene Cholsäure zu oxidieren, wurde im Zulaufverfahren 25 % mehr Biokatalysator eingesetzt, was beim Vergleich beider Verfahren berücksichtigt werden muss.

9.2 Bewertung der Steroidoxidation und –reduktion für die Ursodesoxycholsäure-Synthese

In der vorliegenden Arbeiten konnte sowohl ein Ganzzellsystem zur Synthese von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure aus Cholsäure (Oxidation), als auch von 12-Keto-Ursodesoxycholsäure aus Dehydrocholsäure (Reduktion) entwickelt werden. Cholsäure stellt ein Naturprodukt dar, Dehydrocholsäure hingegen muss erst chemisch aus Cholsäure synthetisiert werden.

Bei Einsatz einer Biokatalysatorkonzentration von $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ können bei der Oxidation von Cholsäure mit dem erstellten Stamm bis zu 139 mM Cholsäure nahezu vollständig umgesetzt werden. In der Machbarkeitsstudie zur zweistufigen Reduktion von Dehydrocholsäure konnten 50 mM Substrat zu 96 % umgesetzt werden. Da es sich um erste Versuche zur Machbarkeit handelt, kann von einer weiteren Optimierung ausgegangen werden. Bei Betrachtung der Raum-Zeit-Ausbeuten erweist sich die lange Prozesszeit von ca. 48 – 96 h im oxidativen Verfahren von Nachteil. Der Reduktionsprozess ist innerhalb weniger Stunden beendet. Dies kann auf die eingesetzten Kofaktorregenerierungssysteme und das resultierende, thermody-

namische Gesamtgleichgewicht zurückgeführt werden, welches bei Verwendung von Formiatdehydrogenasen zur Kofaktorregenerierung im Reduktionsverfahren vorteilhaft ist. Zudem ist das Kosubstrat Formiat zur Regenerierung von NAD(P)H kostengünstiger als das zur Oxidation benötigte 2-Oxoglutarat.

Für einen erfolgreichen Reduktionsprozess von Dehydrocholsäure zur 12-Keto-Ursodesoxycholsäure ist es wichtig, dass keines der beiden Intermediate 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure und 7,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure in der Reaktion verbleibt. 7,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure würde in der anschließenden Wolff-Kishner-Reduktion zu Lithocholsäure umgesetzt werden, welche eine toxische Gallensäure darstellt (Bernstein *et al.*, 2005). Dies stellt hohe Anforderung an die Robustheit der Reaktion und wirkt sich daher nachteilig auf eine einfache Prozessführung aus.

An die Prozessführung sind bei beiden Verfahren unterschiedliche Anforderungen gegeben. Während bei der Oxidation mit isolierten Enzymen keine vollständigen Umsätze erreicht werden können, muss bei der Ganzzelloxidation die Zellaggregation beachtet werden. Die Steroidreduktion wird hingegen in einer Substratsuspension durchgeführt, deren homogene Durchmischung im großtechnischen Verfahren realisiert werden muss. Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten 7 β -HSDH-Mutanten mit verringerter Substratinhibierung können dabei helfen, bei höheren pH zu arbeiten und dadurch den ungelösten Substratanteil zu reduzieren. Dies muss in weiterführenden Stammentwicklungen untersucht werden.

Ein wichtiger Vorteil des in dieser Arbeit entwickelten, zweistufigen Ganzzell-Biotransformationsverfahrens von Dehydrocholsäure zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure besteht darin, dass gegenüber der Oxidation von Cholsäure ein weiterer chemischer Schritt vermieden werden kann. Die chemisch schwer zu realisierende Epimerisierung der α -Hydroxylgruppe zur β -Hydroxylgruppe an C-7 kann so umgangen werden. Die verbleibenden chemischen Schritte, die vollständige Oxidation aller Hydroxylgruppe von Cholsäure zu Dehydrocholsäure, sowie die Wolff-Kishner-Reduktion von 12-Keto-Ursodesoxycholsäure zu Ursodesoxycholsäure, erfordern keine komplexe Regio- und Stereochemie. Dadurch kann die Gesamtausbeute des Rohstoffs Cholsäure weiter verbessert werden.

Damit besitzt das in dieser Arbeit entwickelte Ganzzellverfahren zur zweistufigen Biotransformation von Dehydrocholsäure großes Potential, die Kosten der Gesamtsynthese von 12-Keto-Ursodesoxycholsäure weiter zu reduzieren.

10 Zusammenfassung

Ursodesoxycholsäure stellt ein wichtiges Pharmazeutikum bei der nicht-invasiven Behandlung von Gallensteinen dar und wird bereits in einem siebenstufigen, chemischen Verfahren ausgehend von Cholsäure hergestellt. Die komplexe Regio- und Stereochemie führt jedoch zu hohen Ausbeuteverlusten. Der Einsatz von Biokatalysatoren kann dabei helfen, chemische Teilschritte zu ersetzen, wodurch das Herstellungsprotokoll verkürzt und die Ausbeuten erhöht werden können. Verschiedene, mikrobielle Hydroxysteroiddehydrogenasen stellen für diese Prozesse interessante Enzyme dar. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Prozessentwicklung einer regiospezifischen Oxidation von Cholsäure mit Hilfe einer 12 α -HSDH aus *Clostridium* group P, strain C 48-50, wodurch drei chemische Schritte eingespart werden können.

Zunächst sollte das Enzym mittels *Protein Engineering* optimiert werden. Von der 12 α -HSDH ist eine Inhibition durch das Produkt 12-Keto-Chenodesoxycholsäure beschrieben (Fossati *et al.*, 2006). Mittels gerichteter Evolution konnten mehrere Enzymvarianten mit höheren Aktivitäten in Anwesenheit von Produkt erzeugt werden. Die Mutation Q98H bewirkte eine 3,5-fach höhere Restaktivität im Vergleich zum Ausgangsenzym bei einem Umsatz von 25 % im Satzverfahren. Die Mutante diente als Grundlage für eine Sättigungsmutagenese, wobei eine Enzymvariante Q98S S100T erhalten wurde, welche eine fast 6-fach höhere Restaktivität gegenüber dem Wildtyp bei einem Produktanteil von 25 % aufwies. Jedoch führten die Mutationen zu einem Verlust an spezifischer Aktivität.

Die 12 α -HSDH zeigt eine strenge NADP⁺-Abhängigkeit. Mit Hilfe des Rationalen Protein Designs sollte die Kofaktorspezifität basierend auf Sequenz- und Strukturinformationen zu NAD⁺ geändert werden. Die Mutante G38D R39L wies bei 0,25 mM NAD⁺ eine um fast 400 % gesteigerte Aktivität gegenüber dem Wildtyp auf. Kinetische Untersuchungen bei höheren NAD⁺-Konzentrationen deuten eine sehr hohe Halbsättigungskonstante K_m für NAD⁺, sowie eine hohe maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} an. Somit konnte die NAD⁺-Abhängigkeit deutlich verbessert werden, wobei der hohe K_m (NAD⁺) eine Anwendung im Prozess unwirtschaftlich macht.

Während der Mutagenesestudie war auch die Erhöhung der Aktivität mit NADP⁺ Gegenstand kinetischer Untersuchungen, da ebenfalls Effekte auf die spezifische Aktivität vermutet wurden. Dabei konnten die beiden Mutanten G38A und G38S identifiziert werden, welche signifi-

kant höhere Aktivitäten bei der Verwendung von NADP^+ gegenüber dem Wildtyp aufwiesen. Die maximale Geschwindigkeit konnte um 325 % (G38A) beziehungsweise 710 % (G38S) erhöht werden.

Zur Optimierung der Steroidoxidation mit isolierten Enzymen sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Prozessmodell zur Synthese von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure erstellt werden. Die Parameter mechanistischer Modelle der 12α -HSDH und der *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase wurden unabhängig voneinander mittels Verlaufskurvenanalyse identifiziert. Der dabei zugrundeliegende geordnete *bi-bi* Mechanismus wurde für beide Enzyme berücksichtigt. Beide Modelle waren in der Lage, Enzymkinetiken über einen breiten Konzentrationsbereich, sowohl für die Hin- als auch Rückreaktion zu beschreiben. Die Kopplung beider Modelle über die Massenbilanz des Kofaktors resultierte in einem mechanistischen Prozessmodell, welches die Reaktionsverläufe des Zwei-Enzym-Systems akkurat beschreiben konnte. Zur Validierung wurde die benötigte Enzymmenge errechnet, die einen maximalen Umsatz in einer vorgegebenen Prozesszeit im Satzverfahren erzielt. Die Simulationsdaten zeigen, dass die Konzentration der 12α -HSDH auf 3 – 4 μM und die der *Thermoanaerobacter ethanolicus* Alkoholdehydrogenase auf 0,4 – 0,6 μM reduziert werden kann, um einen maximalen Umsatz von 100 mM Cholsäure innerhalb von 48 h zu erzielen. Die Simulationsergebnisse sind in Abbildung 10.1 zu sehen.

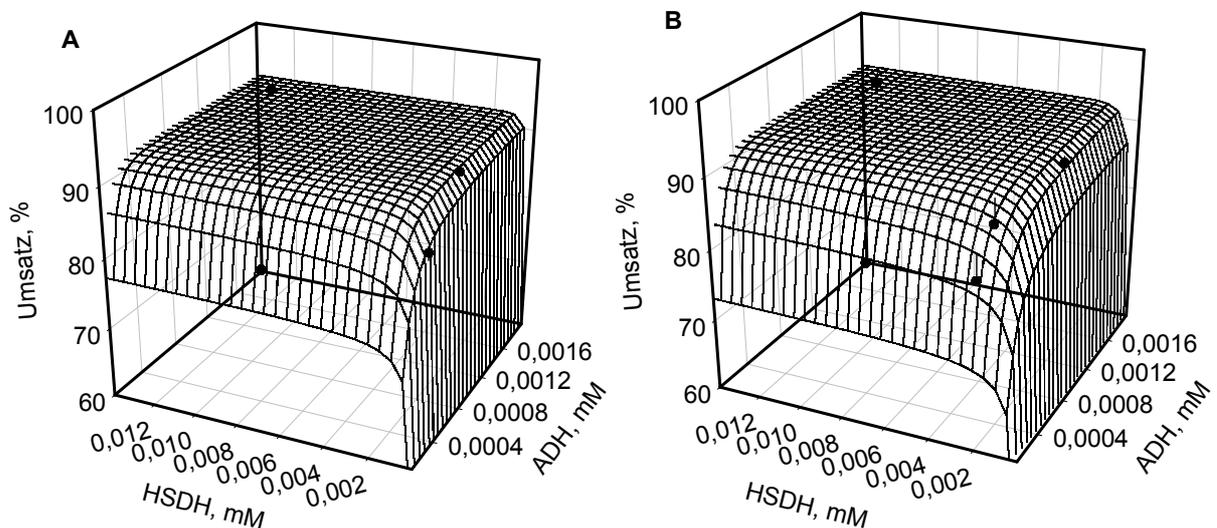


Abbildung 10.1: Biokatalytische Umsetzung von 100 mM Cholsäure im Satzverfahren in Abhängigkeit der eingesetzten Enzyme nach 48 h Prozesszeit bei zwei Kofaktorkonzentrationen 0,1 mM (A) und 0,05 mM (B). Die experimentellen Daten (●) werden mit den Simulationsdaten verglichen.

Um Prozesskosten für die Enzymherstellung und Bereitstellung von Kofaktoren zu vermindern und hohe Umsätze bei der Oxidation von Cholsäure zu erzielen, sollte als weiteres Ziel dieser Arbeit eine Stammentwicklung zur Ganzzellbiokatalyse der Steroidoxidation erfolgen. Hierzu wurde ein *E. coli*-Stamm entwickelt, welcher einen Knockout der 7α -HSDH-Gensequenz trägt,

um die Bildung von Nebenprodukten zu vermeiden. Die Durchmusterung verschiedener Enzymsysteme zur Kofaktorregenerierung deckte den Vorteil der Koexpression einer löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase auf, welche den günstigen intrazellulären NAD^+ / NADH -Pool für die NADP^+ -abhängige 12α -HSDH zugänglich macht. Potentiell geeignete Kosubstrate und Stoffwechselwege wurden untersucht, wobei die Reaktionsgeschwindigkeiten durch die beiden Substrate der zelleigenen Glutamatdehydrogenase, 2-Oxoglutarat und Ammonium, deutlich erhöht wurden. Damit stellte sich das neuentwickelte System zur Regeneration von NADP^+ im oxidativen Ganzzellverfahren wie in Abbildung 10.2 gezeigt dar.

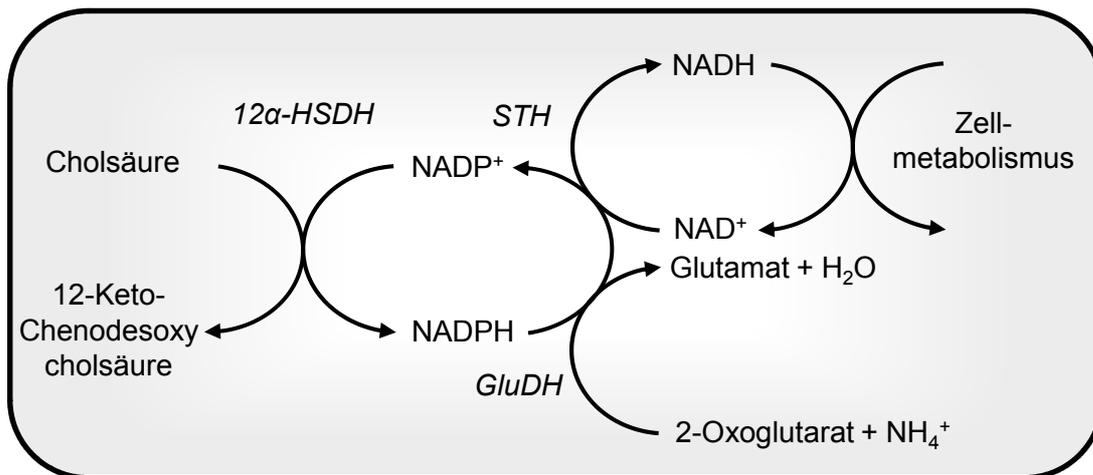


Abbildung 10.2: Cholsäureoxidation und Kofaktorregenerierung im entwickelten *E. coli*-Stamm. Cholsäure wird mit einer 12α -HSDH zu 12-Keto-Chenodesoxycholsäure umgesetzt. NADP^+ wird anschließend mit einer Glutamatdehydrogenase (GluDH) und einer löslichen Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase (STH) regeneriert. Die lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase transferiert Reduktionsäquivalente zwischen NAD^+ / NADH und NADP^+ / NADPH . Eine hohe NAD^+ -Konzentration wird vom Zellmetabolismus aufrecht erhalten.

Neben der Stammentwicklung war auch die modellgestützte Ausarbeitung eines biokatalytischen Ganzzellprozesses zur Steroidoxidation Ziel dieser Arbeit. Hierzu konnten drei verschiedene Prozessstrategien entwickelt werden. Ein einfaches Satzverfahren wurde hierzu mittels statistischer Versuchsplanung und eines empirischen Polynoms 2. Ordnung unter Verwendung der *Response Surface Methode* in Abhängigkeit des Substrats und der beiden Kosubstrate simuliert und optimiert. Dies führte zu einem Prozess, in dem 113,6 mM 12-Keto-Chenodesoxycholsäure mit vollständigem Umsatz erhalten werden konnten. 138,7 mM Cholsäure wurden in derselben Zeit zu 99 % umgesetzt. Ein optimierter Ansatz mit 101,6 mM Substrat wurde ausgewählt und im 200 mL- sowie 1 L-Maßstab validiert. Bereits nach 48 h betrug der ermittelte Umsatz 97 % beziehungsweise 98 %. Innerhalb der Prozesszeit von 96 h wurde das verbliebende Substrat vollständig umgesetzt.

Die bei hohen Cholsäurekonzentrationen beobachtete Zellaggregation des Biokatalysators konnte verhindert werden. In vergleichenden Experimenten von freien und Alginate-

immobilisierten Zellen zeigte die Anwendung der Alginatepartikel keine Biofilmbildung. Jedoch wurden etwas geringere Reaktionsgeschwindigkeiten beobachtet.

Eine weitere Strategie zur Verhinderung von Zellaggregaten ist die Vermeidung hoher Konzentration von Cholsäure während des Prozesses. Zur modellgestützten Optimierung eines Substratzulaufverfahrens wurden 16 parallelbetriebene Biotransformationen mit verschiedenen, intermittierenden Substratzulaufprofilen in einem Milliliter-Bioreaktor-System realisiert. Die experimentellen Daten dienten zum Training eines künstlichen neuronalen Netzwerks. Der 96-stündige Prozess wurde mittels Genetischen Algorithmus optimiert. Die Prozesse mit modelloptimierten Zulaufprofilen zeigten in der Validierung eine gute Übereinstimmung zwischen den experimentellen Daten und den Modellvorhersagen. Eine Maßstabsvergrößerung resultierte in einem Umsatz von 96,7 %, wenn 99 mM Cholsäure eingesetzt wurden, wobei die Zellaggregation erfolgreich vermieden werden konnte. In Abbildung 10.3 werden Satz- und Zulaufverfahren für die Ganzzellbiokatalyse zur Cholsäureoxidation verglichen.

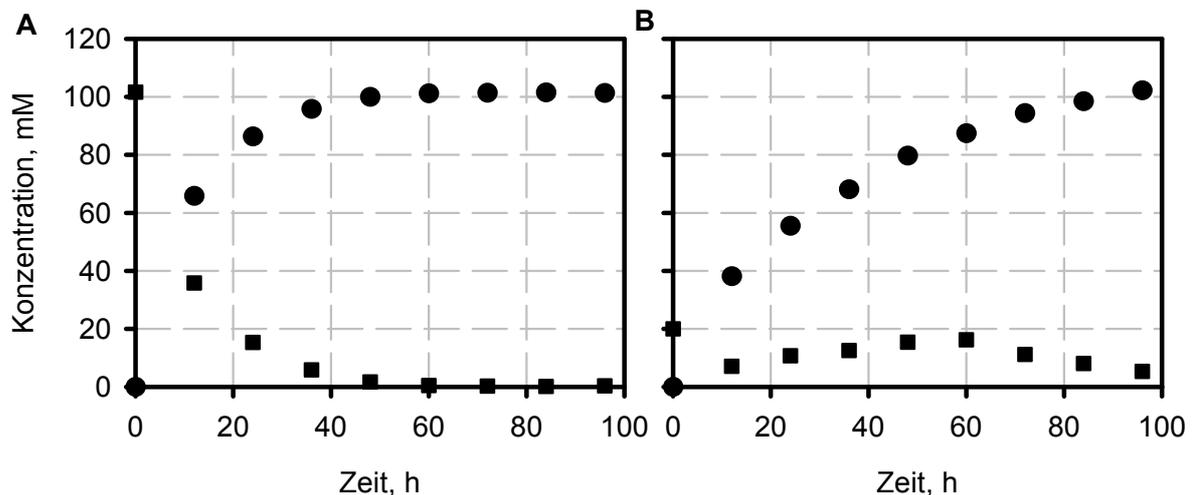


Abbildung 10.3: Vergleich der modellbasierten Optimierung des Satz (A)- und Zulauf (B)-Verfahrens zur Oxidation von Cholsäure im Ganzzellverfahren. Zu sehen sind die gemessenen Konzentrationen von Cholsäure (■) und 12-Keto-Chenodesoxycholsäure (●). Das Satzverfahren wurde im Volumen $V = 1$ L durchgeführt, das Zulaufverfahren im Parallelbioreaktorsystem mit $V = 11,6$ mL.

Neben der Steroidoxidation sollte außerdem nach alternativen Prozessstrategien gesucht werden, um die Synthese von Ursodesoxycholsäure weiter zu vereinfachen. Hierzu wurde ein neuartiges Ganzzellsystem zur Reduktion von Dehydrocholsäure entwickelt. Die kinetische Charakterisierung einer kürzlich rekombinant verfügbaren 7β -HSDH (Liu *et al.*, 2011) zeigte eine starke Substrathemmung mit einem K_i von $8,6 \pm 1,5$ mM auf. Nach Mutagenese der Position 39 konnten zwei Mutanten erhalten werden, die eine etwa 1,5-fach höhere spezifische Aktivität aufwiesen. Des Weiteren konnte die Substratinhibierung deutlich reduziert werden, so dass für die Mutante G39A ein K_i von 17 ± 4 mM und für die Mutante G39S ein K_i von 80 ± 50 mM erreicht wurden. Bei der letztgenannten Enzymvariante deuten der hohe K_i

und der große Fehler an, dass die Substratinhibierung bei gleichzeitiger v_{max} -Erhöhung größtenteils entfernt wurde.

Die 7 β -HSDH wurde mit einer NADPH-abhängigen Formiatdehydrogenase-Mutante in verschiedene Ganzzellsysteme eingebettet, wobei nach Selektion eines geeigneten Stamms eine starke pH-Abhängigkeit der Biotransformation festgestellt wurde. Die Dehydrocholsäure ist in diesem optimalen, leicht saurem pH-Bereich teilweise ungelöst und liegt als Suspension vor. Auf diesem Wege kann offenbar die Substrathemmung umgangen werden. Zur Entwicklung eines ökonomischen Prozesses wurde eine modellbasierte Optimierung durchgeführt. Das empirische Modell schätzt dabei einen Umsatz von über 95 % bei 70 mM Substrat bei einem pH 6,4 im einfachen Satzverfahren. Die Validierung des Polynoms 2. Ordnung im vergrößerten Maßstab zeigte einen vollständigen Umsatz bereits nach einer Stunde Prozesszeit.

Abschließend wurde eine NADH-abhängige 3 α -HSDH zusätzlich zur 7 β -HSDH in den Stamm eingebracht. Ein zusätzliches Kofaktorregenerierungssystem musste nicht integriert werden, da die eingesetzte Formiatdehydrogenase-Mutante sowohl NADPH als auch NADH akzeptiert. Es konnte gezeigt werden, dass der neuentwickelte Ganzzellbiokatalysator in der Lage war, 50 mM Dehydrocholsäure direkt zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure umzusetzen, wobei nur geringe Mengen der Zwischenprodukte zu finden waren. Damit konnte eine neue Prozessalternative entwickelt werden, um die chemisch aufwendige Epimerisierung an C-7 zu umgehen.

11 Ausblick

Nachdem verschiedene Prozessstrategien etabliert und optimiert werden konnten, soll der Einsatz der in dieser Arbeit erzeugten Enzymvarianten der 12 α -HSDH und 7 β -HSDH im Ganzzellprozess untersucht werden. Beispielsweise konnte die 12 α -HSDH-Variante G38D R39L mit erhöhter NAD⁺-Aktivität im Ganzzellsystem deutlich bessere Ergebnisse zeigen, da intrazellulär deutlich höhere Kofaktorkonzentrationen vorliegen als sie in typischen, zellfreien Biokatalysen eingesetzt werden.

Außerdem können die Enzymvarianten der 12 α -HSDH mit erhöhter Aktivität sowohl im Ganzzellverfahren, als auch im Prozess mit isolierten Enzymen vorteilhaft sein. Sollte sich dies bestätigen, kann das in dieser Arbeit erstellte mechanistische Modell einfach durch die neue 12 α -HSDH-Variante ergänzt werden. Hierzu sind lediglich Verlaufskurvenanalysen und eine anschließende Parameteranpassung notwendig. Im Rahmen der weiteren Charakterisierung der Enzymvarianten wären beispielsweise Bindungsstudien interessant. Auch die 7 β -HSDH-Mutanten mit verminderter Substrathemmung können in weiteren Schritten in das bestehende Ganzzellsystem eingebunden werden. Dadurch könnte u.U. der pH erhöht werden, so dass womöglich keine Substratsuspension mehr nötig ist.

Nachdem in dieser Arbeit die Machbarkeit der zweistufigen Biotransformation von Dehydrocholsäure gezeigt werden konnte, steht nun eine Optimierung des Ganzzellsystems an. Als ersten Schritt sollte verschiedene Vektorkonstrukte erstellt und untersucht werden. Nach Selektion des geeignetsten Stamms, muss dieser reaktionstechnisch charakterisiert und im Prozess etabliert werden. Dabei sollte die Minimierung der auftretenden Intermediate besonders berücksichtigt werden.

Für die regioselektive Oxidation von Cholsäure wurden in dieser Arbeit verschiedene Prozessstrategien untersucht und diskutiert. Eine wirtschaftliche Bewertung der einzelnen Verfahren soll im weiteren Vorgehen klären, welcher Prozess vergrößert werden sollte. Anschließend können dann prozess- und verfahrenstechnische Aspekte der Anwendung optimiert werden, wie die Herstellung des Biokatalysators und dessen Lagerung. Des Weiteren muss beim Reaktordesign die entsprechenden Anforderungen berücksichtigt werden.

12 Literaturverzeichnis

- Adams, M. W. (1993). Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100 degrees C. *Annual review of microbiology*, 47, 627-58.
- Aehle, W. (Ed.). (2004). *Enzymes in Industry* (2nd ed.). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA.
- Albalak, A., Zeidel, M. L., Zucker, S. D., Jackson, A. A., Donovan, J. M. (1996). Effects of submicellar bile salt concentrations on biological membrane permeability to low molecular weight non-ionic solutes. *Biochemistry*, 35(24), 7936-45.
- Alrefai, W. A., Gill, R. K. (2007). Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharmaceutical research*, 24(10), 1803-23.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-402.
- Andersen, K. B., von Meyenburg, K. (1977). Charges of nicotinamide adenine nucleotides and adenylate energy charge as regulatory parameters of the metabolism in *Escherichia coli*. *The journal of biological chemistry*, 252(12), 4151-6.
- Armstrong, M. J., Carey, M.C. (1982). The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities. *Journal of lipid research*, 23(1), 70-80.
- Batta, A. K., Salen, G., Shefer, S. (1985). Transformation of bile acids into iso-bile acids by *Clostridium perfringens*: possible transport of 3 beta-hydrogen via the coenzyme. *Hepatology*, 5(6), 1126-31.
- Batta, A. K., Aggarwal, S. K., Salen, G., Shefer, S. (1991). Selective reduction of oxo bile acids: synthesis of 3 beta-, 7 beta-, and 12 beta-hydroxy bile acids. *Journal of lipid research*, 32(6), 977-83.
- Begley, M., Gahan, C. G. M., Hill, C. (2002). Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Applied and environmental microbiology*, 68(12), 6005-12.
- Begley, M., Gahan, C. G. M., Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 625-51.
- Bennett, M. J., McKnight, S. L., Coleman, J. P. (2003). Cloning and characterization of the NAD-dependent 7alpha-Hydroxysteroid dehydrogenase from *Bacteroides fragilis*. *Current microbiology*, 47(6), 475-84.

- Benson, D., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. L. (2008). GenBank. *Nucleic acids research*, 36(Database issue), D25-30.
- Berendsen, W., Lapin, A., Reuss, M. (2007). Non-isothermal lipase-catalyzed kinetic resolution in a packed bed reactor: Modeling, simulation and miniplant studies. *Chemical engineering science*, 62(9), 2375-2385.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2003). *Biochemie* (5th ed.). Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235-42.
- Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C. M., Beard, S. E., Schneider, J. (1999). Bile salt activation of stress response promoters in *Escherichia coli*. *Current microbiology*, 39(2), 68-72.
- Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C. M., Dvorakova, K., Garewal, H. (2005). Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutation research*, 589(1), 47-65.
- Beuers, U., Spengler, U., Kruis, W., Aydemir, U., Wiebecke, B., Heldwein, W., Weinzierl, M., Pape, G. R., Sauerbruch, T., Paumgartner, G. (1992). Ursodeoxycholic acid for treatment of primary sclerosing cholangitis: a placebo-controlled trial. *Hepatology*, 16(3), 707-14.
- Bishop, G. J., Yokota, T. (2001). Plants steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant cell physiology*, 42(2), 114-20.
- Bisswanger, H. (2002). *Enzyme Kinetics*. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA.
- Bocanegra, J. A., Scrutton, N. S., Perham, R. N. (1993). Creation of an NADP-dependent pyruvate dehydrogenase multienzyme complex by protein engineering. *Biochemistry*, 32(11), 2737-40.
- Bommarius, A. S., Schwarm, M., Drauz, K. (1998). Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals--examples and perspectives. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 5(1-4), 1-11.
- Bommarius, A., Riebel, B. (2004). *Biocatalysis: Fundamentals and Applications* (1st ed.). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA.
- Boonstra, B., French, C. E., Wainwright, I., Bruce, N. C. (1999). The *udhA* gene of *Escherichia coli* encodes a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase. *Journal of bacteriology*, 181(3), 1030-4.
- Boonstra, B., Rathbone, D. A., French, C. E., Walker, E. H., Bruce, N. C. (2000). Cofactor regeneration by a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase for biological production of hydromorphone. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5161-6.
- Bornscheuer, U. T., Pohl, M. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current opinion in chemical biology*, 5(2), 137-43.
- Bortolini, O., Medici, A., Poli, S. (1997). Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. *Steroids*, 62(8-9), 564-77.

- Box, G. E. P., Wilson, K. B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the royal statistical society*, 13(1), 1-45.
- Braun, M., Lünsdorf, H., Bückmann, A. F. (1991). 12 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Clostridium* group P, strain C 48-50. Production, purification and characterization. *European journal of biochemistry / FEBS*, 196(2), 439-50.
- Braun, M. (2008). Aufklärung der Sequenz einer 12alpha- Hydroxysteroiddehydrogenase durch Sequenzierung von *Clostridium* sp. DSM 4029: Klonierung, Expression und Anwendung. *Diplomarbeit an der Universität Stuttgart*.
- Brendel, M., Bonvin, D., Marquardt, W. (2006). Incremental identification of kinetic models for homogeneous reaction systems. *Chemical engineering science*, 61(16), 5404-5420.
- Bridson, E. Y. E. (2006). *The Oxoid Manual* (9th ed.). Basingstoke, England: OXOID Limited.
- Brook, I. (1989). Aerobic and anaerobic microbiology of biliary tract disease. *Journal of clinical microbiology*, 27(10), 2373-5.
- Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U. T. (2005). *Biocatalysts and Enzyme Technology* (1st ed.). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA.
- Böttcher, D., Bornscheuer, U. T. (2010). Protein engineering of microbial enzymes. *Current opinion in microbiology*, 1-9.
- Cabral, D. J., Small, D. M., Lilly, H. S., Hamilton, J. A. (1987). Transbilayer movement of bile acids in model membranes. *Biochemistry*, 26(7), 1801-4.
- Carballeira, J. D., Quezada, M. A., Hoyos, P., Simeó, Y., Hernaiz, M. J., Alcantara, A. R., Sinisterra, J. V. (2009). Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnology advances*, 27(6), 686-714.
- Carpenter, H. A. (1998). Bacterial and parasitic cholangitis. *Mayo clinic proceedings. Mayo clinic*, 73(5), 473-8.
- Carrea, G., Bovara, R., Cremonesi, P., Lodi, R. (1984). Enzymatic preparation of 12-ketochenodeoxycholic acid with NADP regeneration. *Biotechnology and bioengineering*, 26(5), 560-3.
- Carrea, G., Bovara, R., Longhi, R., Barini, R. (1984). Enzymatic reduction of dehydrocholic acid to 12-ketochenodeoxycholic acid with NADH regeneration. *Enzyme and microbial technology*, 6(7), 307-311.
- Carrea, G., Bovara, R., Longhi, R., Riva, S. (1985). Preparation of 12-ketochenodeoxycholic acid from cholic acid using coimmobilized 12 α -hydroxysteroid dehydrogenase and glutamate dehydrogenase with NADP⁺ cycling at high efficiency. *Enzyme and microbial technology*, 7(12), 597-600.
- Carrea, G., Pilotti, A., Riva, S., Canzi, E., Ferrari, A. (1992). Enzymatic synthesis of 12-ketoursodeoxycholic acid from dehydrocholic acid in a membrane reactor. *Biotechnology letters*, 14(12), 1131-1134.
- Chan, L., Jin, Y., Heng, P. (2002). Cross-linking mechanisms of calcium and zinc in production of alginate microspheres. *International journal of pharmaceuticals*, 242(1-2), 255-8.

- Chan, L. W., Heng, P. W. S. (2002). Effects of aldehydes and methods of cross-linking on properties of calcium alginate microspheres prepared by emulsification. *Biomaterials*, 23(5), 1319-26.
- Charlier, H. A, Plapp, B. V. (2000). Kinetic cooperativity of human liver alcohol dehydrogenase gamma(2). *The journal of biological chemistry*, 275(16), 11569-75.
- Chenault, H. K., Whitesides, G. M. (1987). Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 14(2), 147-97.
- Christiaens, H., Leer, R. J., Pouwels, P. H., Verstraete, W. (1992). Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay. *Applied and environmental microbiology*, 58(12), 3792-8.
- Cleland, W. (1963a). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochimica et biophysica acta*, 67, 188-196.
- Cleland, W. (1963b). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica et biophysica acta*, 67(2), 104-137.
- Cleland, W. (1963c). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products II. Inhibition: Nomenclature and theory. *Biochimica et biophysica acta*, 67, 173-187.
- Coleman, R., Lowe, P. J., Billington, D. (1980). Membrane lipid composition and susceptibility to bile salt damage. *Biochimica et biophysica acta*, 599(1), 294-300.
- Cooper, W. C., Jin, Y., Penning, T. M. (2007). Elucidation of a complete kinetic mechanism for a mammalian hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) and identification of all enzyme forms on the reaction coordinate: the example of rat liver 3alpha-HSD (AKR1C9). *The journal of biological chemistry*, 282(46), 33484-93.
- Cornforth, J. W., Hunter, G. D., Popjak, G. (1953). The biosynthesis of cholesterol from acetate. *Archives of biochemistry and biophysics*, 42(2), 481-2.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research*, 16(22), 10881-90.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-22.
- Crawford, R. W., Gibson, D. L., Kay, W. W., Gunn, J. S. (2008). Identification of a bile-induced exopolysaccharide required for *Salmonella* biofilm formation on gallstone surfaces. *Infection and immunity*, 76(11), 5341-9.
- Crocq, V., Masson, C., Winter, J., Richard, C., Lemaitre, G., Lenay, J., Vivat, M., Buendia, J., Prat, D. (1997). Synthesis of Trimegestone: The First Industrial Application of Bakers' Yeast Mediated Reduction of a Ketone. *Organic process research development*, 1(1), 2-13.
- Dainty, A. L., Goulding, K. H., Robinson, P. K., Simpkins, I., Trevan, M. D. (1986). Stability of alginate-immobilized algal cells. *Biotechnology and bioengineering*, 28(2), 210-6.

- Dallas-Yang, Q., Jiang, G., Sladek, F. M. (1998). Avoiding false positives in colony PCR. *BioTechniques*, 24(4), 580-2.
- De Boever, P., Wouters, R., Verschaeve, L., Berckmans, P., Schoeters, G., Verstraete, W. (2000). Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(6), 709-14.
- De Jesus, M. C., Urban, A. A., Marasigan, M. E., Barnett Foster, D. E. (2005). Acid and bile-salt stress of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipid receptor binding specificity. *The journal of infectious diseases*, 192(8), 1430-40.
- De Smet, I., Van Hoorde, L., Vande W. M., Christiaens, H., Verstraete, W. (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *The journal of applied bacteriology*, 79(3), 292-301.
- Doerner, K. C., Takamine, F., LaVoie, C. P., Mallonee, D. H., Hylemon, P. B. (1997). Assessment of fecal bacteria with bile acid 7 alpha-dehydroxylating activity for the presence of bai-like genes. *Applied and environmental microbiology*, 63(3), 1185-8.
- Dowling, R. H. (2000). Review: pathogenesis of gallstones. *Alimentary pharmacology therapeutics*, 14 Suppl 2, 39-47.
- Duetz, W. A., van Beilen, J. B., Witholt, B. (2001). Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. *Current opinion in biotechnology*, 12(4), 419-25.
- Duggleby, R. G. (2001). Quantitative analysis of the time courses of enzyme-catalyzed reactions. *Methods*, 24(2), 168-74.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Cossart, P. (2002). *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Molecular microbiology*, 45(4), 1095-106.
- Eckstein, M., Villela Filho, M., Liese, A., Kragl, U. (2004). Use of an ionic liquid in a two-phase system to improve an alcohol dehydrogenase catalysed reduction. *Chemical communications*, (9), 1084-5.
- Edenharder, R., Pfützner, A., Hammann, R. (1989). Characterization of NAD-dependent 3 alpha- and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and of NADP-dependent 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from *Peptostreptococcus productus*. *Biochimica et biophysica acta*, 1004(2), 230-8.
- Estell, D. A., Graycar, T. P., Wells, J. A. (1985). Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *The Journal of biological chemistry*, 260(11), 6518-21.
- Eszes, C. M., Sessions, R. B., Clarke, A. R., Moreton, K. M., Holbrook, J. J. (1996). Removal of substrate inhibition in a lactate dehydrogenase from human muscle by a single residue change. *FEBS letters*, 399(3), 193-7.
- Faber, K. (2004). *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook* (4th ed.). Berlin: Springer Verlag.

- Feng, Y., Siu, K., Wang, N., Ng, K. M., Tsao, S. W., Nagamatsu, T., Tong, Y. (2009). Bear bile: dilemma of traditional medicinal use and animal protection. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 5, 2.
- Ferrer, M., Beloqui, A., Golyshin, P. N. (2010). Screening metagenomic libraries for laccase activities. *Methods in molecular biology*, 668, 189-202.
- Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U. (2002). Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *The journal of biological chemistry*, 277(28), 25677-84.
- Fling, S. P., Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Analytical biochemistry*, 155(1), 83-8.
- Flint, H. J., O'Toole, P. W., Walker, A. W. (2010). Special issue: The Human Intestinal Microbiota. *Microbiology*, 156(Pt 11), 3203-4.
- Flores, C., Maguilnik, I., Hadlich, E., Goldani, L. Z. (2003). Microbiology of choledochal bile in patients with choledocholithiasis admitted to a tertiary hospital. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 18(3), 333-6.
- Food Drug Administration (FDA). (1992). FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality*, 4(5), 338-40.
- Ford, J. B., Askins, K. J., Taylor, K. B. (1993). Kinetic models for synthesis by a thermophilic alcohol dehydrogenase. *Biotechnology and bioengineering*, 42(3), 367-75.
- Fossati, E., Polentini, F., Carrea, G., Riva, S. (2006). Exploitation of the alcohol dehydrogenase-acetone NADP-regeneration system for the enzymatic preparative-scale production of 12-ketochenodeoxycholic acid. *Biotechnology and bioengineering*, 93(6), 1216-20.
- French, C. E., Boonstra, B., Bufton, K. A., Bruce, N. C. (1997). Cloning, sequence, and properties of the soluble pyridine nucleotide transhydrogenase of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of bacteriology*, 179(8), 2761-5.
- Fuhrer, T., Sauer, U. (2009). Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *Journal of bacteriology*, 191(7), 2112-21.
- Fujisawa, T., Mori, M. (1996). Influence of bile salts on beta-glucuronidase activity of intestinal bacteria. *Letters in applied microbiology*, 22(4), 271-4.
- Galkin, A., Kulakova, L., Ohshima, T., Esaki, N., Soda, K. (1997). Construction of a new leucine dehydrogenase with preferred specificity for NADP⁺ by site-directed mutagenesis of the strictly NAD⁺-specific enzyme. *Protein engineering*, 10(6), 687-90.
- Galský, J., Banský, G., Holubová, T., Kőnig, J. (1999). Effect of ursodeoxycholic acid in acute viral hepatitis. *Journal of clinical gastroenterology*, 28(3), 249-53.
- Gangloff, A., Garneau, A., Huang, Y. W., Yang, F., Lin, S. X. (2001). Human oestrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase specificity: enzyme regulation through an NADPH-

- dependent substrate inhibition towards the highly specific oestrone reduction. *The biochemical journal*, 356(Pt 1), 269-76.
- Gebhardt, G. (2006). Charakterisierung und Optimierung der Formiat-Dehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* durch ein automatisiertes Screeningverfahren. *Masterarbeit an der Technischen Universität München*.
- Ghosh, D., Erman, M., Wawrzak, Z., Duax, W. L., Pangborn, W. (1994). Mechanism of inhibition of 3 alpha, 20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by a licorice-derived steroidal inhibitor. *Structure*, 2(10), 973-80.
- Gleeson, D., Ruppin, D. C., Saunders, A., Murphy, G. M., Dowling, R. H. (1990). Final outcome of ursodeoxycholic acid treatment in 126 patients with radiolucent gallstones. *The quarterly journal of medicine*, 76(279), 711-29.
- Gopal-Srivastava, R., Mallonee, D. H., White, W. B., Hylemon, P. B. (1990). Multiple copies of a bile acid-inducible gene in *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *Journal of bacteriology*, 172(8), 4420-6.
- Grill, J., Schneider, F., Crociani, J., Ballongue, J. (1995). Purification and Characterization of Conjugated Bile Salt Hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536. *Applied and environmental microbiology*, 61(7), 2577-82.
- Grimm, C., Maser, E., Möbus, E., Klebe, G., Reuter, K., Ficner, R. (2000). The crystal structure of 3alpha -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni* shows a novel oligomerization pattern within the short chain dehydrogenase/reductase family. *The journal of biological chemistry*, 275(52), 41333-9.
- Gupta, A., Khare, S. K. (2009). Enzymes from solvent-tolerant microbes: useful biocatalysts for non-aqueous enzymology. *Critical reviews in biotechnology*, 29(1), 44-54.
- Hardy, J., Francis, K. P., DeBoer, M., Chu, P., Gibbs, K., Contag, C. H. (2004). Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the murine gall bladder. *Science*, 303(5659), 851-3.
- Harris, D. (1995). *Lehrbuch der Quantitativen Analyse* (1st ed.). New York, USA: W.H. Freeman and Company.
- Harris, J. N., Hylemon, P. B. (1978). Partial purification and characterization of NADP-dependent 12alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Clostridium leptum*. *Biochimica et biophysica acta*, 528(1), 148-57.
- Heuman, D. M., Bajaj, R. S., Lin, Q. (1996). Adsorption of mixtures of bile salt taurine conjugates to lecithin-cholesterol membranes: implications for bile salt toxicity and cytoprotection. *Journal of lipid research*, 37(3), 562-73.
- Heuman, D. M., Pandak, W. M., Hylemon, P. B., Vlahcevic, Z. R. (1991). Conjugates of ursodeoxycholate protect against cytotoxicity of more hydrophobic bile salts: in vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Hepatology*, 14(5), 920-6.
- Hirano, S., Masuda, N. (1982). Characterization of NADP-dependent 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenases from *Peptostreptococcus productus* and *Eubacterium aerofaciens*. *Applied and environmental microbiology*, 43(5), 1057-63.

- Hofmann, A. F., Mysels, K. J. (1992). Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions. *Journal of lipid research*, 33(5), 617-26.
- Hofmann, A. F., Roda, A. (1984). Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *Journal of lipid research*, 25(13), 1477-89.
- Hofmann, A. F. (1963). The Preparation of Chenodeoxycholic Acid and Its Glycine and Taurine Conjugates. *Acta Chemica Scandinavica*, 17, 173-186.
- Hofmann, A. F. (1999). Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News in physiological sciences*, 14, 24-29.
- Hofmann, M., Schumann, C., Zimmer, G., Henzel, K., Locher, U., Leuschner, U. (2001). LUV's lipid composition modulates diffusion of bile acids. *Chemistry and physics of lipids*, 110(2), 165-71.
- Holmberg, N., Ryde, U., Bülow, L. (1999). Redesign of the coenzyme specificity in L-lactate dehydrogenase from bacillus stearothermophilus using site-directed mutagenesis and media engineering. *Protein engineering*, 12(10), 851-6.
- Hummel, W. (1999). Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *Trends in biotechnology*, 17(12), 487-492.
- Hung, D. T., Zhu, J., Sturtevant, D., Mekalanos, J. J. (2006). Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology*, 59(1), 193-201.
- Hölsch, K. (2009). Asymmetrische Synthesen mit neuen Oxidoreduktasen aus Cyanobakterien. *Dissertation an der Technischen Universität München*.
- Igimi, H., Carey, M. C. (1981). Cholesterol gallstone dissolution in bile: dissolution kinetics of crystalline (anhydrate and monohydrate) cholesterol with chenodeoxycholate, ursodeoxycholate, and their glycine and taurine conjugates. *Journal of lipid research*, 22(2), 254-70.
- Illanes, A., Wilson, L., Raiman, L. (1999). Design of immobilized enzyme reactors for the continuous production of fructose syrup from whey permeate. *Bioprocess engineering*, 21(6), 509-15.
- Im, E., Martinez, J. D. (2004). Ursodeoxycholic acid (UDCA) can inhibit deoxycholic acid (DCA)-induced apoptosis via modulation of EGFR/Raf-1/ERK signaling in human colon cancer cells. *The journal of nutrition*, 134(2), 483-6.
- Ishige, T., Honda, K., Shimizu, S. (2005). Whole organism biocatalysis. *Current opinion in chemical biology*, 9(2), 174-80.
- International Union of Biochemistry (IUPAC-IUB) Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). (1989). The nomenclature of steroids. Recommendations 1989. *European journal of biochemistry*, 186(3), 429-458.
- Jacobsen, C. N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and environmental microbiology*, 65(11), 4949-56.

- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS microbiology letters*, 236(2), 163-73.
- Jenzsch, M., Gnoth, S., Beck, M., Kleinschmidt, M., Simutis, R., Lübbert, A. (2006). Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes. *Journal of biotechnology*, 127(1), 84-94.
- Jeong, H., Barbe, V., Lee, C. H., Vallenet, D., Yu, D. S., Choi, S.H., Couloux, A., Lee, S.W., Yoon, S. H., Cattolico, L., Hur, C. G., Park, H. S., Ségurens, B., Kim, S. C., Oh, T. K., Lenski, R. E., Studier, F. W., Daegelen, P., Kim, J. F. (2009). Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of molecular biology*, 394(4), 644-52.
- Jeromin, G., Bertau, M. (2005). *Bioorganikum* (1st ed.). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA.
- Jones, J. B., Sneddon, D. W., Higgins, W., Lewis, A. J. (1972). Preparative-scale reductions of cyclic ketones and aldehyde substrates of horse liver alcohol dehydrogenase with in situ sodium dithionite recycling of catalytic amounts of NAD. *Journal of the chemical society, chemical communications*, (15), 856.
- Julliard, M., Le Petit, J. (1982). Regeneration of NAD⁺ and NADP⁺ cofactors by photosensitized electron transfer. *Photochemistry and photobiology*, 36(3), 283-290.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 34(18), 6003-13.
- Kabsch, W., Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22(12), 2577-637.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H., Persson, B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *European journal of biochemistry / FEBS*, 269(18), 4409-17.
- Kandell, R. L., Bernstein, C. (1991). Bile salt/acid induction of DNA damage in bacterial and mammalian cells: implications for colon cancer. *Nutrition and cancer*, 16(3-4), 227-38.
- Kano, M., Shoda, J., Irimura, T., Ueda, T., Iwasaki, R., Urasaki, T., Kawauchi, Y., Asano, T., Matsuzaki, Y., Tanaka, N. (1998). Effects of long-term ursodeoxycholate administration on expression levels of secretory low-molecular-weight phospholipases A2 and mucin genes in gallbladders and biliary composition in patients with multiple cholesterol stones. *Hepatology*, 28(2), 302-13.
- Kavanagh, K. L., Jörnvall, H., Persson, B., Oppermann, U. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 65(24), 3895-906.
- Khare, S., Cerda, S., Wali, R. K., von Lintig, F. C., Tretiakova, M., Joseph, L., Stoiber, D., Cohen, G., Nimmagadda, K., Hart, J., Sitrin, M. D., Boss, G. R., Bissonnette, M. (2003). Ursodeoxycholic acid inhibits Ras mutations, wild-type Ras activation, and cyclooxygenase-2 expression in colon cancer. *Cancer research*, 63(13), 3517-23.
- Kim, I. S., Myung, S. J., Lee, S. S., Lee, S. K., Kim, M. H. (2003). Classification and nomenclature of gallstones revisited. *Yonsei medical journal*, 44(4), 561-70.

- King, E. L., Altman, C. (1956). A Schematic Method of Deriving the Rate Laws for Enzyme-Catalyzed Reactions. *The journal of physical chemistry*, 60(10), 1375-1378.
- King, M. T. (2003). Thermodynamics of the reduction of NADP with 2-propanol catalyzed by an NADP-dependent alcohol dehydrogenase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 410(2), 280-286.
- Kirschner, A., Bornscheuer, U. T. (2008). Directed evolution of a Baeyer-Villiger monooxygenase to enhance enantioselectivity. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(3), 465-72.
- Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409(6817), 241-6.
- Koeller, K. M., Wong, C. H. (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature*, 409(6817), 232-40.
- Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A., Deckwer, W. D. (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 39(1), 59-65.
- Koschorreck, K., Schmid, R. D., Urlacher, V. B. (2009). Improving the functional expression of a *Bacillus licheniformis* laccase by random and site-directed mutagenesis. *BMC biotechnology*, 9, 12.
- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., Faber, K. (2004a). Biocatalytic oxidation of primary and secondary alcohols. *Advanced synthesis catalysis*, 346(23), 125-142.
- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., Faber, K. (2004b). Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Current opinion in chemical biology*, 8(2), 120-6.
- Kurtzman, A. L., Govindarajan, S., Vahle, K., Jones, J. T., Heinrichs, V., Patten, P. A. (2001). Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins. *Current opinion in biotechnology*, 12(4), 361-70.
- Kusterer, A. (2007). Reaktionstechnische Optimierung von Parallelreaktoren für kontrollierte Bioprozesse. *Dissertation an der Technischen Universität München*.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-5.
- Lax, E. R. (1987). Mechanisms of physiological and pharmacological sex hormone action on the mammalian liver. *Journal of steroid biochemistry*, 27(4-6), 1119-1128.
- Lee, S. Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology*, 14(3), 98-105.
- Lee, S. K., Kim, M.H. (2009). Updates in the treatment of gallstones. *Expert review of gastroenterology hepatology*, 3(6), 649-60.
- Lengeler, J. W., Drews, G., Schlegel, H. G. (1999). *Biology of the Prokaryotes*. Stuttgart: Thieme.

- Leverrier, P., Dimova, D., Pichereau, V., Auffray, Y., Boyaval, P., Jan, G. (2003). Susceptibility and adaptive response to bile salts in *Propionibacterium freudenreichii*: physiological and proteomic analysis. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), 3809-18.
- Li, T., Wang, N., Li, S., Zhao, Q., Guo, M. (2007). Optimization of covalent immobilization of pectinase on sodium alginate support. *Science and technology*, 1413-1416.
- Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. (2006). *Industrial Biotransformations* (2nd ed.). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA.
- Liu, L., Aigner, A., Schmid, R. D. (2011). Identification, cloning, heterologous expression, and characterization of a NADPH-dependent 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Collinella aerofaciens*. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(1), 127-35.
- Lottspeich, F., Zorbas, H., (Ed.) (1998). *Bioanalytik*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lundeen, S. G., Savage, D. C. (1990). Characterization and purification of bile salt hydrolase from *Lactobacillus* sp. strain 100-100. *Journal of bacteriology*, 172(8), 4171-7.
- Löffler, G., Petrides, P. E. (1998). *Biochemie und Pathobiochemie*. (6th Ed.). Berlin: Springer.
- Macdonald, I. A., Jellett, J. F., Mahony, D. E. (1979). 12 α -Hydroxysteroid dehydrogenase from *Clostridium* group P strain C48-50 ATCC No. 29733: partial purification and characterization. *Journal of lipid research*, 20(2), 234-9.
- Macdonald, I. A., Meier, E. C., Mahony, D. E., Costain, G. A. (1976). 3 α -, 7 α - and 12 α -hydroxysteroid dehydrogenase activities from *Clostridium perfringens*. *Biochimica et biophysica acta*, 450(2), 142-53.
- Macdonald, I. A., Roach, P. D. (1981). Bile induction of 7 α - and 7 β -hydroxysteroid dehydrogenases in *Clostridium absonum*. *Biochimica et biophysica acta*, 665(2), 262-9.
- Macdonald, I. A., Williams, C. N., Mahony, D. E. (1973). 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli* B: preliminary studies. *Biochimica et biophysica acta*, 309(2), 243-53.
- Macdonald, I., Mahony, D., Jellett, J., Meier, C. (1977). Nad-dependent 3 α - and 12 α -hydroxysteroid dehydrogenase activities from *Eubacterium lentum* atcc no. 25559. *Biochimica et biophysica acta (BBA) - Lipids and lipid metabolism*, 489(3), 466-476.
- Machielsen, R., Leferink, N. G. H., Hendriks, A., Brouns, S. J. J., Hennemann, H.G., Daussmann, T., van der Oost, J. (2008). Laboratory evolution of *Pyrococcus furiosus* alcohol dehydrogenase to improve the production of (2S,5S)-hexanediol at moderate temperatures. *Extremophiles*, 12(4), 587-94.
- Mahony, D. E., Meier, C. E., Macdonald, I. A., Holdeman, L. V. (1977). Bile salt degradation by nonfermentative clostridia. *Applied and environmental microbiology*, 34(4), 419-23.
- Mallonee, D. H., Hylemon, P. B. (1996). Sequencing and expression of a gene encoding a bile acid transporter from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *Journal of bacteriology*, 178(24), 7053-8.

- Maser, E., Möbus, E., Xiong, G. (2000). Functional expression, purification, and characterization of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *Biochemical and biophysical research communications*, 272(2), 622-8.
- Maton, P. N., Iser, J. H., Reuben, A., Saxton, H. M., Murphy, G. M., Dowling, R. H. (1982). Outcome of chenodeoxycholic acid (CDCA) treatment in 125 patients with radiolucent gallstones. Factors influencing efficacy, withdrawal, symptoms and side effects and post-dissolution recurrence. *Medicine*, 61(2), 86-97.
- May, O., Nguyen, P. T., Arnold, F. H. (2000). Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nature biotechnology*, 18(3), 317-20.
- Medici, A., Pedrini, P., Bianchini, E., Fantin, G., Guerrini, A., Natalini, B., Pellicciari, R. (2002). 7 α -OH epimerisation of bile acids via oxido-reduction with *Xanthomonas maltophilia*. *Steroids*, 67(1), 51-6.
- Meredith, T. J., Williams, G. V., Maton, P. N., Murphy, G. M., Saxton, H. M., Dowling, R. H. (1982). Retrospective comparison of "Cheno" and "Urso" in the medical treatment of gallstones. *Gut*, 23(5), 382-9.
- Michaelis, L., Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49(333-369), 352.
- Monte, M. J. (2009). Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World Journal of Gastroenterology*, 15(7), 804.
- Montgomery, D. C. (2009). *Design and Analysis of Experiments*. (7th ed.). New York, USA: Wiley.
- Monti, D., Ferrandi, E. E., Zanellato, I., Hua, L., Polentini, F., Carrea, Giacomo, *et al.* (2009). One-Pot Multienzymatic Synthesis of 12-Ketoursodeoxycholic Acid: Subtle Cofactor Specificities Rule the Reaction Equilibria of Five Biocatalysts Working in a Row. *Advanced synthesis catalysis*, 351(9), 1303-1311.
- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T., Chothia, C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of molecular biology*, 247(4), 536-40.
- Möbus, E., Maser, E. (1998). Molecular cloning, overexpression, and characterization of steroid-inducible 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. A novel member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *The journal of biological chemistry*, 273(47), 30888-96.
- Nare, B., Hardy, L. W., Beverley, S. M. (1997). The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. *The journal of biological chemistry*, 272(21), 13883-91.
- Nguyen, D. L., Juran, B. D., Lazaridis, K. N. (2010). Primary biliary cirrhosis. *Best practice research. Clinical gastroenterology*, 24(5), 647-54.
- Nishioka, T., Tazuma, S., Yamashita, G., Kajiyama, G. (1999). Partial replacement of bile salts causes marked changes of cholesterol crystallization in supersaturated model bile systems. *The biochemical journal*, 340 (Pt 2), 445-51.

- NIST/SEMATECH. (2010). *e-Handbook of Statistical Methods*.
- Noh, D. O., Gilliland, S. E. (1993). Influence of bile on cellular integrity and beta-galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of dairy science*, 76(5), 1253-9.
- Nordling, E., Jörnvall, H., Persson, B. (2002). Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modeling. *European journal of biochemistry / FEBS*, 269(17), 4267-76.
- Obon, J. M., Casanova, P., Manjon, A., Fernandez, V. M., Iborra, J. L. (1997). Stabilization of Glucose Dehydrogenase with Polyethyleneimine in an Electrochemical Reactor with NAD(P)⁺ Regeneration. *Biotechnology progress*, 13(5), 557-561.
- Oppermann, U. C., Filling, C., Berndt, K. D., Persson, B., Benach, J., Ladenstein, R., Jörnvall, H. (1997). Active site directed mutagenesis of 3 beta/17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase establishes differential effects on short-chain dehydrogenase/reductase reactions. *Biochemistry*, 36(1), 34-40.
- Oppermann, U. C., Maser, E. (1996). Characterization of a 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 241(3), 744-9.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., Jörnvall, H. (2003). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-biological interactions*, 143-144, 247-53.
- Paumgartner, G., Sauerbruch, T. (1991). Gallstones : pathogenesis. *Science*, 1117-1121.
- Persson, B., Jeffery, J., Jörnvall, H. (1991). Different segment similarities in long-chain dehydrogenases. *Biochemical and biophysical research communications*, 177(1), 218-23.
- Persson, B., Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H. (2003). Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-biological interactions*, 143-144, 271-8.
- Peters, J. (1998). Dehydrogenases - Characteristics, Design of Reaction Conditions, and Applications. In H. Rehm G. Reed (Eds.), *Biotechnology, Biotransformations I* (2nd ed.). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Petersen, M., Kiener, A. (1999). Biocatalysis. *Green Chemistry*, 1(2), 99-106.
- Ponticorvo, L., Rittenberg, D., Bloch, K. (1949). The utilization of acetate for the synthesis of fatty acids, cholesterol, and protoporphyrin. *The journal of biological chemistry*, 179(2), 839-42.
- Powell, A. A., LaRue, J. M., Batta, A. K., Martinez, J. D. (2001). Bile acid hydrophobicity is correlated with induction of apoptosis and/or growth arrest in HCT116 cells. *The biochemical journal*, 356(Pt 2), 481-6.
- Prabha, V., Gupta, M., Gupta, K. G. (1989). Kinetic properties of 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli* 080. *Canadian journal of microbiology*, 35(12), 1076-80.
- Prabha, V., Ohri, M. (2005). Review: Bacterial transformations of bile acids. *World journal of microbiology and biotechnology*, 22(2), 191-196.

- Prachayasittikul, V., Ljung, S., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Bülow, L. (2006). NAD(H) recycling activity of an engineered bifunctional enzyme galactose dehydrogenase/lactate dehydrogenase. *International journal of biological sciences*, 2(1), 10-6.
- Prouty, A. M., Schwesinger, W. H., Gunn, J. S. (2002). Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infection and immunity*, 70(5), 2640-9.
- Pumbwe, L., Skilbeck, C. A., Nakano, V., Avila-Campos, M. J., Piazza, R. M. F., Wexler, H. M. (2007). Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microbial pathogenesis*, 43(2-3), 78-87.
- Purkarthofer, T., Gruber, K., Gruber-Khadjawi, M., Waich, K., Skranc, W., Mink, D., Griengl, H. (2006). A biocatalytic Henry reaction--the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* also catalyzes nitroaldol reactions. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 45(21), 3454-6.
- Puskeiler, R. (2004). Miniaturisierte Parallelreaktoren zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung. *Dissertation an der Technischen Universität München*.
- Puskeiler, R., Kaufmann, K., Weuster-Botz, D. (2005). Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnology and bioengineering*, 89(5), 512-23.
- Puskeiler, R., Kusterer, A., John, G. T., Weuster-Botz, D. (2005). Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with *Escherichia coli*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 42(Pt 3), 227-35.
- Rajagopalan, N., Lindenbaum, S. (1982). The binding of Ca²⁺ to taurine and glycine-conjugated bile salt micelles. *Biochimica et biophysica acta*, 711(1), 66-74.
- Rao, S. T., Rossmann, M. G. (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *Journal of molecular biology*, 76(2), 241-56.
- Ridlon, J. M., Kang, D.J., Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research*, 47(2), 241-59. .
- Russo, M. W., Wei, J. T., Thiny, M. T., Gangarosa, L. M., Brown, A., Ringel, Y., Shaheen, N. J., Sandler, R. S.(2004). Digestive and liver diseases statistics, 2004. *Gastroenterology*, 126(5), 1448-53.
- Sakamoto, N., Kotre, A. M., Savageau, M. A. (1975). Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *Journal of bacteriology*, 124(2), 775-83.
- Salen, G., Colalillo, A., Verga, D., Bagan, E., Tint, G. S., Shefer, S. (1980). Effect of high and low doses of ursodeoxycholic acid on gallstone dissolution in humans. *Gastroenterology*, 78(6), 1412-8.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Samuelsson, B., Bergman, S., Bak, T. A., Varde, E., Westin, G. (1960). Preparation of Ursodeoxycholic Acid and 3 α ,7 β ,12 α -Trihydroxycholic Acid. Bile Acids and Steroids 94. *Acta chemica scandinavica*, 14, 17-20.
- Sankalia, M. G., Mashru, R. C., Sankalia, J. M., Sutariya, V. B. (2005). Papain Entrapment in Alginate Beads for Stability Improvement and Site-Specific Delivery : Physicochemical Characterization and Factorial Optimization Using Neural Network Modeling. *Aaps pharmscitech*, 6(2), 209-222.
- Sanyal, A. J., Shiffmann, M. L., Hirsch, J. I., Moore, E. W. (1991). Premicellar taurocholate enhances ferrous iron uptake from all regions of rat small intestine. *Gastroenterology*, 101(2), 382-9.
- Sawada, H., Kulprecha, S., Nilubol, N., Yoshida, T., Kinoshita, S., Taguchi, H. (1982). Microbial Production of Ursodeoxycholic Acid from Lithocholic Acid by *Fusarium equiseti* M41. *Applied and environmental microbiology*, 44(6), 1249-52.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409(6817), 258-68.
- Schmidt, T., Michalik, C., Zavrel, M., Spiess, A., Marquardt, W., Ansorge-Schumacher, M. B. (2010). Mechanistic model for prediction of formate dehydrogenase kinetics under industrially relevant conditions. *Biotechnology progress*, 26(1), 73-8.
- Schoemaker, H. E. (2003). Dispelling the Myths--Biocatalysis in Industrial Synthesis. *Science*, 299(5613), 1694-1697.
- Schroer, K., Zelic, B., Oldiges, M., Lütz, S. (2009). Metabolomics for biotransformations: Intracellular redox cofactor analysis and enzyme kinetics offer insight into whole cell processes. *Biotechnology and bioengineering*, 104(2), 251-60.
- Schubert, R., Jaroni, H., Schoelmerich, J., Schmidt, K. H. (1983). Studies on the mechanism of bile salt-induced liposomal membrane damage. *Digestion*, 28(3), 181-90.
- Schubert, T., Hummel, W., Müller, M. (2002). Highly Enantioselective Preparation of Multifunctionalized Propargylic Building Blocks. *Angewandte Chemie*, 114(4), 656-659.
- Schügerl, K., Bellgardt K.H. (2000). *Bioreaction Engineering* (1st ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Scrutton, N. S., Berry, A., Perham, R. N. (1990). Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature*, 343(6253), 38-43.
- Seelbach, K., Riebel, B., Hummel, W., Kula, M., Tishkov, V., Egorov, A., Wandrey, C., Kragl, U. (1996). A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Letters*, 37(9), 1377-1380.
- Serov, A. E., Popova, A. S., Fedorchuk, V. V., Tishkov, V. I. (2002). Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The biochemical journal*, 367(Pt 3), 841-7.
- Shaffer, E. A. (2006). Gallstone disease: Epidemiology of gallbladder stone disease. *Best practice research. Clinical gastroenterology*, 20(6), 981-96.

- Sharkey, M. A., Engel, P. C. (2008). Apparent negative co-operativity and substrate inhibition in overexpressed glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 281(2), 132-9.
- Sherrod, J. A., Hylemon, P. B. (1977). Partial purification and characterization of NAD-dependent 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Biochimica et biophysica acta*, 486(2), 351-8.
- Silbernagl, S., Agamemnon, D. (2003). *Taschenatlas der Physiologie* (6th ed.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Sin, G., Woodley, J. M., Gernaey, K. V. (2009). Application of modeling and simulation tools for the evaluation of biocatalytic processes: a future perspective. *Biotechnology progress*, 25(6), 1529-38.
- Skålhegg, B. A. (1974). On the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. Purification and properties. *European journal of biochemistry / FEBS*, 46(1), 117-25.
- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M. R., Pohl, M. (2000). Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267(5), 1280-9.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Stemmer, W. P. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), 10747-51.
- Stiehl, A., Czygan, P., Kommerell, B., Weis, H. J., Holtermüller, K. H. (1978). Ursodeoxycholic acid versus chenodeoxycholic acid. Comparison of their effects on bile acid and bile lipid composition in patients with cholesterol gallstones. *Gastroenterology*, 75(6), 1016-20.
- Straathof, A. J., Heijnen, J. J. (1996). New constraints between kinetic parameters explain the (Un)identifiability of enzymatic rate constants. *Biotechnology and bioengineering*, 52(3), 433-7.
- Sutherland, J. D., Macdonald, I. A. (1982). The metabolism of primary, 7-oxo, and 7 β -hydroxy bile acids by *Clostridium absonum*. *Journal of lipid research*, 23(5), 726-32.
- Sutherland, J. D., Macdonald, I. A., Forrest, T. P. (1982). The enzymic and chemical synthesis of ursodeoxycholic and chenodeoxycholic acid from cholic acid. *Preparative biochemistry*, 12(4), 307-21.
- Sutherland, J. D., Williams, C. N. (1985). Bile acid induction of 7 α - and 7 β -hydroxysteroid dehydrogenases in *Clostridium limosum*. *Journal of lipid research*, 26(3), 344-50.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A., Mitsui, Y. (1996). Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family. *Structure*, 4(1), 33-45.

- Tanaka, N., Nonaka, T., Tanabe, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D., Mitsui, Y. (1996). Crystal structures of the binary and ternary complexes of 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 35(24), 7715-30.
- Thanassi, D. G., Cheng, L. W., Nikaido, H. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 179(8), 2512-8.
- Tishkov, V. I., Popov, V. O. (2004). Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochemistry. Biokhimiā*, 69(11), 1252-67.
- Tishkov, V. I., Popov, V. O. (2006). Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomolecular engineering*, 23(2-3), 89-110.
- Valle, F., Becerril, B., Chen, E., Seeburg, P., Heyneker, H., Bolivar, F. (1984). Complete nucleotide sequence of the glutamate dehydrogenase gene from *Escherichia coli* K-12. *Gene*, 27(2), 193-9.
- Van der Donk, W. A. , Zhao, H. (2003). Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Current opinion in biotechnology*, 14(4), 421-6.
- Van Eldere, J., Celis, P., De Pauw, G., Lesaffre, E., Eyssen, H. (1996). Tauroconjugation of cholic acid stimulates 7 alpha-dehydroxylation by fecal bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 62(2), 656-61.
- Van Velkinburgh, J. C., Gunn, J. S. (1999). PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infection and immunity*, 67(4), 1614-22.
- Vartanian, J. P., Henry, M., Wain-Hobson, S. (1996). Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic acids research*, 24(14), 2627-31.
- Voordouw, G., van der Vies, S. M. , Themmen, A. P. (1983). Why are two different types of pyridine nucleotide transhydrogenase found in living organisms? *European journal of biochemistry / FEBS*, 131(3), 527-33.
- Ward, A., Brogden, R. N., Heel, R. C., Speight, T. M., Avery, G. S. (1984). Ursodeoxycholic acid: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 27(2), 95-131.
- Warming, S., Costantino, N., Court, D. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. (2005). Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic acids research*, 33(4), e36.
- Wells, J. E., Hylemon, P. B. (2000). Identification and characterization of a bile acid 7alpha-dehydroxylation operon in *Clostridium* sp. strain TO-931, a highly active 7alpha-dehydroxylating strain isolated from human feces. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), 1107-13.
- Wermuth, B., Kaplan, N. O. (1976). Pyridine nucleotide transhydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: purification by affinity chromatography and physicochemical properties. *Archives of biochemistry and biophysics*, 176(1), 136-43.

- Wichmann, R., Vasic-Racki, D. (2005). Cofactor Regeneration at the Lab Scale. In U. Kragl (Ed.), *Technology Transfer in Biotechnology* (Vol. 92, pp. 225-260). Springer Berlin / Heidelberg.
- Wichmann, R., Wandrey, C., Bückmann, A. F., Kula, M.R. (1981). Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(12), 2789-2802.
- Wierenga, R. K., Terpstra, P., Hol, W. G. (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *Journal of molecular biology*, 187(1), 101-7.
- Wierenga, R. K., De Maeyer, M. C. H., Hol, W. G. J. (1985). Interaction of pyrophosphate moieties with alpha-helices in dinucleotide-binding proteins. *Biochemistry*, 24(6), 1346-1357.
- Wilks, H. M., Hart, K. W., Feeney, R., Dunn, C. R., Muirhead, H., Chia, W. N., *et al.* (1988). A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework. *Science*, 242(4885), 1541-4.
- Willeman, W. F., Gerrits, P. J., Hanefeld, U., Brussee, J., Straathof, A. J. J., Van der Gen, A., Heijnen, J. J. (2002). Development of a process model to describe the synthesis of (R)-mandelonitrile by *Prunus amygdalus* hydroxynitrile lyase in an aqueous-organic biphasic reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 77(3), 239-47.
- Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., Mattes, R., Siemann, M., Altenbuchner, J. (2001). High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnology and bioengineering*, 73(2), 95-103.
- Woodyer, R., Zhao, H., van der Donk, W. A. (2005). Mechanistic investigation of a highly active phosphite dehydrogenase mutant and its application for NADPH regeneration. *The FEBS journal*, 272(15), 3816-27.
- Wyatt, P., Warren, S. (2007). *Organic Synthesis: Strategy and Control* (1st ed.). Hoboken: Wiley Sons.
- Yaoi, T., Miyazaki, K., Oshima, T., Komukai, Y., Go, M. (1996). Conversion of the coenzyme specificity of isocitrate dehydrogenase by module replacement. *Journal of biochemistry*, 119(5), 1014-8.
- Yoshimoto, T., Higashi, H., Kanatani, A., Lin, X. S., Nagai, H., Oyama, H., Kurazono, K., Tsuru, D. (1991). Cloning and sequencing of the 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of the expressed enzyme. *Journal of bacteriology*, 173(7), 2173-9.
- You, L., Arnold, F. H. (1996). Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein engineering*, 9(1), 77-83.
- Zavrel, M., Schmidt, T., Michalik, C., Ansorge-Schumacher, M., Marquardt, W., Büchs, J., Spiess, A. C. (2008). Mechanistic kinetic model for symmetric carbonylations using benzaldehyde lyase. *Biotechnology and bioengineering*, 101(1), 27-38.

- Zhang, H., Tang, J., Meng, X., Tsang, J., Tsang, T. K. (2005). Inhibition of bacterial adherence on the surface of stents and bacterial growth in bile by bismuth dimercaprol. *Digestive diseases and sciences*, 50(6), 1046-1051.
- Zhang, Y. W., Prabhu, P., Lee, J. K. (2010). Alginate immobilization of recombinant Escherichia coli whole cells harboring L-arabinose isomerase for L-ribulose production. *Bioprocess and biosystems engineering*, 33(6), 741-8.
- Zhao, H, Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A., Arnold, F. H. (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature biotechnology*, 16(3), 258-61.
- Ziegler, J., Brandt, W., Geissler, R., Facchini, P. J. (2009). Removal of substrate inhibition and increase in maximal velocity in the short chain dehydrogenase/reductase salutaridine reductase involved in morphine biosynthesis. *The journal of biological chemistry*, 284(39), 26758-67.

13 Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro (10 ⁻⁶)
12-Keto-CDCS	12-Keto-Chenodesoxycholsäure
ADH	Alkoholdehydrogenase(n)
ADH-TB	Alkoholdehydrogenase aus <i>Thermoanaerobium brockii</i>
ADH-TE	Alkoholdehydrogenase aus <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> JW200
Amp	Ampicillin
ARC	anabole Reduktionsladung (<i>anabolic reduction charge</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BTM	Biotrockenmasse
CDCS	Chenodesoxycholsäure
cm	Zentimeter
CRC	katabole Reduktionsladung (<i>catabolic reduction charge</i>)
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatografie
DHCS	Dehydrocholsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DOCS	Desoxycholsäure
Dr.	Doktor
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FDH	Formiatdehydrogenase
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Gramm/ Gravitationskonstante (9,81 m s ⁻²)
GA	Genetischer Algorithmus
GDH	Glucosedehydrogenase

G6PDH	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
GluDH	Glutamatdehydrogenase
h	Stunde(n)
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography)
HSDH	Hydroxysteroiddehydrogenase(n)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	kilo (10^3)
KNN	künstliches neuronales Netz
konz.	konzentriert
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	mega (10^6)
m	milli (10^{-3})/Meter
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning sites</i>
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
MTP	Mikrotiterplatte
n	nano (10^{-9})
NAD(P)H	Nicotinamadenindinukleotid(phosphat)
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
°C	Grad Celsius
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prof.	Professor
PTDH	Phosphitdehydrogenase
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase
RSM	<i>Response Surface Methodology</i>
RT	Raumtemperatur
SalR	Salutaridinreduktase
SDR	Short Chain Dehydrogenase(n) / Reduktase(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
sog.	sogenannt
sp.	species
STH	Lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase (<i>soluble pyridine nucleotide transhydrogenase</i>)
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris Buffered Saline)
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
TTN	<i>total turnover number</i>
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UDCS	Ursodesoxycholsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
w/v	Gewicht pro Volumen

14 Anhang

A.1 Tabellen

Tabelle 14.1: GA-optimierte Ansätze zur Prozessoptimierung der Cholsäureoxidation im Ganzzellverfahren mit modellbasierter Vorhersage des Umsatzes und der zu erwartenden Produktkonzentration. DAHP: Diammoniumhydrogenphosphat

Cholsäure, mM	Umsatz, %	Produkt, mM	2-Oxoglutarat, mM	DAHP, mM
90,2	100	90,2	286,9	176,6
97,0	100	97,0	282,1	173,2
99,8	100	99,8	284,3	173,8
101,6	100	101,6	283,3	169,7
104,9	100	104,9	278,1	166,9
110,0	100	110,0	279,2	170,6
113,8	100	113,8	278,9	166,2
120,5	99,4	119,7	266,4	166,1
123,5	99,2	122,4	271,9	171,2
126,2	98,8	124,7	275,3	165,4
128,6	98,6	126,8	270,6	158,2
131,3	98,5	129,3	265,2	146,5
136,2	98,1	133,6	264,9	150,7
138,7	98,0	136,0	263,3	140,2
140,0	98,0	137,2	263,2	139,8

Tabelle 14.2: Experimentelle Datenpunkte und gemessene Umsätze zur Modellvalidierung.

Datenpunkt	Dehydrocholsäure, mM	Formiat, mM	pH, -	Umsatz 3 h, -	Umsatz 48 h, -
R1	70,6	408,8	6,4	95,4 ± 1,5 %	98,9 ± 0,2 %
		Zu reproduzieren:		95,2 ± 0,3 %	
R2	204,4	408,8	6,4	18,8 ± 2,5 %	27,4 ± 4,2 %
		Zu reproduzieren:		22,7 ± 1,4 %	
1	194,1	138,4	7,0	8,3 ± 0,3 %	13,8 ± 0,3 %
2	241,0	165,9	6,4	6,9 ± 0,4 %	9,4 ± 0,7 %
3	51,7	164,4	6,4	95,8 ± 0,0 %	99,4 ± 0,2 %
4	61,6	428,4	7,0	96,0 ± 0,2 %	99,2 ± 0,2 %
5	156,7	416,5	7,6	26,2 ± 0,6%	29,8 ± 0,6 %
6	75,3	159,6	8,0	21,3 ± 0,9 %	42,0 ± 5,5 %
7	101,6	207,5	6,0	34,0 ± 1,0%	59,9 ± 2,7 %
8	137,1	468,2	8,0	11,3 ± 0,8 %	17,6 ± 0,5 %

Tabelle 14.3: Drei- und Einbuchstabencode der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

A.2 Vorversuche zur RSM-Modellierung der Ganzzelloxidation im Satzverfahren

Um die Grenzen des Modells festzulegen, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen an Substrat und Kosubstraten im 2 mL-Maßstab eingesetzt. Die Reaktionen wurden 96 h bei Raumtemperatur und 250 rpm unter Verwendung von $18,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ des Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ *KanR*⁺ *pET22b(+)-12 α -hsdh* *pCOLA(mod)-sth* durchgeführt.

Tabelle 14.4: Vorversuche zur Festlegung der Grenzen der Konzentration für Cholsäure, 2-Oxoglutarat und Diammoniumhydrogenphosphat für die Optimierung mittels empirischen Polynoms 2.Ordnung.

Ansatz	Cholsäure, mM	2-Oxoglutarat, mM	Diammoniumhydrogenphosphat, mM	Umsatz, %
1	150	375	200	80,5
2	127	317	200	84,5
3	110	235	155	98,7
4	110	235	100	96,6
5	110	85	155	67,9

In Tabelle 14.4 zeigte die Biotransformation von 110 mM Cholsäure in Ansatz 3 einen Umsatz von 98,7 % und in Ansatz 4 von 96,6 %. 150 mM Cholsäure wurde mit einer höheren Konzentration an 2-Oxoglutarat nur zu 80,5 % umgesetzt. Deshalb wurden die Modellgrenzen für Cholsäure auf 90 – 140 mM festgelegt. Da in Ansatz 5 beim Einsatz von 110 mM Cholsäure nur ein Umsatz von 67,9 % beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass eine 2-Oxoglutaratkonzentration von über 85 mM erforderlich ist. Wie bereits in Tabelle 7.1 erläutert, stellt 2-Oxoglutarat ein teureres Kosubstrat dar, weshalb die Konzentration im Prozess möglichst gering gehalten werden sollte. Daher wurden die Grenzen für 2-Oxoglutarat auf 175 – 375 mM gesetzt. Der höchste Umsatz konnte bei einer Diammoniumhydrogenphosphat-Konzentration von 155 mM erzielt werden, bei 200 mM zeigten sich geringere Umsätze. Aus diesem Grund wurde hier der Modellraum auf 100 – 180 mM begrenzt.

A.3 Geräte

Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Hersteller
AccuChek [®] , Glucosebestimmungsgerät	Roche, Mannheim
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	C.B.S. Scientific Co., Del Mar, USA
Analysewaage, Explorer	Ohaus, Pine Brook, USA
Blutzucker-Messgerät Accu-Chek	Roche Diagnostics, Mannheim
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Eismaschine AF80	Scotsman, Mailand, Italien
Elektrophorese Power Supply E802	Consort, Turnhout, Belgien
Elektroporationsgerät, Gene Pulser [™]	Bio-Rad, München
Feinwaage, Explorer	Ohaus, Pine Brook, USA
Flachbettscanner	Hewlett-Packard, Böblingen
Gefrierschrank -20°	C Liebherr, Biberach an der Riss
Gefrierschrank, -80 °C	GFL, Hamburg
Gerät	Bezugsquelle
Heizblock, Standard Heatblock	VWR, Darmstadt
Heizrührer, Monotherm	Variomag, Daytona Beach, USA
Inkubator, Schüttelinkubator Multitron Infors,	Bottmingen, Schweiz
Kühlbrutschrank KB 400	Binder, Tuttlingen
Küvettenphotometer, Biomate	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Mehrfachrührblock	H+P, Oberschleißheim
Mehrfachrührplatte, Poly V	ariomag, Daytona Beach, USA
Mikrotiterplatteninkubator TiMix5 control	Bühler, Hechingen
Mikrotiterplatten-Photometer, EL808	BioTek Instruments, Winooski, USA
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
MS1 Minishaker für Mikrotiterplatten	IKA, Staufen
Nano Drop, ND-1000 Spektralphotometer	peqlab, Biotechnologie, Erlangen
PCR-Gerät, Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Schott, Mainz
Photometer, Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Österreich
Pickroboter, Biopick automated colony picking system	Biorobotics, Woburn, USA
Pipetten 0,1 - 1000 µL	Brand, Wertheim
Pipetten 2 - 1000 µL	Brand, Wertheim
Pipettierroboter, Janus Automated Workstation	Perkin-Elmer, Rodgau, Jügesheim
Präzisionswaage Explorer	Ohaus, Pine Brook, USA

Schwingmühle, MM 200	Retsch, Haan
SDS-Gelelektrophorese-Kammer	Whatman Biometra, Göttingen
SDS-Gelkammer	Bio-Rad, München
SDS-Geltrockner, Modell583 Gel Dryer	Bio-Rad, Hercules, USA
Sterilbank, Variolab, Mobilion W90	Waldner Electronics, Wangen
Thermomixer, comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifugen, 5417 R, 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Ultraschalldesintegrator, Branson Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Vorkulturenschüttler, KS 10	Edmund Bühler, Tübingen
Vortexer, Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Vortexer, Reax top, Heidolph	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	GFL Hamburg
White/2UV Transilluminator	UVP, Upland, USA
Wippe	Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Garching
Zentrifuge, 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Biofuge Stratos	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge, Rotixa 50 R S	Hettich, Tuttlingen

Rührkesselreaktorsystem

Gerät	Bezugsquelle
3 x 6 Blattscheibenrührer	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Easy Load Masterflex L/S 7518-00	Isamtec SA, Glattbrugg, Schweiz
Kontrolleinheit	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
pH Elektrode 405-DPAS-SC-K8S/325	Mettler-Toledo, Gießen
pO ₂ -Elektrode InPro 6000	Mettler-Toledo, Gießen
Reaktorwaage QC35EDE-S	Sartorius, Göttingen
Rührkesselreaktorsystem	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Software Iris NT Version 5.02.708.0997	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Zulauf-Waage Scout Pro	Ohaus, Pine Brook, USA

HPLC-Analytik

Gerät	Bezugsquelle
HPLC Autosampler, Finnigan Surveyor Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPLC LC Pumpe, Finnigan Surveyor Plus	Thermo Fisher Scientific,

HPLC PDA Detektor, Finnigan Surveyor Plus	Waltham, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPLC RI Detektor, Finnigan Surveyor Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPLC Säule, Hibar 125-4 Purospher RP-18e (5 µm)	Merck, Darmstadt
HPLC Säule, Hibar 250-4 Purospher RP-18e (5 µm)	Merck, Darmstadt

Milliliter-Rührkesselreaktorsystem

Gerät	Bezugsquelle
Bioreaktorblock mit Sterilgasabdeckung und Rührer	2mag, München
Einweg-mL-Bioreaktor	PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg
Freedom Evo Workstation	Tecan, Männedorf, Schweiz
Gasstation, WMR 4008	WMR
Kühleinheit	G. Heinemann, Schwäbisch Hall
Optosensorik	PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg
Steuergerät, control unit BIOREACTOR	2mag, München
Stofffluss-Kontrolleinheit Smart Mass flow	Brooks

FPLC-Anlage und dazugehörige Komponenten

Gerät	Bezugsquelle
GradiFrac FPLC-Einheit	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HisTrap-Säule HP 5 mL	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
IV-7 Ventil	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Pumpe P50	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
UV-Spectrophotometer LKB Uvicord S II 280 nm Filter	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

A.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
96 Well Optical Bottom Plates	Nunc, Wiesbaden
DC-Alufolie, Kieselgel 60 F ₂₅₄	Merck, Darmstadt
Glasperlen, Ø 0,25-0,50 mm	Roth, Karlsruhe
Glaswaren	Schott, Mainz
HPLC-Vials	VWR, Darmstadt
Kreuzmagnetrührstäbchen	VWR, Darmstadt
Küvetten	Ratiolab, Dreieich
Parafilm	Pechinery, Wisconsin, USA
Petrischalen	Starlab, Helsinki, Finnland
Pipettenspitzen (kristallklar, gelb, blau)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen (kristallklar, gelb, blau)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Probengläschen, Glas, klar	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (0,5, 1 und 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 und 50 mL)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Spritzen	B. Braun, Melsungen
Spritzenfilter Sterilfilter (0,2 µm)	Millipore, Molsheim, Frankreich
Vivaspin 20 mL Zentrifugalkonzentrator, Größenausschlussgrenze 10 kDa	Sartorius, Göttingen

A.5 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle	Produktnummer
12-Keto-Chenodesoxycholsäure	PharmaZell	-
12-Keto-Ursodesoxycholsäure	PharmaZell	-
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck	110110
2-Oxoglutarsäure	Roth	5901
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Roth	6979
3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure	PharmaZell	-
7,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure	PharmaZell	-
7-Keto-Desoxycholsäure	PharmaZell	-
Aceton	Roth	5025

Acetonitril	Roth	8825
Ammoniak, 25 %	Roth	5460
Ammoniumchlorid	Roth	5470
Ammoniumperoxodisulfat	Merck	103762
Ammoniumsulfat	Merck	101217
Ampicillin Natriumsalz	Roth	K029
Antifoam 204	Sigma	A6426
Asparaginsäure	Roth	T202
b-Mercaptoethanol	Merck	115433
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Merck	102382
Chloramphenicol	Roth	3886
Cholsäure	PharmaZell	-
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck	102539
Coomassie Blau G 250	Roth	9598
Coomassie Blau R 250	Roth	3862
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	Merck	102790
Dehydrocholsäure	PharmaZell	-
D-Glucose-Monohydrat	Roth	6780
Diammoniumhydrogencitrat	Merck	101155
Diammoniumhydrogenphosphat	Roth	0268
Dichlormethan	Roth	8424
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth	P749
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	4720
EDTA-Na ₂ x 2 H ₂ O	Merck	108418
Essigsäure	Merck	100056
Ethanol	Roth	5054
Ethidiumbromidlösung 1,0 %	Roth	2218
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	Merck	103943
Glutaraldehyd	Fluka	49630
Glycerin	Sigma	3783
Hefeextrakt OHLY KAT	Dt. Hefewerke, Nürnberg	253-3
Imidazol	Alfa Aesar	A10221
Isopropanol	Roth	9866
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth	2316
Kaliumacetat	Roth	HN10.1
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	3904
Kaliumhydroxid		6751
Kanamycinsulfat	Roth	T832

Lysozym	Fluka	62971
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Merck	105886
Methanol	Roth	P717
MnSO ₄ x H ₂ O	Merck	105941
Molybdätosphorsäure	Roth	4440
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth	2367
Na ₂ -EDTA	Roth	X9861
NAD	Roth	AE11
NADH-Na ₂	Roth	AE12
NADPH-Na ₄	Roth	AE14
NADP-Na ₂	Roth	AE13
Natriumalginat	Roth	9180
Natriumchlorid	Roth	P029
Natriumcholat	Sigma-Aldrich	C1254
Natriumcitrat	Fluka	71497
Natriumdehydrocholat	Fluka	30850
Natriumdihydrogenphosphat x H ₂ O	Roth	T879
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck	817034
Natriumformiat	Fluka	71540
Natriumhydroxid	Roth	9356
Orange G	Fluka	75380
ortho-Phosphorsäure 85 %	Merck	100563
Pepton aus Casein	Roth	8986
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)		6367
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich	R2252
Salzsäure 32 %	Merck	100319
Schwefelsäure	Merck	100731
Threonin	Merck	108411
thioNAD ⁺	Sigma-Aldrich	T7375
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan- hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth	9090
Zinksulfat x 7 H ₂ O	Merck	108883

A.6 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion, Martinsried, erworben.

Klonierungsprimer

Name	Sequenz 5' → 3'
7β fwd EcoRI	GCGAATTCGTGAAAGGAGATATACATGAACCTGAGGGGAGA AGTACGG
7β fwd NcoI	CATGCCATGGATGAACCTGAGGGGAGAAGTACG
A16K17- Deletion_Forward	GCGGGGGCAAGTCGATCGGCTACG
A16K17- Deletion_Revers	CGTAGCCGATCGACTTGCCCCCGC
BaiG_forward	GGAATTCCATATGAGCACCGTAGCCAA
BaiG_revers_XhoI	CCGCTCGAGTTATGCCTCTTTCTTCT
BglII-pET22b_for	GAAGATCTCGATCCCGCGAAATT
FDH fwd HindIII	CCCAAGCTTAAGGAGATATATATGGCAAAGGTCCTGTGCGT TCTT
FDH fwd NcoI	CATGCCATGGATGGCAAAGGTCCTGTGCGTTCTT
FDH rev NotI	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGACCGCCTTCTTGAACCTGG
pGT_Cm-res_forw	GTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAA TTAATTCTTACGCCCGCCCTGCCA
pGT_Cm-res_rev	TGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAA GGAAGAGTATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCAC
S 7β rev HindIII	CCCAAGCTTCTAGTCGCGGTAGAACGA
SDRneu_forward_kurz	GGTATTCCATATGATCTTTGACGGAAAGGTCGC
SDRneu_revers_BamHI	CGGGATCCCTAGGGGCGCTGACCC
Sth-pf5_BamHI_rev	CGGGATCCTCAAAAAGCCGGTTGAGGCCATC
Sth-pf5_PciI_forw	CAGTACATGTCGATGGCTGTCTACAACCTACGACGTA

Mutageneseprimer

Name	Sequenz 5' → 3'
R39L-EM_forw	GTCCTGACCGGCTTAAACGAGCAGA
R39L-EM_rev	TCTGCTCGTTTAAAGCCGGTCAGGAC
G38A_forw	TGGTCCTGACCGCCAGAAACGAGCA
G38A_rev	TGCTCGTTTCTGGCGGTCAGGACCA
G38E_forw	TGGTCCTGACCGAAAGAAACGAGCAGAAA
G38E_rev	TTTCTGCTCGTTTCTTTTCGGTCAGGACCA
G38S_forw	TGGTCCTGACCAGCAGAAACGAGCAGAAA
G38S_rev	TTTCTGCTCGTTTCTGCTGGTCAGGACCA
G38F_forw	TGGTCCTGACCTTCAGAAACGAGCAGAAA
G38F_rev	TTTCTGCTCGTTTCTGAAGGTCAGGACCA
G38D_forw	CTGGTCCTGACCGACAGAAACGAGC

G38D_rev	GCTCGTTTCTGTCCGGTCAGGACCAG
G38D_R39L_forw	GTCCTGACCGACTTAAACGAGCAGAAAC
G38D_R39L_rev	GTTTCTGCTCGTTTAAAGTCGGTCAGGAC
G38E_R39I_forw	TGGTCCTGACCGAAATAAACGAGCAGAACT
G38E_R39I_rev	AGTTTCTGCTCGTTTATTTCCGGTCAGGACCA
G38E_R39L_forw	TGGTCCTGACCGAACTAAACGAGCAGAAAC
G38E_R39L_rev	GTTTCTGCTCGTTTAGTTCCGGTCAGGACCA
G38D_R39I_forw	TGGTCCTGACCGACATAAACGAGCAGAACT
G38D_R39I_rev	AGTTTCTGCTCGTTTATGTCCGGTCAGGACCA
S18G_forw	GGCAAGGCCAAAGGGATCGGCTACG
S18G_rev	CGTAGCCGATCCCTTTGGCCTTGCC
A16G_S18G_forw	GGGGGCAAGGGCAAAGGGATCGGCT
A16G_S18G_rev	AGCCGATCCCTTTGCCCTTGCCCC
A16G_forw	GGGGCAAGGGCAAATCGATCGGCTA
A16G_rev	TAGCCGATCGATTTGCCCTTGCCCC
A16K17-Del_S18G_forw	GGGGCAAGGGGATCGGCTACGGCAT
A16K17-Del_S18G_rev	ATGCCGTAGCCGATCCCTTGCCCC
pCOLA-cm_delNcoI_forw	GCGTATAATATTTGCCTATGGTGAAAACGGG
pCOLA-cm_delNcoI_rev	CCCGTTTTACCATAGGCAAATATTATACGC
QC_pET22b_delBamHI_forw	GCTCGAATTCGGTTCCTAGGGGCG
QC_pET22b_delBamHI_rev	CGCCCCTAGGGAACCGAATTCGAGC
QC_BamHI309_forw	GTCGGCCTCGGGGATCCCCCTGTCC
QC_BamHI309_rev	GGACAGGGGGATCCCCGAGGCCGAC
7beta mut G39A fwd	CGTCGTCATGGTCGCCCCGTCGCGAGG
7beta mut G39A rev	CCTCGCGACGGGCGACCATGACGACG
7beta mut G39S fwd	CGTCGTCATGGTCAGCCGTCGCGAGG
7beta mut G39S rev	CCTCGCGACGGCTGACCATGACGACG

Sequenzieroligonukleotide

Zur Sequenzierung wurden im Allgemeinen die Standard-Sequenzierungsoligonukleotide der Firma GATC Biotech GmbH, Konstanz, verwendet. Falls diese nicht geeignet wurden, wurden die folgende Oligonukleotide verwendet:

Name	Sequenz 5' → 3'
pCOLA1_fw	GGATCTCGACGCTCTCCCT
pCOLA1_rev	GATTATGCGGCCGTGTACAA
pCOLA2_fw	TTGTACACGGCCGCATAATC
pCOLA-res-gene-seq	TCCGCAAGTGGCACTTTT

Oligonukleotide zum Genknockout der 7 α -HSDH in E. coli

Name	Sequenz 5' → 3'
EBS1d_7 α	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGTCATGTTTAACTTACCTTTCTTTGT
EBS2_7 α	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTTCCTATCGATAGAGGAAAGTGTCT
IBS_7 α	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATAGGACGTCATGGTGCGCCCAGATAGGGTG

A.7 Kitsysteme und Standards

Kitsystem	Bezugsquelle
100 bp DNA-Leiter	NEB, Frankfurt
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
GeneElute™ Plasmid MiniPrep-Kit	Sigma, München
GeneMorph II Random Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Perfect Protein Marker, 10-225 kDa	Merck, Darmstadt
QIAquick™ Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Roti®-Mark Standard	Carl Roth, Karlsruhe
TargeTron® Gene Knockout System	Sigma, München

A.8 Stammlösungen

Molybdato-phosphorsäure-Sprühreagens:

40 mM Molybdato-phosphorsäure, 95,2 % (v/v) konz. Essigsäure, 4,8 % (v/v) konz. Schwefelsäure

Orange G Probenpuffer 6x:

10 mM EDTA; 70 % (v/v) Glycerol; Orange G (1 Spatelspitze)

SDS-Entfärbelösung:

10 % (v/v) Essigsäure; 30 % (v/v) Methanol

SDS-Färbelösung:

10 % (v/v) Essigsäure; 30 % (v/v) Methanol; 2,5 mg mL⁻¹ Coomassie-Brilliant-Blau R 250

5x Lämmli-puffer:

300 mM Tris-HCl, pH 6,8, 50 % (v/v) Glycerin, 10 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,05 % (v/v) Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer 10 x:

Rotiphorese 10x SDS-PAGE-Puffer (Roth, Karlsruhe, Produktnummer: 3060): 250 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS

TAE-Puffer 10x:

400 mM Tris pH 8,0; 1,14 % (v/v) Essigsäure; 10 mM Ethylendiamintetraacetat

Lower Tris-Puffer:

36,34 g Tris, 0,8 g SDS, 200 mL VE-H₂O, pH 8,8 (HCl)

Upper Tris-Puffer:

12,11 g Tris, 0,8 g SDS, 200 mL VE-H₂O, pH 6,8 (HCl)

TfBI-Puffer:

0,59 g Kaliumacetat, 2,42 g Rubidiumchlorid, 0,29 g CaCl₂, 2 g MnCl₂x 4 H₂O, 30 mL Glycerin, 200 mL VE-H₂O, pH 5,8 (mit Essigsäure)

Die Lösung wird vor Gebrauch sterilfiltriert (0,2 μ m).

TfBII-Puffer:

0,21 g MOPS 1,1 g CaCl₂, 0,12 g Rubidiumchlorid, 15 mL Glycerin, 100 mL VE-H₂O, pH 6,5 (mit NaOH)

Die Lösung wird vor Gebrauch autoklaviert.

Tris-Puffer:

1,5 mM Tris Hydrochlorid; 2,9 mM Ethylendiamintetraacetat-Natriumsalz auf pH 7,2 mit verdünnter Natronlauge eingestellt

HisTrap-Bindepuffer:

50 mM Natriumphosphat (pH 7,4), 20 mM Imidazol, 500 mM Natriumchlorid

HisTrap-Elutionspuffer:

50 mM Natriumphosphat (pH 7,4), 500 mM Imidazol, 500 mM Natriumchlorid

Aufschlusspuffer (MTP-Maßstab):

50 mM Kaliumphosphat (pH 8,0), 10 mM
MgCl₂, 1 mg mL⁻¹ Lysozym 0,05 U mL⁻¹
DNAse

Induktionslösung:

180 mL TB-Medium, 20 mL TB-Puffer,
200 µL Ampicillin-Lösung (100 mg mL⁻¹),
700 µL IPTG (1 M)

A.9 Medien und Zusätze

Die Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert oder sterilfiltriert.

Minimalmedium nach Wilms *et al.* (2001)

(NH ₄) ₂ H-citrat	1,0 g
Na ₂ SO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,68 g
NH ₄ Cl	0,5 g
K ₂ HPO ₄	14,6 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	3,6 g
VE-H ₂ O	1000 mL

Nach Vereinigung der Salze wird die Lösung autoklaviert. Anschließend kommen 2 mL L⁻¹ 1 M MgSO₄-Lösung (steril-filtriert) hinzu, sowie 3 mL L⁻¹ Spurenelementelösung und die gewünschte Konzentration an Antibiotika.

Spurenelementelösung nach Wilms *et al.* (2001)

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,10 g
Na ₂ -EDTA	10,05 g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	8,35 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,16 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,18 g
VE-H ₂ O	1000 mL

Die Spurenelementelösung wurde vor Gebrauch steril-filtriert.

LB-Agar-Platten

Pepton aus Casein	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	10 g
Agar	20 g
VE-H ₂ O	ad 1000 ml

Vor dem Gießen der Platten wurde dem 55 °C warmen Medium bei Bedarf die gewünschte Menge Anitbiotikum zugefügt.

LB-Medium:

Bacto-Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Natriumchlorid	10 g
VE-H ₂ O	ad 1000 mL

TB-Medium:

Lösung I:

Bacto-Trypton	12 g
Hefe-Extrakt	24 g
Glycerin, wasserfrei	4 mL
VE-H ₂ O	ad 900 mL

Lösung II:

Kaliumdihydrogenphosphat	2,31 g
Kaliumhydrogenphosphat	12,54 g
VE-H ₂ O	ad 100 mL

Beide Lösungen wurden nach dem Autoklavieren vereinigt.

A.10 Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

Enzym	Bezugsquelle
<i>Bam</i> HI	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>B</i> lpl	NEB, Frankfurt
DNaseI	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>D</i> pnl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>E</i> coRI	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>H</i> indIII	NEB, Frankfurt
<i>N</i> deI	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>N</i> otI	NEB, Frankfurt
<i>P</i> cil	NEB, Frankfurt
<i>P</i> fu DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
T4 DNA-Ligase	NEB, Frankfurt
<i>T</i> aq DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot

A.11 Software und Datenbanken

Für die bioinformatischen Arbeiten wurde folgende Software genutzt:

- **Basic Local Alignment Search Tool 2** (BLAST 2): Programm zum Alignieren von Nukleotid- und Proteinsequenzen in öffentlich zugänglichen Datenbanken (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- **Chimera 1.5.2**: Programm zur Visualisierung und Untersuchung von Proteinstrukturmodellen (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>)
- **Define Secondary Structure of Proteines** (DSSP): Programm zur Bestimmung von Proteinsekundärstrukturen (Kabsch & Sander, 1983)
- **fedbatch XP 1.0.213**: Regelungssoftware für Bioprozesse im Bioreaktorsystem (DASGIP, München)
- **fed-batchXP Server 1.0.21**: Schnittstelle zwischen Software im Bioreaktorsystem (DASGIP, München)
- **Gemini 3.40 SP2**: Steuerprogramm für Laborautomaten (Tecan, Männedorf, Schweiz)
- **GENTle**: Programm zur Visualisierung, sowie zur Bearbeitung und lokalen Alignierung von Nukleotid- und Proteinsequenzen (<http://gentle.magnusmanske.de/>)

- **HHSearch:** Programm zur Erstellung von Sequenzalignments (Uni Tübingen, jetzt LMU München)
- **IGOR Pro:** Programm für die Analyse von enzymkinetischen Daten (<http://www.wavemetrics.com/>)
- **ImageJ 1.41:** Programm zur wissenschaftlichen Bildverarbeitung, wie beispielsweise zur Quantifizierung von Proteinbanden auf SDS-Gelen (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)
- **LabView 6.0:** Programm zur Steuerung von Laborgeräten und Aufzeichnung von Messdaten
- **MATLAB R2008a-R2010a:** Umfangreiches Mathematik-Programm zum Lösen verschiedener Aufgaben, wie beispielsweise die Parameteridentifikation und Simulation von Prozessen (The Mathworks, Natwick, USA)
- **MODELLER:** Programm zur Homologiemodellierung von Proteinen (<http://www.salilab.org/modeller/>)
- **Multalin:** Webbasierte Oberfläche zum Alignieren von - und Proteinsequenzen (Corpet, 1988) (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>)
- **Oligo Calculator:** Webbasierte Oberfläche zur Berechnung relevanter Parameter beim Erstellung synthetischer Oligonukleotide (<http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>)
- **PSIPRED:** Vorhersage-Programm für Proteinsekundärstrukturen (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)
- **PyMol:** Programm zur Visualisierung und Untersuchung von Proteinstrukturmodellen (<http://www.pymol.org/>)
- **SigmaPlot 8.0:** Programm zur Präsentation und Auswertung von Messergebnissen (Systat Software, Inc., San Jose, USA)

Für die bioinformatischen Arbeiten wurden folgende Datenbanken genutzt:

- **Protein Data Bank (PDB):** Bei der PDB handelt es sich um eine Proteinstruktur-Datenbank, welche von der Research Collaboratory for Structural Bioinformatics zur Verfügung gestellt wird (<http://www.rcsb.org>). Stand der PDB für die Arbeit war der 30. November 2009.
- **DSSP:** In der DSSP-Datenbank sind Sekundärstruktur-Daten von Proteinen, die in der PDB enthalten sind, zusammengefasst. Die Daten werden mit Hilfe des Programm DSSP generiert (Kabsch & Sander, 1983) (<http://swift.cmbi.ru.nl/gv/dssp/>). Der Stand der Datenbank für die vorliegende Arbeit war der 20. März 2009.
- **Structural Classification of Proteins (SCOP):** Bei der SCOP handelt sich um eine Strukturklassen-Datenbank von Proteinen (Murzin *et al.*, 1995), in der eine Klassifizierung basierend auf evolutionärer Verwandtschaftsverhältnisse der Proteine vorgenommen wurde. Diese werden manuell mittels Vergleich automatisch erstellter Strukturalignments generiert. Der Stand der Datenbank für die vorliegende Arbeit war eine auf maximal 70 % Sequenzidentität gefilterte SCOP-Datenbank der Version 1.75 vom 7. Juni 2009 (<ftp://toolkit.lmb.uni-muenchen.de/HHsearch/databases/>)
- **GenBank:** Die GenBank stellt eine Sequenz-Datenbank dar, welche frei zugängliche Nukleotid-Sequenzen enthält (Benson *et al.*, 2008). Die nicht-redundante Version (nr) steht unter <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/> zur Verfügung. Für die vorliegende Arbeit wurden gefilterte Datenbanken verwendet, deren Versionszeitpunkte für die auf maximal 90 % Sequenzidentität gefilterte nicht-redundante GenBank (nr90) der 18. Oktober 2009 und für die auf maximal 70 % Sequenzidentität gefilterte Datenbank der 12. Oktober 2009 waren. Diese stehen unter <ftp://toolkit.lmb.uni-muenchen.de/HHsearch/> zur Verfügung.