

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit
Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe

Entwicklung, Optimierung und Etablierung von enzymatischen Reaktionskaskaden zur Herstellung von Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen

Hendrik Jan Benedikt Hohagen

Vollständiger Abdruck der von dem TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Bastian Blombach

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Volker Sieber
2. Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 19.10.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch den TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit der Technischen Universität München am 19.02.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung der Arbeit	5
1. Einleitung	7
1.1 Zukunft von nachwachsenden Rohstoffen	7
1.1.1 Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe und ihre Bedeutung für die chemische Industrie	8
1.1.2 Bioraffinerien.....	9
1.2 Industrielle Biotechnologie und Biokatalyse.....	12
1.2.1 Biokatalyse	12
1.2.2 Die Entwicklung von Biokatalysatoren	14
1.2.2.1 Historische Entwicklung von Biokatalysatoren	14
1.2.2.2 Enzymgewinnung und Optimierung	15
1.2.2.3 Enzymimmobilisierung	16
1.2.3 Zellfreie Biokatalyse.....	19
1.2.3.1 Cofaktorrecycling.....	22
1.2.4 Beispiele für zellfreie Biokatalysen.....	24
1.2.4.1 Enzymvermittelte dynamische kinetische Racematspaltung.....	24
1.2.4.2 Zellfreie Enzymkaskaden	25
1.2.4.3 Zellfreie Stoffwechselreaktionen	27
1.2.5 Industrielle Biotechnologie in der Praxis.....	29
1.2.5.1 Cellulose-Bioethanol.....	29
1.2.5.2 Bernsteinsäure	30
1.2.5.3 β -Lactam-Antibiotika:	31
1.3 Ziele der Arbeit.....	31
2. Materialien	33
2.1 Chemikalien	33
2.2 Enzyme	33
2.3 Kits	33
2.4 Geräte	34
2.5 Kulturmedien und Antibiotika.....	35
2.5.1 Kulturmedien	36
2.6 Bakterienstämme, Plasmide, DNA Fragmente und Oligonukleotide	36
2.6.1 Bakterienstämme	36
2.6.2 Plasmide.....	37
2.6.3 Oligonukleotide	37
3. Methoden.....	38
3.1 Mikrobiologische Methoden	38
3.1.1 Kultivierung und Lagerung der <i>E. coli</i> Stämme	38
3.1.2 Bestimmung der optischen Dichte von Zellkulturen	38
3.1.3 Herstellung von <i>E. coli</i> Zellen für chemische Transformation.....	38
3.1.4 Transformation von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	38
3.1.5 Rekombinante Genexpression in <i>E. Coli</i>	39

3.2 Molekularbiologische Methoden	39
3.2.1 DNA Konzentrationsbestimmung	39
3.2.2 DNA Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion.....	40
3.2.3 Isolation und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
3.3 Proteinanalytik	41
3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie.....	41
3.3.2 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.3.3 Proteinreinigung	42
3.3.4 Enzymaktivität.....	43
3.3.5 Proteinkristallisation.....	45
3.3.6 Test der Bindungsaffinität von Aldehyden an Proteinen.....	46
3.4 Enzymreaktionen	46
3.4.1 Ethanolsynthese	46
3.4.1 Acetoinsynthese.....	46
3.5 Instrumentelle Analytik	47
3.5.1 Gaschromatographie.....	47
3.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	47
3.6 Sonstige Methoden	48
3.6.1 Enzymimmobilisierung	48
3.6.1 Vorbereitung von Silagepresssaft.....	49
4. Ergebnisse	50
4.1 In vitro metabolisches Engineering einer minimierten, enzymatischen Reaktionskaskade zur Alkoholproduktion	50
4.1.1 Einführung.....	50
4.1.2 Ergebnisse.....	53
4.1.2.1 Effektivität und Optimierung der enzymatischen Reaktionskaskade.....	53
4.1.2.2 Aldehydquantifizierung und Bilanzierung der Gesamtreaktion.....	56
4.1.2.3 Reaktivität des Glycerinaldehydes	59
4.1.2.4 Laktose als Substrat für eine zellfreie Enzymreaktion zur Produktion von Ethanol	62
4.2 Neutralisierung von Silagepresssaft bei gleichzeitiger kontinuierlichen Produktion von Acetoin aus Milchsäure mittels einer immobilisierten enzymatischen Kaskadenreaktion..	64
4.2.1 Einleitung.....	64
4.2.2 Ergebnisse.....	66
4.2.2.1 Enzymauswahl und Charakterisierung.....	66
4.2.2.2 Bestimmung der Enzymzusammensetzung.....	67
4.2.2.3 Reine Milchsäure als Substrat zur Produktion von Acetoin.....	69
4.2.2.4 Immobilisierung der Reaktionskaskade	71
4.2.2.5 Kontinuierliche Produktion von Acetoin mittels einer verkapselten enzymatischen Reaktionskaskade	72
4.2.2.6 Milchsäure aus Silagepresssaft als Substrat für die Produktion von Acetoin	73
4.2.2.7 Wirtschaftliche Einschätzung.....	76
4.3 Charakterisierung und Kristallisation von Butandioldehydrogenasen	77
4.3.1 Einleitung.....	77
4.3.2 Ergebnisse.....	80
4.3.2.1 Charakterisierung der Butandioldehydrogenasen	80
4.3.2.2 Kristallisation von <i>SmBDDH</i> und <i>BcBDDH</i>	81

5. Diskussion.....	84
5.1 In vitro metabolisches Engineering einer minimierten, enzymatischen Reaktionskaskade zur Alkoholproduktion	84
5.2 Neutralisierung von Silagepresssaft bei gleichzeitiger kontinuierlichen Produktion von Acetoin aus Milchsäure mittels einer immobilisierten enzymatischen Kaskadenreaktion..	87
5.3 Charakterisierung und Kristallisation von Butandioldehydrogenasen.....	88
Literaturverzeichnis.....	90
Anhang	101
Abkürzungsverzeichnis.....	115
Abbildungsverzeichnis	117
Tabellenverzeichnis.....	120

Kurzzusammenfassung der Arbeit

Zellfreie, enzymatische Reaktionskaskaden sind Systeme, mit denen nachwachsende Rohstoffe nutzbar gemacht werden können. Ihre Verwendung hat signifikante Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden, ist aus prozesstechnischen Gründen umwelt- und klimafreundlich und ermöglicht eine Kombination mit herkömmlichen Prozessen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Enzymkaskaden entwickelt und damit folgende Punkte erreicht werden:

- Optimierung bestehender Reaktionskaskaden
- Erweiterung bestehender Reaktionskaskaden auf neue Substrate
- Entwicklung neuer Systeme

Eine am Lehrstuhl bereits entwickelte Reaktionskaskade bildete einen der Schwerpunkte dieser Untersuchung und sollte dahingehend optimiert werden, dass das Gesamtergebnis verbessert wird und eine Analyse des kompletten Systems möglich ist. Die hier bearbeitete Kaskade kann aus Glukose in sieben bzw. neun Reaktionsschritten Ethanol bzw. Isobutanol herstellen und wurde 2012 veröffentlicht. In ihrer bisherigen Form wies die Kaskade einige Nachteile auf, weshalb weitere Untersuchungen erforderlich waren. Die Ergebnisse waren jedoch unzureichend und es fehlte an Möglichkeiten, eine umfängliche Analyse des Systems durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine neue Analysemethode angewandt, die bisher noch ungemessene Komponenten – Glycerinaldehyd und Acetaldehyd – messbar machte. Damit war es möglich, alle im System entstehenden Zwischenstufen zu analysieren. Des Weiteren wurden zwei Schlüsselenzyme – Dihydroxysäure-Dehydratase und Aldehyd-Dehydrogenase – verändert, damit die Ausbeute erhöht werden konnte.

Da ein großer Vorteil von zellfreien, enzymatischen Kaskadenreaktionen in deren Kombinationsmöglichkeit mit anderen Enzymen liegt, wurde das Substrat der Kaskade auf Laktose erweitert. Dabei wurde lediglich ein weiteres Enzym hinzugefügt und die Substratpromiskuität der restlichen betroffenen Enzyme ausgenutzt. Diese erweiterte Kaskade konnte ähnliche Ergebnisse in Bezug auf Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute liefern.

Einen weiteren Schwerpunkt stellte die Entwicklung neuer Prozessrouten dar, um bisher noch ungenutzte Rohstoffe nutzbar zu machen. Dabei wurde der Fokus auf Silagepresssaft gelegt. Dieser Saft wird aus Grassilage gewonnen und besitzt als nachwachsender Rohstoff ein großes Potential, da er lagerfähig ist und in großen Mengen zur Verfügung steht. Außerdem ist Silagepresssaft kein Lebensmittel, wodurch die ‚Teller-Tank-Diskussion‘ umgangen wird. Um die Inhaltsstoffe des Presssaftes optimal zu nutzen, sollten Fermentationen damit durchgeführt werden. Mit einem pH-Wert von 4 ist der Saft jedoch sehr sauer, weshalb mikrobielles Wachstum in seiner Reinform nur äußerst eingeschränkt möglich ist. Aufgrund dessen wurde eine Reaktionskaskade entwickelt, um die Milchsäure im Presssaft zu neutralisieren und gleichzeitig die wertsteigernde Komponente Acetoin zu bilden. Dadurch konnte der pH-Wert erhöht werden, um die fermentativen Möglichkeiten zu erweitern, und gleichzeitig konnte eine vielversprechende Plattformchemikalie produziert werden.

Der Reaktionsweg zur Produktion von Acetoin kann durch ein zusätzliches Enzym erweitert werden, um 2,3-Butandiol zu produzieren. Dieses Diol hat zwei Stereozentren und kann deshalb drei

unterschiedliche Konformationen einnehmen. Der Grund für die Entstehung des jeweiligen Stereoisomers liegt in der Beschaffenheit der Butandiol-Dehydrogenase, des Enzyms, das Acetoin zu 2,3-Butandiol reduziert. Daraus folgt, dass die unterschiedlichen Strukturen der Enzyme für die Bildung des jeweiligen Isomers verantwortlich sind. Um dies vertieft untersuchen zu können, sollte die Struktur von verschiedenen Butandiol-Dehydrogenasen ermittelt werden. Dafür wurden die Enzyme kristallisiert, um anschließend mittels Röntgenstrukturanalyse auf die Struktur zu schließen. Letztlich war es jedoch nicht möglich, im Rahmen dieser Arbeit die Struktur der ausgewählten Enzyme vollständig aufzuklären.

1. Einleitung

1.1 Zukunft von nachwachsenden Rohstoffen

„Die Steinzeit endete nicht aus Mangel an Steinen, und das Ölzeitalter wird enden, lange bevor der Welt das Öl ausgeht.“

Scheich Yamani (saudischer Minister für Öl und mineralische Ressourcen 1962–1986)
im Jahr 2000

Mit 6,7 Gigatonnen Kohle, 4,3 Gigatonnen Erdöl und 3,6 Billionen Kubikmeter Erdgas wurden 2015 neue Rekorde in der Förderung von fossilen Rohstoffen erreicht (ANDRULEIT et al. 2016). Verschiedenste Studien versuchen vorauszusagen, ab wann keine oder nur noch schwer zugängliche Reserven zur Verfügung stehen werden. Diese Abhängigkeit in Kombination mit der immer realer werdenden Bedrohung durch den Klimawandel ist bedenklich und kann durch den Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen reduziert werden. Alternative Energiegewinnung mittels Photovoltaik, Wind- und Wasserkraftwerken wird in Deutschland stark gefördert und ist bereits eine feste Größe im deutschen Strommix (ICHA P. 2017). Nachwachsende Rohstoffe dagegen können weitaus vielseitiger eingesetzt werden und dienen dabei nicht ausschließlich als Energieträger, sondern auch als Ausgangsmaterial für chemische Erzeugnisse (BOZELL 2008). Eine vollständige und nachhaltige Nutzung dieser Rohstoffe ermöglicht es, nicht nur die Abhängigkeiten von fossilen Rohstoffen zu durchbrechen, es werden auch neue Wirtschaftszweige geschaffen, die sich z. B. mit der Bereitstellung oder Verarbeitung beschäftigen (SHORT et al. 1995). Gerade die chemische Industrie steht hier vor großen Herausforderungen. Bislang basiert ein Großteil dieser Industrie noch auf Erdöl, wenngleich ein Wandel hin zu nachwachsenden Rohstoffen durchaus zu erkennen ist (GAVRILESCU & CHISTI 2005). Einen bedeutenden Treiber für einen Wechsel in der Rohstoffnutzung stellt die industrielle Biotechnologie dar, die die Technologien zur Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen liefert. Hinzu kommen die Verfahrens- und Prozesstechnik sowie der Anlagenbau, die die Entwicklung integrierter Bioraffinerien ermöglichen. Die Kombination moderner chemischer, verfahrenstechnischer und biotechnologischer Methoden ist dabei der Schlüssel zum Erfolg. Um diesen Erfolg zu garantieren, müssen jedoch weitere politische, sozioökonomische und ökologische Herausforderungen bewältigt werden. Dazu gehören unter anderem:

- eine klare und dauerhafte Positionierung der Politik zur Planungssicherheit für Unternehmen,
- eine gesicherte Verfügbarkeit und standardisierte Qualität der Rohstoffe,
- die Berücksichtigung der Konkurrenzsituation von Biomasse zur Lebens-/Futtermittelproduktion sowie
- eine Einbeziehung von ökologischen Faktoren, wie zum Beispiel bei der fortschreitenden Industrialisierung der Landwirtschaft.

Um diese Herausforderungen zu überwinden, sind jedoch technische Weiterentwicklungen und die Bereitschaft zu Investitionen nötig (GRIMM et al. 2011).

Im Folgenden werden der Status quo der bisherigen Entwicklungen in der Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen sowie potenzielle Neuerungen in der chemischen Industrie dargestellt. Es wird auf die generelle Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen eingegangen und es werden spezifische Beispiele detaillierter behandelt.

1.1.1 Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe und ihre Bedeutung für die chemische Industrie

Es ist schwer vorstellbar, wie das Leben im 21. Jahrhundert aussähe, hätte es die Fortschritte der chemischen Industrie in den vorangegangenen Jahrhunderten nicht gegeben. Beinahe alle Aspekte des modernen Lebens sind direkt oder indirekt davon abhängig – angefangen bei der Produktion von Arzneimitteln über synthetische Materialien wie Plastik, Nylon oder Styropor bis hin zu Elektronikartikeln oder Kühlflüssigkeiten. All diese Stoffe sind Produkte der chemischen Industrie, basieren jedoch fast ausschließlich auf Kohlenwasserstoffen aus Erdölraffinerien (BAERNS et al. 2013; BÜCHEL et al. 2005). Gerade wegen dieser Abhängigkeiten in der chemischen Industrie müssen neue Produktionsrouten entwickelt werden, damit ein unabhängiger Fortschritt weiter möglich ist. Nachwachsende Rohstoffe ermöglichen es, Ausgangsmaterialien bereitzustellen, um diesen Bedarf zu decken. Der chemische Aufbau ist dabei ausschlaggebend für die werkstofflichen Eigenschaften. Schon scheinbar geringe Unterschiede können zu verschiedenen Werkstoff-Eigenschaften führen. Ein Beispiel hierfür ist der Vergleich zwischen Cellulose und Amylose. Der Grundbaustein Glukose ist bei beiden Molekülen identisch, die makroskopische Darstellung und die jeweilige chemische Verwendbarkeit sind jedoch stark verschieden. Dies zeigt die Bedeutung der Kenntnisse über die chemisch-strukturellen Grundlagen (BECKER et al. 2007).

Die aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnenen Ausgangsmaterialien lassen sich in drei große Familien einteilen: Biopolymere aus der Natur, Biopolymere aus biogenen Monomeren und biogene Rohstoffe für Fermentationen oder andere Produktionsverfahren. Bei der Herstellung ersterer wird von Auf- und Weiterverarbeitung gesprochen. Die Herstellung von Polymeren aus biogenen Monomeren oder Nutzung als Rohstoff ist für die chemische Industrie die entscheidende, denn bei diesem Verfahren können die gewünschten Werkstoffe je nach Vorgabe hergestellt werden (BECKER et al. 2007). Eine Herausforderung bei der Umsetzung des Wandels der chemischen Industrie hin zu einer biobasierten Industrie besteht in der Nutzung der nachwachsenden Rohstoffe als Ganzes. Nur bei einer ganzheitlichen Nutzung können nachwachsende Rohstoffe ökonomisch und auch ökologisch sinnvoll eingesetzt werden (VAN DAM et al. 2005). Zur Verdeutlichung dieses Sachverhalts dient die Produktion von Ethanol der ersten Generation. Hierzu werden Energiepflanzen wie Mais und Weizen angebaut, doch lediglich die stärkehaltigen Teile der Pflanze werden vergoren und zu Ethanol verarbeitet. Der Rest wird zu Tierfutter verarbeitet oder bleibt ohne Verwendung. Dieses Produktionsverfahren ist damit nicht sehr ökologisch, da ein Großteil der Pflanze ungenutzt bleibt, und nur mit Hilfe staatlicher Subventionen konnte diese Art der Produktion aufrechterhalten werden. Weiterentwicklungen des Ethanolproduktionsverfahrens erhöhten die Effizienz (siehe dazu Unterkapitel 1.2.5.1), dennoch verdeutlicht dies die Relevanz einer ganzheitlichen Nutzung der Rohstoffe. Im Folgenden wird auf eine Möglichkeit der ökologischen und ökonomischen Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen detaillierter eingegangen.

1.1.2 Bioraffinerien

Um das ganze Potential nachwachsender Rohstoffe nutzen zu können, müssen einzelne Produktionsprozesse zusammengeführt werden. Ein denkbarer Ansatz hierfür ist die Bioraffinerie. Ähnlich wie die große Vielfalt möglicher Produkte aus Erdöl zu generieren, bietet eine Bioraffinerie die Möglichkeit, verschiedene Prozesse parallel und nachgeschaltet zu betreiben und damit die Produktivität sowie die Ausbeute zu erhöhen. In Abb. 1.1 sind mögliche Stoffströme einer theoretischen Bioraffinerie dargestellt. Die Vielzahl an verschiedenen Stoffströmen und Produkten zeigt das große Potential von Biomasse als Rohstoff. Die Herausforderung besteht jedoch darin, die verschiedenen Technologien miteinander zu verknüpfen (TÜRK 2014).

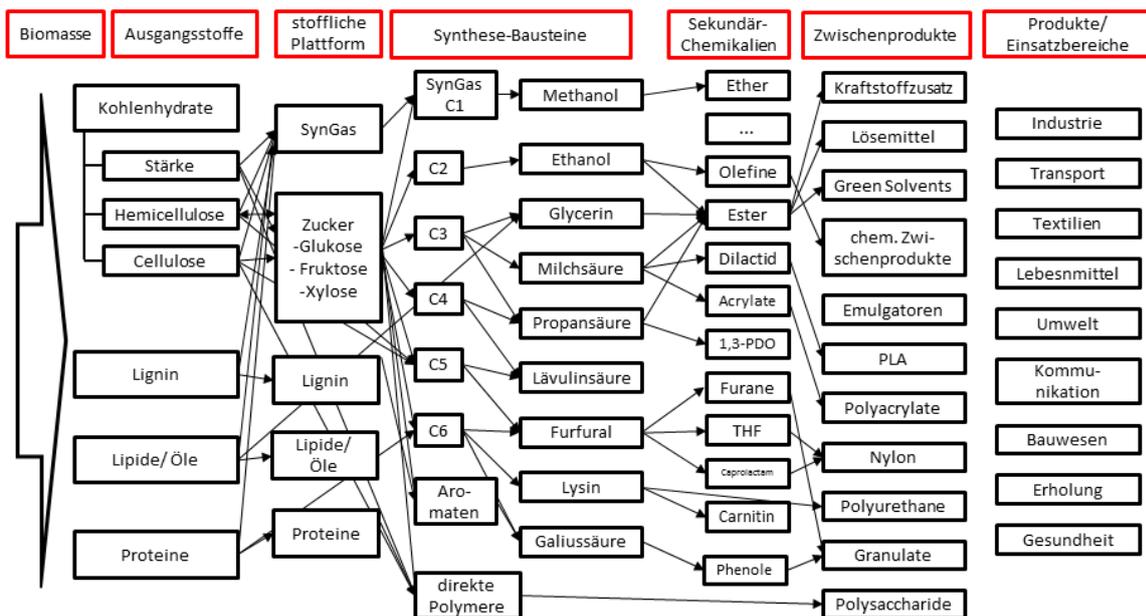


Abb. 1.1: Theoretische Stoffströme in einer Bioraffinerie (TÜRK 2014).

Bioraffinerien werden generell in drei unterschiedliche Typen unterschieden, wobei diese Einteilung auf der Anzahl der unterschiedlichen Rohstoffe, Prozesse und Produkte basiert (CHERUBINI et al. 2009; GRIMM et al. 2011).

Phase-I-Bioraffinerien sind typischerweise Raffinerien, bei denen ein Rohstoff eingesetzt wird, der durch einen Prozess zu einem Produkt führt. Klassische Bioethanol- oder Biodiesel-Produktionsanlagen sind Beispiele für diesen Typus.

Phase-II-Bioraffinerien nutzen einen Rohstoff, der über mehrere Prozesse zu verschiedenen Produkten und Energie führt. Stärke- und Cellulosefabriken sind Beispiele hierfür. Diese beiden Arten der Bioraffinerie bilden den heutigen Stand der Technik und werden zur industriellen Produktion eingesetzt.

Phase-III-Bioraffinerien sind dementsprechend Raffinerien, die verschiedene Rohstoffe über unterschiedlichste Verfahren zu mehreren Produkten verarbeiten. Sie können nach unterschiedlichen Typen eingeteilt werden. Aktuell werden vier verschiedene Varianten der Phase-III-Bioraffinerien entwickelt, die bis 2020 in Europa eingesetzt werden sollen (COMMISSION 2006):

- Lignocellulose-Bioraffinerie (H. CLARK et al. 2009)
- Ganzpflanzen-Bioraffinerie (KAMM et al. 2007)
- Grüne Bioraffinerie (KAMM et al. 2007)
- Zwei-Plattform-Konzept-Bioraffinerie (KAMM et al. 2007)

Die Lignocellulose-Bioraffinerie verfolgt das Ziel, alle Bestandteile der Lignocellulose zu nutzen. Dass diese chemisch teils sehr unterschiedlich sind, wird in Abb. 1.5 deutlich, in der die potenziell gewinnbaren chemischen Grundstoffe dargestellt sind. Es existieren verschiedene Demonstrationsanlagen, in denen die Machbarkeit dieses Bioraffinerie-Typs getestet wird.

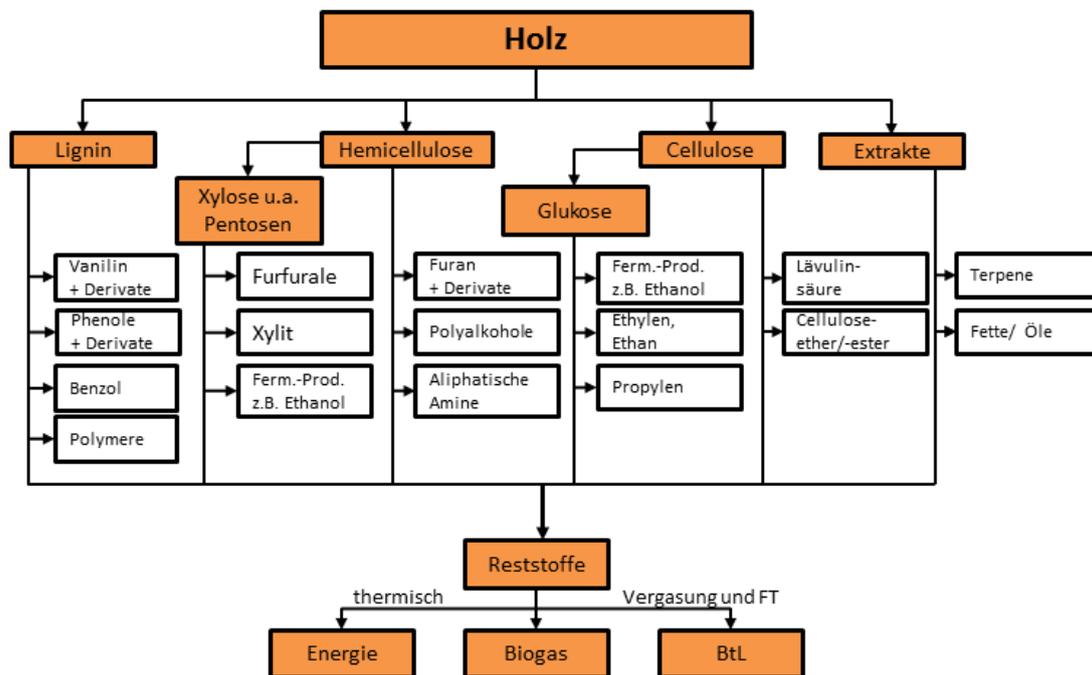


Abb. 1.2: Denkbare chemische Grundstoffe und biogene Energieträger einer möglichen Lignocellulose-Bioraffinerie. FT: Fischer-Tropsch-Synthese; BtL: „Biomass to Liquid“ (TÜRK 2014).

Ganzpflanzen-Bioraffinerien arbeiten mit einer Trennung der Frucht der Pflanze vom lignocellulosehaltigen Teil, was durch den großen chemischen Unterschied beider Komponenten zu erklären ist. Die Frucht dient dabei als Quelle für Stärke, Proteine und Öle und der Rest dient als Rohstoffquelle für die Verfahren einer Lignocellulose-Bioraffinerie. Somit können zusätzlich zu Produkten aus der Frucht weitere biogene Stoffe oder Energieträger gewonnen werden (KAMM et al. 2007; KOUTINAS et al. 2008; ROBERTSON et al. 2006).

Unter Grüner Bioraffinerie wird die Verwendung von grüner Biomasse mit einem natürlich hohen Wasseranteil, wie z. B. Grasschnitt, unreifen Getreidepflanzen oder Algen, verstanden. Diese werden im ersten Schritt gepresst und in zwei Fraktionen getrennt, in den Presssaft und den Presskuchen. In Abb. 1.3 sind potentielle nachfolgende Schritte dargestellt, wie mit den so gewonnenen Substraten verfahren werden kann (CARLSSON 1994; KAMM et al. 2007).

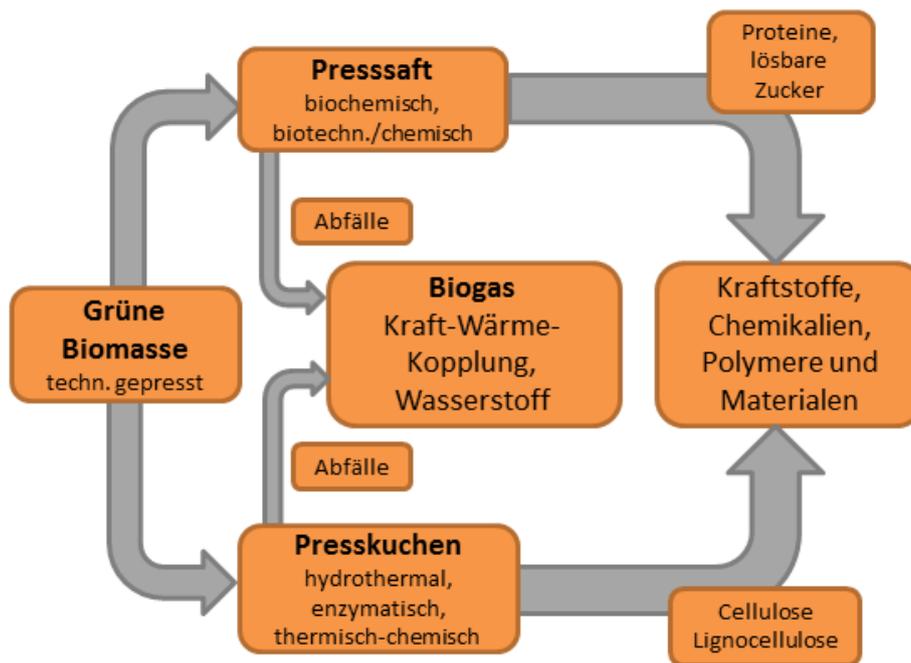


Abb. 1.3: Möglicher Aufbau einer Grünen Bioraffinerie der Phase III zur Gewinnung von Grund- und Feinchemikalien sowie biogener Energieträger (TÜRK 2014).

Als letzte Bioraffinerie wurde hier die Zwei-Plattform-Bioraffinerie genannt. Bei dieser Form der Raffinerie werden zunächst aus der Biomasse die fermentierbaren Inhaltstoffe abgetrennt und biochemisch oder biotechnologisch zu Rohstoffen, Zwischen- oder Endprodukten weiterverarbeitet. Da der restliche Teil nur schwer zielgerichtet verarbeitet werden kann, wird in diesem Bioraffinerietypus eine Synthesegas-Plattform angewandt (WERPY et al. 2004). Dadurch wird die Möglichkeit geschaffen, thermochemisch aus den Reststoffen gasförmige oder flüssige Zwischenprodukte zu generieren, die als Energieträger oder in der chemischen Synthese weiterverwendet werden können (DE JONG et al. 2006; LV et al. 2007).

Bioraffinerien sind Produktionsfabriken, in denen aus Biomasse ökonomisch und ökologisch Chemikalien, Materialien, Treibstoffe und Energie hergestellt werden können. Die heutzutage erfolgreichen Bioraffinerien produzieren jedoch nur wenige Produkte in großen Maßstäben zu niedrigen Preisen, was schon bei geringen Preisschwankungen wirtschaftliche Unsicherheiten hervorrufen kann (KOCHERGIN & KEARNEY 2006). Im Gegensatz dazu ermöglichen es Phase-III-Bioraffinerien, flexibler am Markt zu arbeiten und schneller auf Veränderungen reagieren zu können (MAITY 2015). Um diese erfolgreich zu etablieren, müssen allerdings noch zahlreiche Fortschritte gemacht werden. Neue, innovative Prozesse müssen entwickelt werden, damit Raffinerien ein immer breiteres Produktspektrum herstellen können. Die industrielle Biotechnologie bietet dabei viele Möglichkeiten, neue Konzepte zur stofflichen Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen bereitzustellen.

1.2 Industrielle Biotechnologie und Biokatalyse

Die industrielle Biotechnologie ist eine Schlüsseltechnologie für zukünftige wirtschaftliche Entwicklungen in der Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen. Durch die Anwendung von biotechnologischen Prozessen wird die Möglichkeit geschaffen, Chemikalien, Materialien und Energie ökologischer und energieeffizienter herzustellen. Dies wird durch den Einsatz von Mikroorganismen und Enzymen ermöglicht. Biologische Prozesse besitzen nicht nur das Potential, chemische Prozesse zu substituieren, sondern sind gleichzeitig auch ökologisch vertretbarer und bieten damit einen klaren Vorteil gegenüber herkömmlichen chemischen Prozessen. Sie arbeiten bei niedrigeren Temperaturen und Drücken und weisen aufgrund der verwendeten biogenen Substrate eine bessere Treibhausgasbilanz auf (OECD 2011).

Viele Gründe für den Einsatz der industriellen Biotechnologie als Produktionsplattform sind eindeutig mit dem Klimawandel und der Rohstoffsicherheit verbunden. Dennoch müssen praktische Anwendungen eine höhere Wirtschaftlichkeit erzielen als traditionelle Produktionsrouten, um mit diesen konkurrieren zu können (HATTI-KAUL et al. 2007). So verwendet die pharmazeutische Industrie die Spezifität von biologischen Katalysatoren, um höchste Produktreinheiten zu erhalten und so die teils sehr hohen Produktionskosten traditioneller Verfahren durch biotechnologische Prozesse zu verringern (BREUER et al. 2004). Gerade in Bereichen, in denen die Reinheit eine untergeordnete Rolle spielt und Produktionsmenge und Effizienz im Vordergrund stehen, hat die industrielle Biotechnologie jedoch Nachholbedarf (ZHANG 2011). Hinzu kommen große Investitionsrisiken, um großtechnisch produzieren zu können, und selbst die Bereitstellung von Demonstrations- und Pilotanlagen, um diese Risiken so zu minimieren, ist kostspielig und zeitaufwendig (OECD 2011). Des Weiteren müssen infrastrukturelle Probleme gelöst und ausreichende Mengen an nachwachsenden Rohstoffen sichergestellt werden. Mit Hilfe von Bioraffinerien könnten diese Hindernisse überwunden werden, da hier Chemikalien produziert werden können, die dann in bereits bestehende industrielle Prozesse eingeleitet werden können (KAMM et al. 2007). Wenn es möglich ist, einige dieser Grund- und Feinchemikalien biotechnologisch herzustellen, können ganze Industriezweige mit geringem Aufwand auf nachwachsende Rohstoffe umgestellt werden (KAMM 2007). Zwar ist dieses Szenario noch nicht in der Wirklichkeit angekommen, dennoch gibt es einige Beispiele, in denen biotechnologische Prozesse bereits in der chemischen Industrie etabliert sind (siehe dazu Unterkapitel 1.2.5). Im weiteren Verlauf dieses Kapitels wird beschrieben, wie ein biotechnologischer Prozess in der industriellen Biotechnologie aufgebaut sein kann und aus welchen Teilen er besteht. Es wird auf die Herstellung von Biokatalysatoren eingegangen und es werden die grundsätzlichen Unterschiede zwischen den möglichen Prozessen beschrieben und Beispiele genannt.

1.2.1 Biokatalyse

Je nach Komplexität der Reaktion, Anzahl und des Typs von Biokatalysatoren oder ob lebendige Zellen eingesetzt werden, können Biokatalysatoren unterschiedlich eingeteilt werden. Im Falle von lebendigen Zellen wird auch von Ganzzellbiokatalysatoren gesprochen. Dem gegenüber stehen zellfreie Biokatalysen, die wiederum nach Verwendung von Zellysate oder gereinigten Enzymen

unterschieden werden können. Des Weiteren kann die Anzahl der benötigten Enzyme als Kriterium für die Einteilung von Biokatalysen herangezogen werden. Eine weitere Ebene, um industriell attraktive und vor allem lukrative Biotransformationen besser unterscheiden und einteilen zu können, ist die Kostenebene, die durch die Preise der jeweiligen Produkte bestimmt wird (siehe Abb. 1.4). Die Einzelenzymkatalyse findet vor allem bei Reaktionen Anwendung, bei denen große Mengen eines billigen Produkts hergestellt werden sollen, oder die Reaktion hochspezifisch und selektiv sein muss. Multienzymkatalyse findet Anwendung, sobald die Reaktionskomplexität zunimmt und nicht mehr nur eine einzelne Reaktion katalysiert werden muss. Diese spezielle Form der zellfreien Biotransformation wird in Unterkapitel 1.2.3 detailliert beschrieben.

Bei komplizierteren Biotransformationen, die nicht mittels Multienzymkatalyse durchgeführt werden können, müssen zellfreie Synthesen oder Ganzzellbiokatalysatoren eingesetzt werden. Enzymkaskaden oder Biotransformation kam bislang nur wenig Aufmerksamkeit zu, da die Herstellung komplex und arbeitsintensiv ist. Gleichwohl gibt es Beispiele für die Anwendung dieser Technologie zur Produktion von 2,3-Butandiol (KAY & JEWETT 2015) oder für die zellfreie Proteinbiosynthese. Letztere eignet sich für die Expression von zytotoxischen, regulatorischen oder instabilen Proteinen, die nicht über herkömmliche Synthesewege hergestellt werden können (BOYER et al. 2008; CARLSON et al. 2012; WANG & ZHANG 2009).

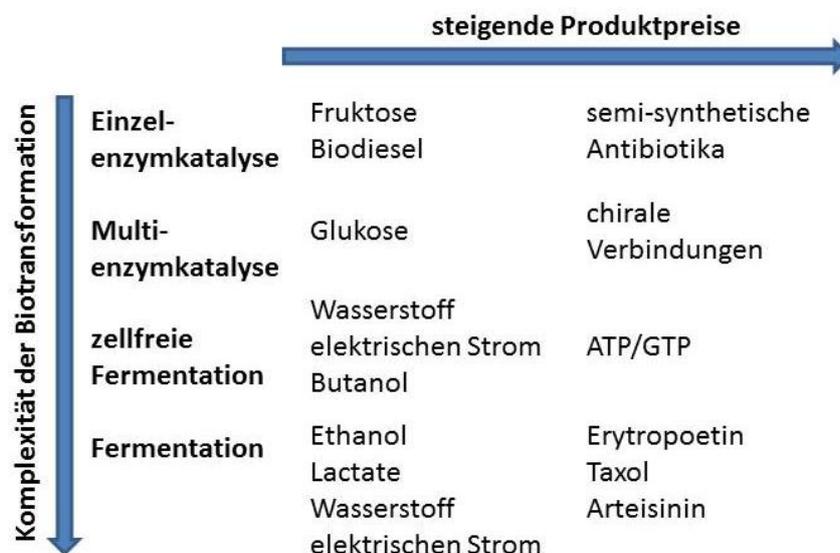


Abb. 1.4: Einteilung von Biotransformationen basierend auf der Komplexität und Produktpreisen (ZHANG 2010b).

Die älteste und bis heute am häufigsten verwendete Biotransformation ist die Fermentation. Sie findet seit Jahrtausenden unter anderem in der Bier- oder Weinherstellung statt. Dort werden Mono- oder Disaccharide von Hefen zu Ethanol vergoren. Ethanol ist jedoch bei weitem nicht das einzige Produkt, das durch Mikroorganismen gebildet werden kann. Hinzu kommen technische Entwicklungen, wie Reaktorbau und Gentechnologie, die es ermöglichen, Mikroorganismen in großen Maßstäben sehr effizient einzusetzen. So ist es heutzutage möglich, organische Säuren, kurzkettige Alkohole (SAUER et al. 2008; WEUSTHUIS et al. 2011) Wasserstoff oder elektrischen Strom mit Hilfe von

Mikroorganismen zu produzieren (CHAUDHURI & LOVLEY 2003; LOGAN 2004; LOGAN & REGAN 2006; MAEDA et al. 2008). Des Weiteren werden hochwertige Produkte wie Antibiotika, Vitamine, Impfstoffe, Enzyme, Antikörper, Glycoproteine, Lycopine oder Taxol fermentativ hergestellt (CHANG & KEASLING 2006; DEMAÏN 2000; HAMILTON et al. 2003; KLEIN-MARCUSCHAMER et al. 2007; MAYNARD & GEORGIU 2000; ZHONG 2001). Die Forschung und Entwicklung hinsichtlich neuer Produkte oder ungenutzter Mikroorganismen schreiten kontinuierlich fort (MATA et al. 2010).

1.2.2 Die Entwicklung von Biokatalysatoren

1.2.2.1 Historische Entwicklung von Biokatalysatoren

Biokatalysatoren sind in der industriellen Biotechnologie von besonderer Bedeutung. Generell wird diesbezüglich von Proteinen (Enzymen) gesprochen, es gibt jedoch auch nicht proteinogene Ausnahmen wie etwa RNA-Katalysatoren, auf die hier jedoch nicht eingegangen wird. Heutzutage ist bekannt, dass Enzyme beinahe alle chemischen Reaktionen in Lebewesen katalysieren und dass diese Reaktionen auch außerhalb einer Zelle stattfinden können. Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts war dies jedoch nicht die gängige Theorie. Louis Pasteur beschrieb als erster Fermentationen und nannte sie ‚unorganisierte lösliche Fermente‘, jedoch waren all diese Biokatalysen immer an einen lebenden Organismus gekoppelt. Das Prinzip von enzymkatalysierten Reaktionen blieb unklar. Es wurde angenommen, dass ein Lebensfaktor – *vis vitalis* – für eine solche Reaktion nötig ist. Erst mit den Entdeckungen von Eduard Buchner 1897 konnte das Konzept der Enzymkatalyse besser beschrieben werden. Buchners Experimente bezogen sich auf die von Hefezelllysat durchgeführte alkoholische Gärung, die auch ohne lebende Zellen stattfand. Er konnte damit beweisen, dass für die Gärung keine komplexe Zelle nötig ist und dass alle nötigen Komponenten in seiner erstellten Lösung vorhanden sind. Er nannte diese Komponenten *Zymase* (BUCHNER & RAPP 1897). Ihre wirkliche industrielle Bedeutung erlangten Biokatalysatoren jedoch erst in den 1950er und 1970er Jahren, als die wissenschaftlichen und technischen Fortschritte den Einsatz von Enzymen auch außerhalb von Laboratorien ermöglichten. So konnten durch verbesserte technische Prozesse Enzyme besser produziert werden und mit beispielsweise der Penicillin-G-Acylase (siehe Unterkapitel 1.2.5.3) bedeutsame Produktionsrouten etabliert werden. Als Mitte der 1950er Jahre die Glukose-Isomerase entdeckt wurde, konnte ein weiterer Prozess etabliert werden, der bis heute großtechnischen Einsatz findet. Das Enzym katalysiert die Isomerisierung von Glukose und Fruktose, was die Herstellung von Glukose-Fruktose-Sirup ermöglicht. Dieser Sirup wird dann als kostengünstiger Süßstoff in einer Vielzahl von Lebensmitteln verarbeitet. Durch diesen Prozess wurde die Glukose-Isomerase eines der am meisten hergestellten Enzyme der Welt. Die Produktivität konnte mit der Zeit ebenso deutlich gesteigert werden. So wurden um 1975 noch ca. 500 kg Sirup pro kg Enzym hergestellt, 1997 waren es bereits ca. 15000 kg pro kg Enzym (STRAATHOF & ADLERCREUTZ 2000). Die EU schrieb in ihrer im September 2017 ausgelaufenen Zuckermarktverordnung vor, wie viel Glukose-Fruktose-Sirup hergestellt werden darf. 2016 belief sich diese durch Biokatalysatoren hergestellte Menge auf 720.000 Tonnen (EU Verordnung Nr. 1308/2013).

Ein anderes erfolgreiches Biokatalysatoren-Produkt konnte die Firma Novo Industry (heute Novozymes) in den 1960er Jahren auf den Markt bringen. Biotex enthält einen Mix aus verschiedenen

Proteasen und Amylasen, die die Reinigungskraft von Waschmitteln steigern. Durch den Zusatz kann die Wascht Temperatur deutlich gesenkt werden (AEHLE 2006). Diese Enzyme werden seitdem in fast jedem Waschmittel verarbeitet und sind bis heute ein wesentlicher Bestandteil.

Mit der Einführung der Gentechnologie in den 1970er Jahren und der Möglichkeit, rekombinante DNA herzustellen, wurde die Enzymproduktion revolutioniert (CHRISTAKOPOULOS & TOPAKAS 2012). So wurde die Entwicklungsdauer eines Biokatalysators drastisch reduziert (COPELAND 2002). Hinzu kamen Protein-Engineering und Strukturaufklärung. All diese Technologien und Fortschritte schufen die Möglichkeit, neue Biokatalysatoren zu entwickeln und das Spektrum der Einsatzmöglichkeiten deutlich zu erweitern.

1.2.2.2 Enzymgewinnung und Optimierung

Die Anforderungen an die Biotechnologie wachsen stetig und damit schreitet auch die Entwicklung neuer Enzyme voran. Im Laufe der Evolution haben Enzyme eine schier unendliche Vielfalt entwickelt. Die große Herausforderung besteht nun darin, Enzyme zu finden, die für die industrielle Biotechnologie interessant sind. Hinzu kommt, dass ein Enzym normalerweise in seiner natürlichen Umgebung am besten funktioniert, was nicht gleichbedeutend mit dem biotechnologischen Prozess sein muss. Generell können bei der Suche und Entwicklung neuer Enzyme zwei grundlegende Vorgehensweisen unterschieden werden. Die erste und auch traditionelle Vorgehensweise ist die Isolierung eines unbekanntes Enzyms aus einem Organismus in einem bestimmten Habitat. So werden beispielweise aus Proben von heißen Quellen Metagenomdatenbanken erstellt und nach extremophilen Enzymen durchsucht (NIEHAUS et al. 1999b; VAN DEN BURG 2003).

Die zweite Vorgehensweise umfasst die Veränderung eines bereits bekannten Enzyms mittels molekularbiologischer Methoden, was als Protein-Engineering bezeichnet wird. Häufig folgt auf die Isolierung eines Enzyms ebenfalls Protein-Engineering, denn trotz aller natürlichen Vielfalt sind die wenigsten Enzyme für einen industriellen Prozess geeignet. Unter Protein-Engineering wird das Optimieren eines Enzyms verstanden, indem das zu Grunde liegende Gen verändert wird. Zwei mögliche Methoden hierfür stellen der rationale Ansatz (rational design) und die gerichtete Evolution (*directed evolution*) dar. Beim rationalen Ansatz liegt ein Struktur- oder Homologiemodell vor, anhand dessen gezielt einzelne Positionen des Proteins verändert werden. So werden erfolgreiche Optimierungen bei der Aktivitätserhöhung, Veränderung von Enzymmechanismen, Substrat- und Cofaktorspezifität, Enantioselektivität und Stabilität erreicht. Die größte Herausforderung liegt hier in der Interpretation des Zusammenhangs zwischen der Struktur und der Funktion (BORNSCHEUER & POHL 2001; CEDRONE et al. 2000; JONES & DESANTIS 1999; MARSHALL et al. 2003).

Die Methode der gerichteten Evolution benötigt keine Information bezüglich der Struktur oder des zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus des Enzyms. Durch randomisierte Mutagenese werden zufällige Varianten des Enzyms, sogenannte Mutantenbibliotheken, erzeugt. Die wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Optimierung eines Enzyms ist das Erreichen einer möglichst hohen genetischen Diversität. Da so mehrere 10.000 bis 100.000 verschiedene Varianten produziert werden können und mit dem Wildtyp des Enzyms verglichen werden müssen, bildet eine sichere Screeningmethode die Voraussetzung für eine erfolgreiche Optimierung (ARNOLD & VOLKOV 1999).

Die von Frances H. Arnold entwickelten Methoden zur gerichteten Evolution von Enzymen wurden 2018 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

1.2.2.3 Enzymimmobilisierung

Da die Herstellung von Biokatalysatoren sehr kosten- und zeitaufwendig sein kann und die hergestellten Enzyme teilweise instabil sein können, wurden Verfahren entwickelt, um diesen Problemen entgegenzutreten zu können. Die Enzymimmobilisierung ist ein solches Verfahren, in dem die Enzyme in einem physikalisch begrenzten Raum eingeschlossen werden und dabei ihre katalytische Aktivität behalten. Derartig präparierte Enzyme können einfach rückgewonnen, wiederverwendet und kontinuierlich eingesetzt werden (KATCHALSKI-KATZIR 1993). Neben der industriellen Applikation finden sich immobilisierte Enzyme in einer Vielzahl von biotechnologischen Anwendungen wieder. So werden sie beispielsweise in der Diagnostik, bei Affinitätschromatographien oder Biosensoren eingesetzt. Mit Hilfe von Immobilisierungstechniken konnten Katalysatoren deutlich in ihrer Leistung verbessert werden. Tab. 1.1 enthält einen Überblick über die Vor- und Nachteile von immobilisierten Enzympräparaten (TANAKA & TOSA 1992).

Tab. 1.1: Vor- und Nachteile von immobilisierten Enzymsystemen (KATCHALSKI-KATZIR 1993)

Vorteile	Nachteile
Wiederverwendung des Katalysators	Verlust oder Verringerung der Aktivität
Vereinfachter Reaktorbetrieb	Diffusionsbarrieren und Massetransferlimitierungen bei Einhüllungsimmobilisierung
Vereinfachte Produktabtrennung	Zusätzlicher Forschungsaufwand durch empirischen Forschungscharakter
Größere Auswahl an Reaktortypen	Zusätzliche Kosten

Die erste industrielle Anwendung eines immobilisierten Enzyms wurde 1966 publiziert (TOSA et al. 1966). Dabei handelt es sich um eine Aminoacylase aus *Aspergillus oryzae*, die für die Produktion von optisch reinen Aminosäuren eingesetzt wird.

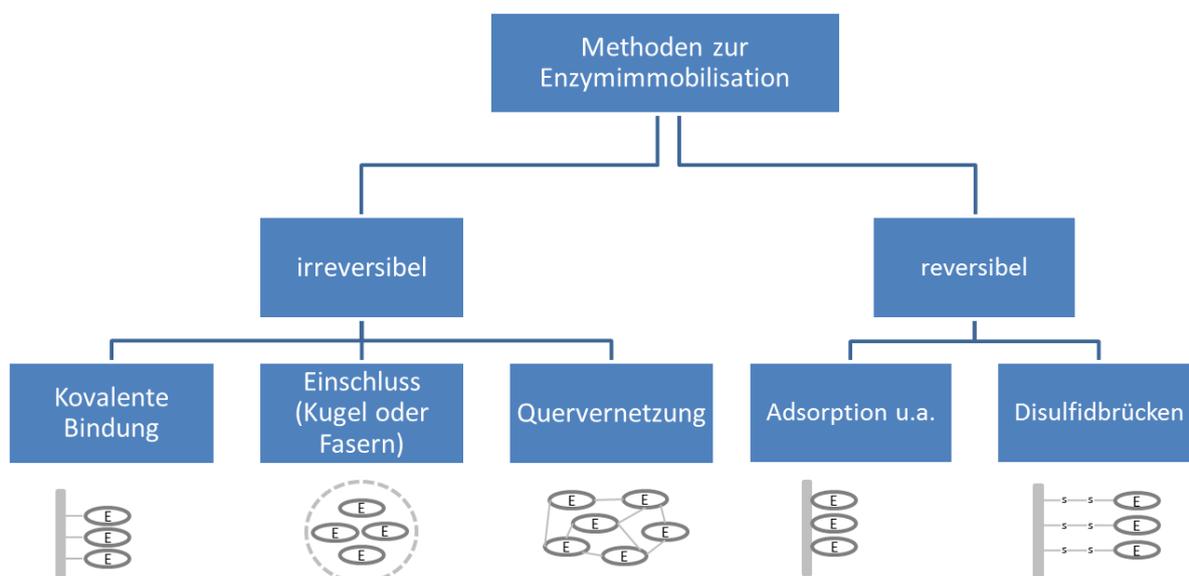


Abb. 1.5: Darstellung der unterschiedlichen Methoden zur Enzymimmobilisierung (E: Enzym).

Immobilisierungen können auf unterschiedliche Weise durchgeführt werden. In Abb. 1.5 sind verschiedene Methoden dazu dargestellt. Hauptkomponenten eines immobilisierten Enzymkomplexes sind neben den Enzymen die Trägersubstanz und die Methode der Immobilisierung. Die Eigenschaften des Trägermaterials sind bei der Wahl entscheidend, da sie direkten Einfluss auf die Leistung des Systems nehmen. Ideale Eigenschaften stellen die physikalische Widerstandsfähigkeit gegen Kompression, Hydrophilie, Biokompatibilität, die Widerstandsfähigkeit gegenüber Mikroorganismen und niedrige Kosten in der Anschaffung und Verarbeitung dar (MOHAMAD et al. 2015; MOSBACH & BRODELIUS 1987; TREVAN 1980). Bei den Trägersubstanzen kann eine Reihe von Materialien in Frage kommen. So werden entweder organische Substanzen wie Polysaccharide, Proteine oder Kohlenstofffasern oder synthetische Polymere wie unter anderem Polystyrol, Polyacrylamid oder Vinyl verwendet (DATTA et al. 2013). Außerdem kommen anorganische Materialien wie Silikate, Metalle oder Glas zum Einsatz (LUCKARIFT et al. 2004; PEREIRA et al. 2017). Dabei existiert keine universelle Trägersubstanz, die bei allen Enzymen angewendet und in jedem Prozess betrieben werden kann. Für jede Situation muss empirisch neu entschieden werden, welche Bedingungen das System erfüllen muss. Häufig werden jedoch poröse Trägersubstanzen verwendet, da diese wegen ihrer großen Oberfläche eine besonders hohe Enzymbeladung ermöglichen (GEMEINER 1992).

Auch bezüglich der Bindung der Enzyme an die Trägersubstanz stehen verschiedene Techniken zur Verfügung, die unter anderem nach ihrer Reversibilität differenziert werden können (s. Abb. 1.5). Bei irreversiblen Immobilisierungen werden am häufigsten kovalente Bindungen, Einschlussmethoden oder Quervernetzungen verwendet. Um eine kovalente Bindung aufzubauen, wird sich der vorhandenen Aminosäurereste bedient. Diese Reste werden aktiviert und dann mit den funktionellen Gruppen an der Trägeroberfläche verknüpft. Primäre Amine von Lysin, Thiole von Cysteinen und Carboxylgruppen von Aspartat oder Glutamat dienen hier als Reaktionspartner. Es ist ebenso möglich, die Trägersubstanz zu aktivieren und dann mit dem Protein zu verknüpfen (ÖZTÜRK 2001; YILMAZ et al. 2011). Diese Methode findet häufig Verwendung, wenn strikte Qualitätsanforderungen bestehen und kein Enzym im Endprodukt vorkommen darf. Als Nachteil ist indes zu nennen, dass es zu einem Aktivitätsverlust kommen kann, da die kovalente Bindung zur Trägersubstanz auch durch strukturgebende bzw. katalytisch aktive Aminosäuren eingegangen werden kann. Jede Immobilisierung muss daher optimiert werden, um die für Struktur und Katalyse essenziellen Aminosäuren nicht zu involvieren. Außerdem ist es nicht möglich, das System zu reaktivieren. Dies bedeutet, dass, sobald die Aktivität verloren gegangen ist, das komplette System ausgetauscht werden muss. Ein Recycling der Enzyme oder der Trägersubstanz ist nicht möglich (GRAZÚ et al. 2005).

Als weitere irreversible Methode zur Immobilisierung von Enzymen wird das Verfahren des Einschlusses angewendet, bei dem eine Polymersubstanz mit dem Enzym vermischt wird. Das Polymer erlaubt den Stoffaustausch von Substrat, Cofaktoren und Produkt, hält das Enzym allerdings zurück. Der Unterschied zu anderen Methoden ist hier, dass das Enzym nicht an die Trägersubstanz gebunden ist; die Enzyme können entweder in Gels, Fasern oder Kugeln eingeschlossen werden. Vorteile sind die sehr schonenden Bedingungen, unter denen die Enzyme immobilisiert werden, nachteilig ist die entstandene Diffusionsbarriere, die den Stoffaustausch behindert (BERNFELD & WAN 1963; NAWAZ et al. 2015; O'DRISCOLL 1976). Darüber hinaus existieren ebenso reversible Einschlussverfahren. So ist es etwa möglich, durch Zugabe von EDTA Enzyme aus Alginatimmobilisierung rückzugewinnen (BRENA et al. 2013).

Die Firma CLEA Technologies® vermarktet eine andere irreversible Immobilisierungsmethode – die Quervernetzung. *Cross-Linked Enzyme Aggregates* bezeichnen Enzymaggregate, die im Gegensatz zu konventionellen Immobilisierungen ohne Trägersubstanz hergestellt werden. Die Enzyme werden untereinander irreversibel vernetzt, indem ein bifunktionaler Crosslinker (z. B. Glutaraldehyd) Aminosäuren an der Oberfläche der Enzyme intermolekular verbindet. Dabei entsteht je nach Stärke der Vernetzung ein gummiartiges bis sandiges wasserunlösliches Pulver. Es konnte gezeigt werden, dass diese Form der Immobilisierung die Stabilität der Enzyme erhöhen kann (CAO et al. 2003; ŠULEK et al. 2011; TRAN & BALKUS 2011).

Als Alternative zur irreversiblen Bindung von Enzymen an Trägermaterialien bringt die reversible Immobilisierung den bedeutenden Vorteil mit sich, dass Kosten gespart werden können, da das Trägermaterial wiederverwendet oder neu beladen werden kann (GUPTA & MATTIASSON 2006). Auch hier finden sich zahlreiche unterschiedliche Methoden wieder. Eine der einfachsten ist die Adsorption der Enzyme an eine Trägersubstanz, die häufig auch Verwendung bei der chromatographischen Reinigung von Proteinen findet. Hier werden unspezifische Bindungen basierend auf Van-der-Waals-Kräften, Wasserstoffbrücken oder hydrophoben Interaktionen genauso wie ionische Bindungen eingesetzt. Je nach Anwendung können die Enzyme dann durch gezielte Änderung der Umgebungsbedingungen, etwa der Ionenstärke, des pH-Werts, der Temperatur oder der Polarität des Lösungsmittels, gelöst und so vom Trägermaterial wieder getrennt werden.

Eine besondere reversible Immobilisierung stellt das Ausbilden von Disulfidbrücken zwischen Matrix und Enzym dar. Es handelt sich hierbei um eine kovalente Bindung des Enzyms, die allerdings mit Hilfe von reduzierenden Agenzien wieder getrennt werden kann.

In Tab. 1.2 sind die Vor- und Nachteile verschiedener Immobilisationstechniken aufgelistet.

Tab. 1.2: Vor- und Nachteile einiger Immobilisationsmethoden (BRENA et al. 2013)

Methoden	Vorteile	Nachteile
Adsorption Schwache Bindung auf Grund von Van-der-Waals- oder ionischen Kräften	Einfach und kostengünstig; kaum Veränderung an der Enzymstruktur; wiederverwendbar	Desorption auf Grund der schwachen Kräfte und unspezifische Bindung
Affinität Affinitätsbindung zwischen zwei Partnern	Einfach, hoch spezifisch, wiederverwendbar	Hohe Kosten, durch hohe Spezifität enges Anwendungsspektrum
Kovalente Bindung Chemische Bindung zwischen funktionellen Gruppen des Proteins und der Trägersubstanz	Einfach, kein Entweichen von Enzym; mögliche Stabilisierung des Enzyms	Keine Regenerierung möglich, häufiger Aktivitätsverlust
Einschluss Einschluss des Enzyms in ein Polymer	Große Anwendungsspanne, kaum Veränderung an der Enzymstruktur	Diffusionsbarrieren, Entweichen von Enzym
Quervernetzung Enzyme sind durch einen funktionellen Reaktionspartner untereinander verknüpft	Stabilisierung möglich, spezifische Bindung möglich	Geringe Anwendungsspanne, Diffusionsbarrieren, Aktivitätsverlust

1.2.3 Zellfreie Biokatalyse

Der Einsatz von einzelnen oder mehreren Enzymen, ohne dabei eine lebende Zelle zu verwenden, wird als zellfreie Biokatalyse bezeichnet. Trotz großer Erfolge und vieler Vorteile von Ganzzellbiokatalysatoren weisen diese Arten der Biotransformation auch signifikante Nachteile auf. Zum einen muss für eine lebende Zelle konstant Energie verwendet werden, um ihren Grundstoffwechsel zu erhalten. Es wird demnach immer ein gewisser, nicht zu vernachlässigender Teil des eingesetzten Substrates für Stoffwechselfvorgänge verbraucht, der keine oder nur eine indirekte Bedeutung für die Produktbildung hat (GUTERL & SIEBER 2013).

Des Weiteren besitzt eine Zelle physiologische und physikalische Barrieren, die unter Umständen hinderlich sein können. Sie müssen in einem sehr engen pH- und Temperaturbereich kultiviert werden, der keinen großen Spielraum für eine Optimierung der Produktion des gewünschten Stoffes bietet (HODGMAN & JEWETT 2012). Außerdem besitzen sie Zellmembranen oder teilweise auch Zellwände, die den Stofffluss in und aus der Zelle heraus negativ beeinflussen können (EMMLER et al. 2006). Um lebende Zellen zu optimieren und an den gewünschten Prozess anpassen zu können, muss oftmals *metabolic engineering* durchgeführt werden. Darunter wird die Optimierung genetischer und regulatorischer Prozesse innerhalb einer Zelle verstanden, um die Produktion eines gewünschten Stoffes zu erhöhen. Diese genetischen Veränderungen sind jedoch sehr arbeitsintensiv, kostspielig und der Erfolg ist nicht immer gewiss (KWOK 2010).

Ein weiterer Nachteil der Biotransformation mittels Ganzzellbiokatalysatoren liegt in der Produktion von toxischen Metaboliten oder Endprodukten. So gestaltet sich die fermentative Produktion von höheren Alkoholen wie 1-Butanol oder Isobutanol als schwierig, da diese schon bei geringen Konzentrationen das Zellwachstum hemmen (GUTERL & SIEBER 2013; JIA et al. 2010). Um die Lösungsmitteltoleranz von Mikroorganismen zu erhöhen, müssen viele Faktoren beachtet werden, da nicht alle Organismen gleichartig auf verschiedene Lösungsmittel reagieren (ATSUMI et al. 2010; BRYNILDSEN & LIAO 2009). Um Ganzzellkatalysatoren zu optimieren, sind genetische Veränderungen nötig. Diese Modifikationen sind sehr arbeitsintensiv und können ungewollte Nebenreaktionen hervorrufen, die es zu vermeiden gilt (LOPEZ-GALLEGO & SCHMIDT-DANNERT 2010).

All diese Probleme der Ganzzellbiotransformation deuten darauf hin, dass zukünftige Entwicklungen hinsichtlich neuer Produkte oder Produktionsstämme aufwendig sind und damit unrentabler werden. Eine Lösung hierfür bietet die zellfreie Biotransformation, deren Grundidee darin besteht, chemische Reaktionen nur mithilfe von Enzymen und den benötigten Cofaktoren durchzuführen und den gesamten Rest der Zelle zu entfernen. Die Proteine werden separat produziert und anschließend als gereinigte Enzyme in einem ‚Ein-Topf-Ansatz‘ oder in separaten Reaktionsräumen zusammengeführt, in denen sich dann ausschließlich die benötigten Katalysatoren, Cofaktoren und Substrate befinden (GUTERL & SIEBER 2013; ROLLIN et al. 2013; ZHANG 2010a).

Da gereinigte Biokatalysatoren eingesetzt werden, können zellfreie Biokatalysekaskaden mit Enzymen aus unterschiedlichsten Organismen zusammengesetzt werden. Da die Expression jedes Proteins einzeln durchgeführt und optimiert wird, steigert sich die Effizienz der Enzymproduktion und es können bedeutende Kosten gespart werden (ZHANG 2015). Molekularbiologische Hindernisse, wie beispielweise die posttranslationale Modifikation von Enzymen, die in Prokaryonten nur selten vorkommt, können mit Hilfe eukaryotischer Produktionsstämme umgangen werden. Diese Form von

heterologen Reaktionssystemen ist in Ganzzellbiokatalysatoren nur äußerst schwer zu etablieren (HODGMAN & JEWETT 2012). Die Kombination der Enzyme aus allen Domänen des Lebens ermöglicht verschiedenste Gesamtreaktionen, die nach einem Baukastensystem zusammengeführt werden können. Eine bereits entwickelte Kaskade kann mit anderen Kaskaden kombiniert werden, was wiederum Entwicklungsarbeit erspart. Es sind einfache, lineare Reaktionen, in denen jede Enzymreaktion aufeinander aufbaut, bis hin zu komplexen Netzwerken oder ganzen Stoffwechselwegen möglich (Abb. 1.6). Ebenso lassen sich chemische Katalysatoren mit Biokatalysatoren kombinieren (XUE & WOODLEY 2012).

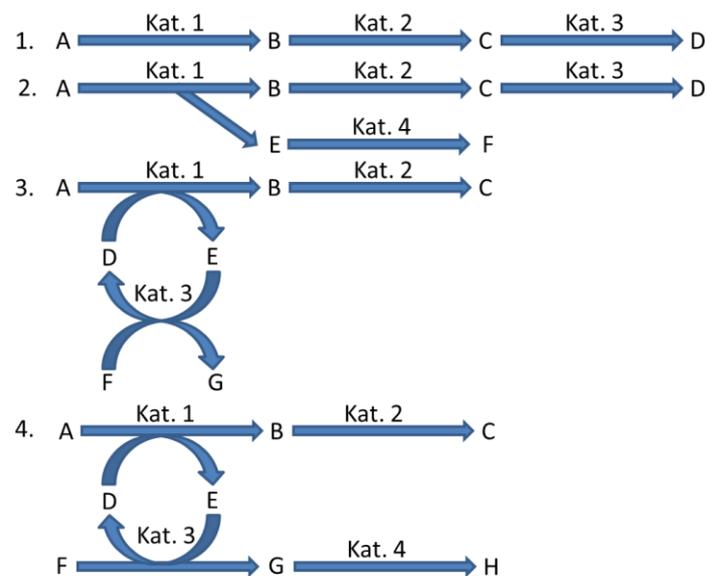


Abb. 1.6: Mögliche Aufbaumöglichkeiten von Multienzymreaktionen. 1. Lineare Reaktion; 2. Linear-parallele Reaktion; 3. Lineare Reaktion mit Recyclingsystem; Parallele Reaktionen mit integriertem Recyclingsystem (KROUTIL 2014).

Zellfreie Biotransformationen können auch in organischen Lösungsmitteln oder in superkritischem CO₂ durchgeführt werden (DUMONT et al. 1992). Ebenso können zytotoxische Substrate verwendet oder Produkte hergestellt werden. Da kein Zellstoffwechsel vorhanden ist, sind die Toleranzen gegenüber beispielsweise 1-Butanol oder Isobutanol deutlich höher (GUTERL et al. 2012; JIA et al. 2010; KLIBANOV 2001). Gerade bei der Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen als Kohlenstoffquelle spielen toxische Stoffe eine besondere Rolle, da die Vorbehandlung von ligninhaltigen Rohstoffen dazu führt, dass Furanderivate, Phenole und Carbonsäuren freigesetzt werden. Zellfreie Enzymsysteme können trotz dieser schädlichen Umgebungsbedingungen weiterhin aktiv sein (NICHOLS et al. 2010). Das Fehlen von physikalischen Barrieren wie Zellmembranen oder -wänden ermöglicht des Weiteren einen konstanten Massentransfer, der die Analyse des Systems vereinfacht und höhere Produktionsgeschwindigkeiten bewirken kann (EMMLER et al. 2006).

Der fehlende Zellstoffwechsel bringt ebenso den Vorteil mit sich, dass die Systeme effizienter sein können. Durch die Produktion der einzelnen Enzyme in separaten Prozessen können diese gezielt einzeln optimiert bzw. bei Bedarf ausgetauscht werden, wodurch weniger Kompromisse im eigentlichen Prozess eingegangen werden müssen und die allgemeine Produktivität gesteigert werden

kann (HODGMAN & JEWETT 2012). Hinzu kommt, dass die eingesetzten Substrate theoretisch zu 100 % in Produkt umgewandelt werden können. Zellfreie Systeme ermöglichen demnach höhere Ausbeuten, da keine Substrate benötigt werden, um den Zellstoffwechsel aufrecht zu halten (GARCÍA-JUNCEDA et al. 2015; XUE & WOODLEY 2012).

Neben der großen Flexibilität des modularen Aufbaus können einzelne Enzyme durch Enzym-Optimierung zudem spezifisch verändert werden, wodurch sich wiederum das System verbessern lässt (BORNSCHEUER & POHL 2001; STEFFLER et al. 2013). (ADRIO & DEMAÏN 2014). (BORNSCHEUER et al. 2012; FABER et al. 2015).

Trotz dieser Vorteile weisen zellfreie Biokatalysen jedoch auch verschiedene signifikante Nachteile auf. Gerade für die Massenproduktion über lange Zeiträume muss Prozessstabilität gegeben sein (IYER & ANANTHANARAYAN 2008). Enzyme sind ein großer Kostenfaktor und müssen daher eine höchstmögliche Stabilität besitzen. In zellfreien Systemen werden sie nicht durch einen Metabolismus erneuert und müssen deshalb an die Prozesse angepasst werden, damit sie den Anforderungen standhalten können. Enzyme entfalten und denaturieren während der Herstellung, bei der Lagerung und bei der Anwendung. Unter Denaturieren wird der Vorgang verstanden, dass die Tertiärstruktur des Proteins entfaltet wird und in ein unorganisiertes Polypeptid übergeht. Sobald ein gewisser Grad an Denaturierung erreicht ist, verliert ein Enzym an Aktivität. Die Denaturierung kann unter Umständen reversibel sein, solange keine chemischen Veränderungen des Polypeptids stattgefunden haben. Gründe für Denaturierungen können physikalischer Natur sein und damit Temperatur, Druck oder mechanische Kräfte betreffen, oder chemischer bzw. biologischer Natur, was sich in Salzkonzentrationen oder Proteasen äußert (Tab. 1.3).

Tab. 1.3: Folgen von chemischen Denaturierungsmitteln (SCHMID 1979)

Grund für Denaturierung	Ziel	Folge
Säuren	Vergrabene ungeladene Gruppen	Random Coil
Basen	Vergrabene ungeladene Gruppen	Random Coil
Salze	Un/polare Gruppen	Ungeordnete Struktur
Lösungsmittel	Unpolare Gruppen	Ungeordnetes Peptid mit großen helicalen Bereichen
Tenside	Hydrophobe oder geladene Regionen	Unvollständig ungeordnete Strukturen
Oxidationsagenzien	Funktionelle Gruppen (cys, met, trp)	Inaktives Enzym
Schwermetalle	Funktionelle Gruppen (cys, his)	Inaktives Enzym
Komplex/Chelatbildner	Strukturell wichtige Kationen	Inaktives Enzym

Dieselben Möglichkeiten, um die Aktivität eines Enzyms zu erhöhen, stehen auch für die Erhöhung der Stabilität gegenüber Denaturierungsmitteln oder physikalischen Kräften zu Verfügung. Es ist demnach möglich, die Stabilität und die Widerstandsfähigkeit eines Enzyms mittels Protein-Engineering oder Immobilisation zu erhöhen (FÁGÁIN 1995; GIANFREDA & SCARFI 1991). Außerdem können, um die Temperaturstabilität zu gewährleisten, thermophile Enzyme verwendet werden (NIEHAUS et al. 1999a).

Bei der Entwicklung und Umsetzung von zellfreien Biokatalysen spielen die Proteinreinigung und Lagerung sowie die benötigten Cofaktoren der Enzyme eine zentrale Rolle. Es existieren zahlreiche Methoden und Möglichkeiten zur Enzymreinigung, jedoch muss jedes neue Enzym einzeln getestet und optimiert werden (DEUTSCHER 1990; KORNBERG 2009). Die Bereitstellung von essenziellen

enzymatischen Cofaktoren bedeutet ein weiteres Problem, da diese oft sehr teuer sind, weshalb der Einsatz von Cofaktoren bei der Entwicklung von zellfreien Biokatalyse-Prozessen unbedingt minimiert werden muss. Es liegen Arbeiten zur Entwicklung neuerer, günstigerer artifizierter Cofaktoren vor, die ihre teuren Gegenstücke ersetzen können. Die enzymatischen Aktivitäten liegen allerdings noch deutlich unter denen mit natürlichen Cofaktoren (NOWAK et al. 2015). Daher wird heutzutage oft das Cofaktorrecycling vorgezogen. Im folgenden Abschnitt wird darauf detailliert eingegangen.

1.2.3.1 Cofaktorrecycling

Eine Vielzahl an enzymkatalysierten Prozessen, die industriell Anwendung finden, sind Cofaktor-freie Reaktionen. Hier sind Isomerasen oder Hydrolasen zu nennen. Um komplexere Prozesse enzymatisch zu betreiben, erweisen sich Cofaktoren als unersetzlich. Beispielsweise benötigen enzymatisch katalysierte Redoxreaktionen, Phosphorylierungen oder Acylierungen Cofaktoren. Da die benötigten Cofaktoren allerdings sehr teuer sind, ist es wirtschaftlich unrealistisch, diese in stöchiometrischen Mengen zuzugeben. Aus diesem Grund wurden Recyclingsysteme entwickelt, die dabei helfen, die benötigte Cofaktormenge zu reduzieren. Häufig finden sich Reaktionssysteme, in denen parallel ablaufende Katalysen stattfinden, die es ermöglichen, die instabilen Cofaktoren *in situ* zu regenerieren. In Tab. 1.4 ist eine Übersicht von industriell relevanten Cofaktoren und möglichen enzymatischen Regenerierungssystemen zu finden (ZHAO & VAN DER DONK 2003).

Tab. 1.4: Liste von Cofaktoren und deren enzymatischen Regenerierungssystemen modifiziert nach (ZHAO & VAN DER DONK 2003)

Cofaktor	Reaktion	Regenerierungssysteme	Quelle
NAD(P)⁺	Redoxreaktion Hydridionakzeptor	NAD(P)H Oxidase Glutamatdehydrogenase	(NOWAK et al. 2015) (LEE & WHITESIDES 1986)
NAD(P)H	Redoxreaktion Hydridiondonor	Glucosedehydrogenase (GDH) Formiatdehydrogenase (FDH)	(WICHMANN et al. 2000) (BINAY et al. 2016)
NTP	Phosphorylierungen	Phosphotransferase und Adenylate Kinase	(RESNICK & ZEHNDER 2000)
CoA	Acytransfer	Phosphotransacetylase	(BILLHARDT et al. 1989)

Nikotinamid-Cofaktoren

Sowohl NAD⁺ als auch NADP⁺ und deren reduzierte Form NADH/NADPH stellen häufig eingesetzte Redoxcofaktoren dar. Vor allem Alkoholdehydrogenasen (ADH) und Ketoreduktasen benötigen NAD(P)⁺ bzw. NAD(P)H. Da ADHs unverzichtbare Reaktionen katalysieren, wurde in den letzten 30 Jahren im Bereich der Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren ein großer Forschungsaufwand betrieben. Mittlerweile beschreibt die enzymatische Regeneration nur eine von vielen Möglichkeiten, NAD(P) bzw. NAD(P)H zu regenerieren. Hinzu kommen chemische, elektrochemische oder photokatalytische Regenerationssysteme sowie speziell entwickelte Ganzzellsysteme (WANG et al. 2017). Die enzymatische Regeneration ist bis heute das einzige System, das industrielle Relevanz besitzt, da es unter den identischen Bedingungen wie die Zielreaktion ablaufen kann und sehr einfach zu handhaben ist (ANGELASTRO et al. 2017). Die ersten Berichte über den Einsatz von Enzymen für die Regeneration von NADP⁺ wurden bereits im Jahr 1957 publiziert (RAFTER & COLWICK 1957). Heutzutage werden vor allem Glucosedehydrogenase (GDH) und Formiatdehydrogenase (FDH) verwendet. GDH besitzt den Vorteil, günstig und hoch aktiv zu sein. Dagegen ist FDH zwar weniger

aktiv, jedoch entsteht als Produkt der von FDH katalysierten Reaktion $\text{CO}_{2(\text{gas})}$, das sich positiv auf das Reaktionsgleichgewicht auswirkt, da es aus dem Reaktionsgleichgewicht entweicht.

Wie auch bei Enzymen selbst, wurden Möglichkeiten untersucht, Cofaktoren durch Immobilisierung zu stabilisieren bzw. länger für die Reaktion verfügbar zu machen. So konnte NADH auf Chitosan beschichteten magnetischen Nanopartikeln mittels 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimidehydrochlorid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) verknüpft werden. Dies ermöglicht eine Rückgewinnung mittels eines externen Magneten und eine anschließende Wiederverwertung (CHEN et al. 2015). Ähnlich den Problemen der Enzymimmobilisierung sind auch Cofaktorimmobilisierungen mit niedrigeren Umsatzraten und langsameren Stoffflüssen behaftet. Diese müssen mittels höherer Recyclingraten und Lebensdauer kompensiert werden (WANG et al. 2017).

Nukleotid-Cofaktoren

NTP-Recycling wird benötigt, wenn Phosphorylierungen in Reaktionskaskaden zum Einsatz kommen. Eine Kinase überträgt dabei die Phosphatgruppe auf NDP. Die breite Substratspezifität ermöglicht ein Recycling von unterschiedlichen NTPs wie ATP, GTP, UTP und CTP. Es werden derzeit drei verschiedene enzymatische Methoden zur NTP-Regenerierung eingesetzt (CHENAULT & WHITESIDES 1987; ENDO & KOIZUMI 2001):

- Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvatkinase
- Acetylphosphat und Acetatkinase
- Polyphosphat und Polyphosphatkinase (SIEKER et al. 2011).

Ein weiteres Regenerationssystem für ATP wurde auf Basis von anorganischem Polyphosphat (Poly(P)) entwickelt. Katalysiert durch die AMP-Phosphotransferase (KOUTINAS et al. 2016) und Polyphosphatkinase (SIEKER et al. 2011) kann ATP ausgehend von AMP generiert werden. Als Vorteil dieses Systems sind die kostengünstigen Ausgangsmaterialien zu nennen, wie etwa Poly(P), ein lineares Polymer aus Orthophosphaten mit energetisch hohen Phosphoanhydridverknüpfungen. Hinzu kommt die Verwendung von AMP, das häufig bei Phosphorylierungsreaktionen anfällt und nicht durch die oben beschriebenen Recyclingmethoden regeneriert werden kann. In Abb. 1.7 ist das Recyclingsystem abgebildet. Es verwendet die Enzyme AMP-Phosphotransferase (KOUTINAS et al. 2016) und PPK zur schrittweisen Regenerierung von ATP über ADP. Inhibitorische Effekte des PP_i werden durch den Einsatz von anorganischer Pyrophosphatase (PPase) umgangen (KAMEDA et al. 2001; RESNICK & ZEHNDER 2000).

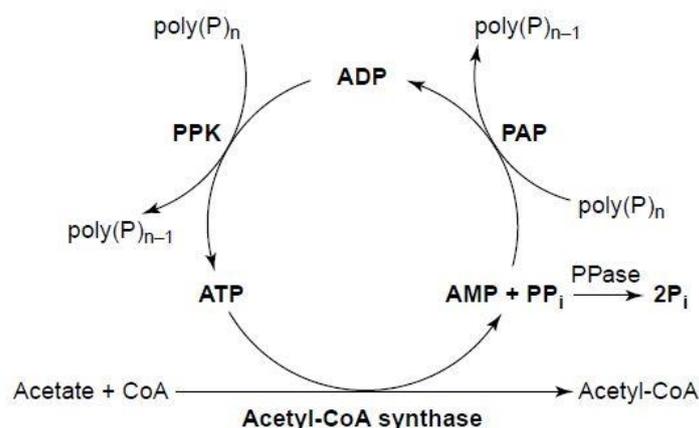


Abb. 1.7: Das PAP-PPK-ATP-Regenerationssystem ausgehend von AMP, gekoppelt mit der Synthese von Acetyl-CoA. Die verwendeten Enzyme sind AMP-Phosphotransferase (KOUTINAS et al. 2016); Polyphosphatkinase (SIEKER et al. 2011) und anorganische Pyrophosphatase (PPase) (KAMEDA et al. 2001).

1.2.4 Beispiele für zellfreie Biokatalysen

1.2.4.1 Enzymvermittelte dynamische kinetische Racematspaltung

Bei der dynamischen kinetischen Racematspaltung handelt es sich um eine kinetische Racematspaltung, bei der 100 % einer racemischen Verbindung in eine enantiomerenreine Verbindung umgewandelt werden können. Gerade für die Herstellung von sekundären Alkoholen ist diese Art der Reaktion besonders interessant. In Abb. 1.8 ist das Schema einer DKR dargestellt. Ein racemisches Gemisch dient als Ausgangsstoff für die Herstellung von (R)-Produkt. Das (R)-Substrat wird mittels eines stereospezifischen Enzyms umgesetzt, während das (S)-Substrat zurückbleibt. Wird nun das (S)-Substrat erneut racemisiert, so katalysiert das Enzym erneut die (R)-Produktbildung. Ohne dieses Recyclingsystem würde das Enzym maximal 50 % des zur Verfügung stehenden Substrates umsetzen. Durch das Recycling ist Vollumsatz theoretisch möglich. Diese Racemisierung wird oft mittels Metallkatalysatoren durchgeführt (KIM et al. 2008). Häufig verwendete Enzyme in der DKR sind Lipasen, die stereospezifische Acylierungen durchführen. Ein Beispiel für eine solche Reaktion veranschaulicht Abb. 1.9. Hier wird eine asymmetrische reduktive Acylierung eines Ketons durchgeführt. Die DKR des Alkoholintermediats wird durch die Hydrierung mittels eines Ru(II)-Katalysators durchgeführt (JUNG et al. 2000).

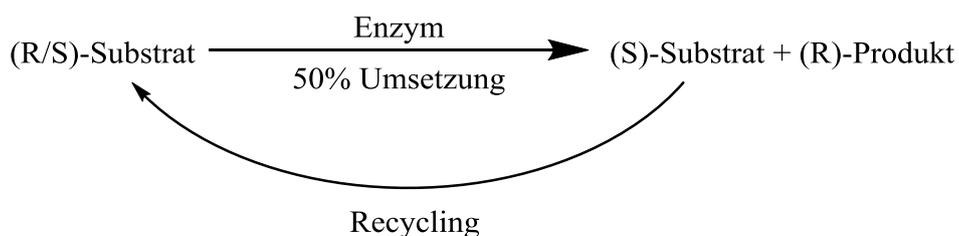


Abb. 1.8: Schema einer (R)-selektiven Auflösung eines Racemischen Substratgemisches mit Hilfe eines Recyclingsystems zur kompletten Umsetzung (KIM et al. 2008).

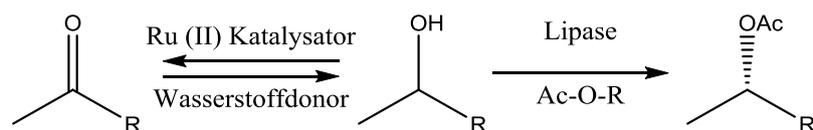


Abb. 1.9: Beispiel-Reaktion für eine reduktive Acylierung und eine DKR eines Ketons (JUNG et al. 2000).

Ein weiteres Beispiel für eine DKR stammt von Adam et al. 1998 (Abb. 1.10). Hier ist die Kombination aus enzymatischer Reduktion, DKR und Cofaktorrecycling ersichtlich. Die Autoren beschreiben, wie es möglich ist, ein racemisches Gemisch einer Hydroxysäure in eine

enantiomerenreine Hydroxysäure zu überführen. In diesem Fall wird keine chemische Katalyse verwendet; die komplette Reaktion basiert auf Biotransformationen. Das (R/S)-Substrat wird von einer Glycolat-Oxidase aus *Spinacia oleracea* oxidiert und in die Ketosäure überführt, woraufhin das entstehende Wasserstoffperoxid mit Hilfe einer Katalase entfernt wird. Anschließend wird durch eine enantioselektive D-Lactatdehydrogenase aus *Lactobacillus leichmannii* die (R)-Hydroxysäure hergestellt. Diese Reduktion benötigt NADH, das mit Hilfe des Formiatdehydrogenase-Cofaktorrecyclings bereitgestellt wird. Dieses Beispiel verdeutlicht die Flexibilität von Multienzymkatalysen. Es ist möglich, verschiedenste Module, wie das Cofaktorrecycling oder die Katalase, zu einem System hinzuzufügen, ohne weitere Entwicklungsarbeit zu leisten (ADAM et al. 1998).

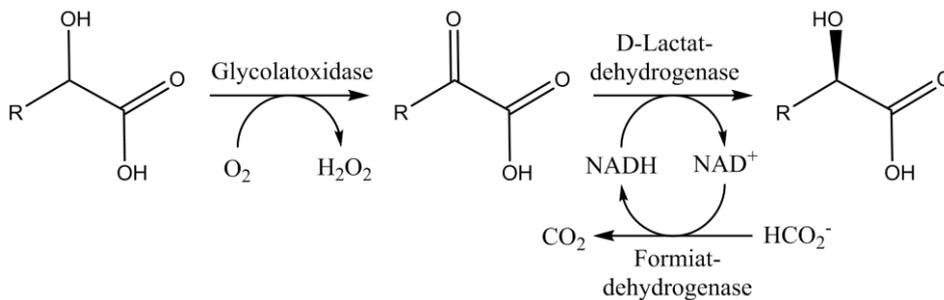


Abb. 1.10: Transformation von racemischen Hydroxysäuren in (R)-Hydroxysäuren mittels Glycolatoxidase und enantioselektiver D-Lactatdehydrogenase. NAD⁺ wird durch Formiatdehydrogenase recycelt und H₂O₂ wird durch Katalase entfernt (ADAM et al. 1998).

1.2.4.2 Zellfreie Enzymkaskaden

Die Literatur beschreibt eine Vielzahl an Enzymkaskaden und auch am Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe der TU München wurden verschiedene Enzymkaskaden entwickelt (FINDRIK & VASIĆ-RAČKI 2009; GUTERL & SIEBER 2013; SPERL & SIEBER 2018). Eine hier entwickelte Enzymkaskade basiert auf sechs bzw. acht unterschiedlichen Enzymen, die aus Glukose Ethanol bzw. Isobutanol bilden (GUTERL et al. 2012). Diese Kaskade wird in Kapitel 2 detailliert beschrieben, wobei auch Erweiterungen dargestellt werden. Des Weiteren wurde ein Enzymsystem zur Produktion von α -Ketoglutarat (aKG) entwickelt (BEER et al. 2017). aKG ist ein wesentliches Intermediat des Citratzyklus und Aminosäuremetabolismus. Außerdem spielt es eine zentrale Rolle in der Stickstofffixierung. Das industrielle Interesse basiert auf der Verwendung von aKG in Nahrungsergänzungsmitteln und als Baustein für die chemische Synthese von Heterozyklen (CHERNYAVSKAYA et al. 2000; HUANG et al. 2006; VERSECK et al. 2007). Die bisherige chemische Synthese bringt signifikante Nachteile mit sich, da giftige Stoffe wie Cyanide verwendet werden und zusätzlich viele Nebenprodukte entstehen (STOTTMEISTER et al. 2005). Da aKG in verschiedensten natürlichen Reaktionen auftaucht und demnach auch viele Enzyme zur Verfügung stehen, die aKG und seine Vorläufer bilden, ist eine Produktion mittels Biokatalyse durchaus sinnvoll. Die hier dargestellte Reaktionskaskade besteht aus vier Enzymen und einem zusätzlichen zur Cofaktorregeneration (Abb. 1.11). Die Oxidation von D-Glukuronat zu D-Glukarat ist die erste Reaktion und wird von einer Urunatdehydrogenase aus *Agrobacterium tumefaciens* katalysiert (PICK

et al. 2015). Als nächstes wird Glukarat von einer Glukaratedehydratase aus *Actinobacillus succinogenes* zu 5-Keto-4-Deoxyglucarate (5-4-KDG) dehydriert, gefolgt von einer weiteren Dehydration bei gleichzeitiger Decarboxylierung. Dies wird von einer 5-4-KDG-Dehydratase aus *Acinetobacter baylyi* katalysiert und es entsteht α -Ketoglutarat Semialdehyd (KGSa) (AGHAIE et al. 2008). Der letzte Reaktionsschritt dieser Kaskade wird von einer KGSa-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* katalysiert und bildet schließlich α -Ketoglutarat. Hinzu kommt eine NADH-Oxidase (NOX) aus *Lactobacillus pentosus*, die NADH zu NAD^+ und H_2O katalysiert, um den Cofaktor NAD^+ zu regenerieren (NOWAK et al. 2015). Die Reaktion erreichte eine Produktionsrate von $2,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit Ausbeuten von 92 % bei einer Konversion von 10 g L^{-1} Substrat. Die Reaktion wurde mit zusätzlichem Sauerstoff begast, da NOX diesen zur Cofaktorregeneration benötigt. Die Begasung ermöglichte eine Reduktion der Prozesszeit von 150 h auf 5 h.

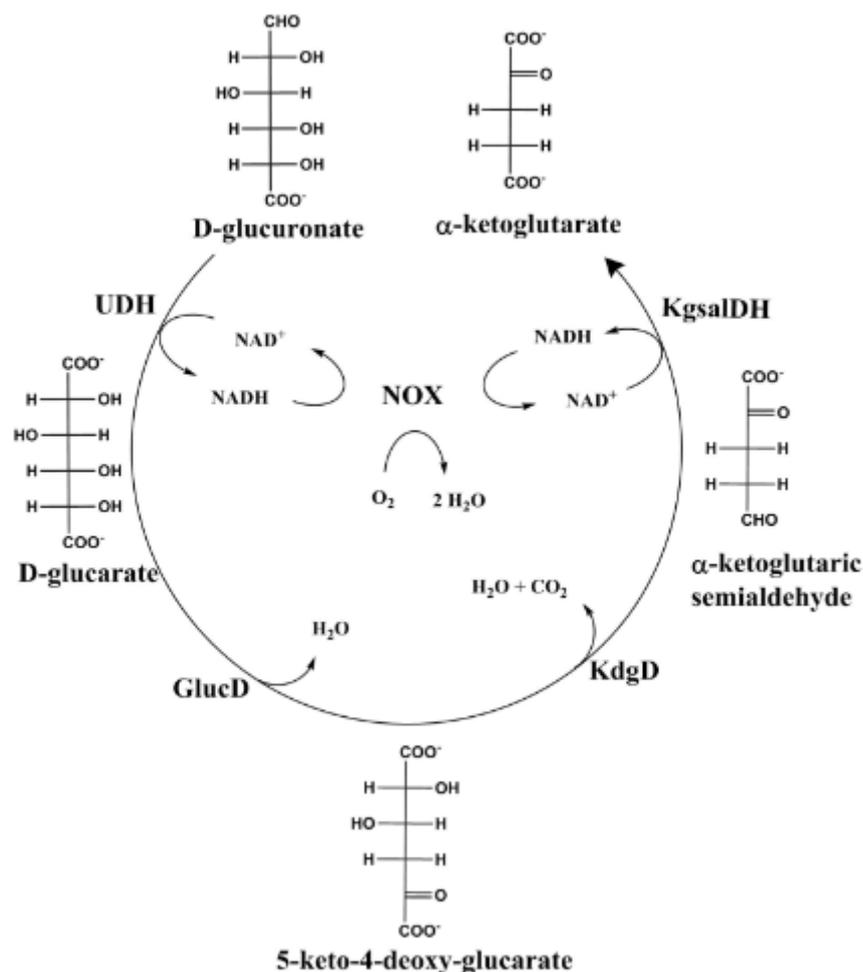


Abb. 1.11: Enzymatische, oxidative Reaktionskaskade zur Produktion von α -Ketoglutarat aus D-Glucuronat. Verwendete Enzyme sind Urunatdehydrogenase (**UDH**); Glukaratedehydratase (**GlucD**); Ketodeoxyglucaratedehydratase (**KdgD**) und Kgsa-Dehydrogenase (**KgsalDH**). Als NAD^+ Regenerationssystem wurde NADH-Oxidase (**NOX**) eingesetzt (BEER et al. 2017).

1.2.4.3 Zellfreie Stoffwechselreaktionen

Ähnlich der zellfreien Enzymkaskaden sind in den letzten Jahren auch zahlreiche zellfreie Stoffwechselwege entwickelt worden. Der Unterschied zwischen beiden Arten der zellfreien Biokatalyse besteht lediglich in der Anzahl an verwendeten Enzymen, die bei den Stoffwechselreaktionen typischerweise größer als 5 ist (GUTERL & SIEBER 2013; ZHANG 2015). Ein besonderes Beispiel für zellfreie Stoffwechselreaktionen ist die Produktion von molekularem Wasserstoff aus Glukose unterschiedlichen Ursprungs (ZHANG 2011).

- (1) $C_6H_{10}O_5 (l) + 7 H_2O (l) \rightarrow 12 H_2 (g) + 6 CO_2 (g)$
- (2) $(C_6H_{10}O_5)_n + H_2O + P_i \leftrightarrow (C_6H_{10}O_5)_{n-1} G-1-P$
- (3) $G-6-P + 12 NADP^+ + 6 H_2O \leftrightarrow 12 NADPH + 12 H^+ + 6 CO_2 + P_i$
- (4) $12 NADPH + 12 H^+ \leftrightarrow 12 H_2 + 12 NADP^+$

Formel 1.1 Dargestellt sind die unterschiedlichen Reaktionen der Stoffwechselreaktion (1) Gesamt-Reaktionsbilanz; (2) Phosphorilierung von Stärke; (3) Pentosephosphatweg; (4) Generierung von molekularem Wasserstoff (ZHANG et al. 2007).

Als Substrat kommen Stärke (ZHANG et al. 2007), Cellulose (YE et al. 2009; ZHANG 2009) oder auch Xylose (MARTÍN DEL CAMPO et al. 2013) in Frage. Die hier beschriebene und dem System zugrunde liegende Gesamtreaktion besteht aus 13 unterschiedlichen Enzymen und kann in drei generelle Teile unterteilt werden (Abb. 1.12).

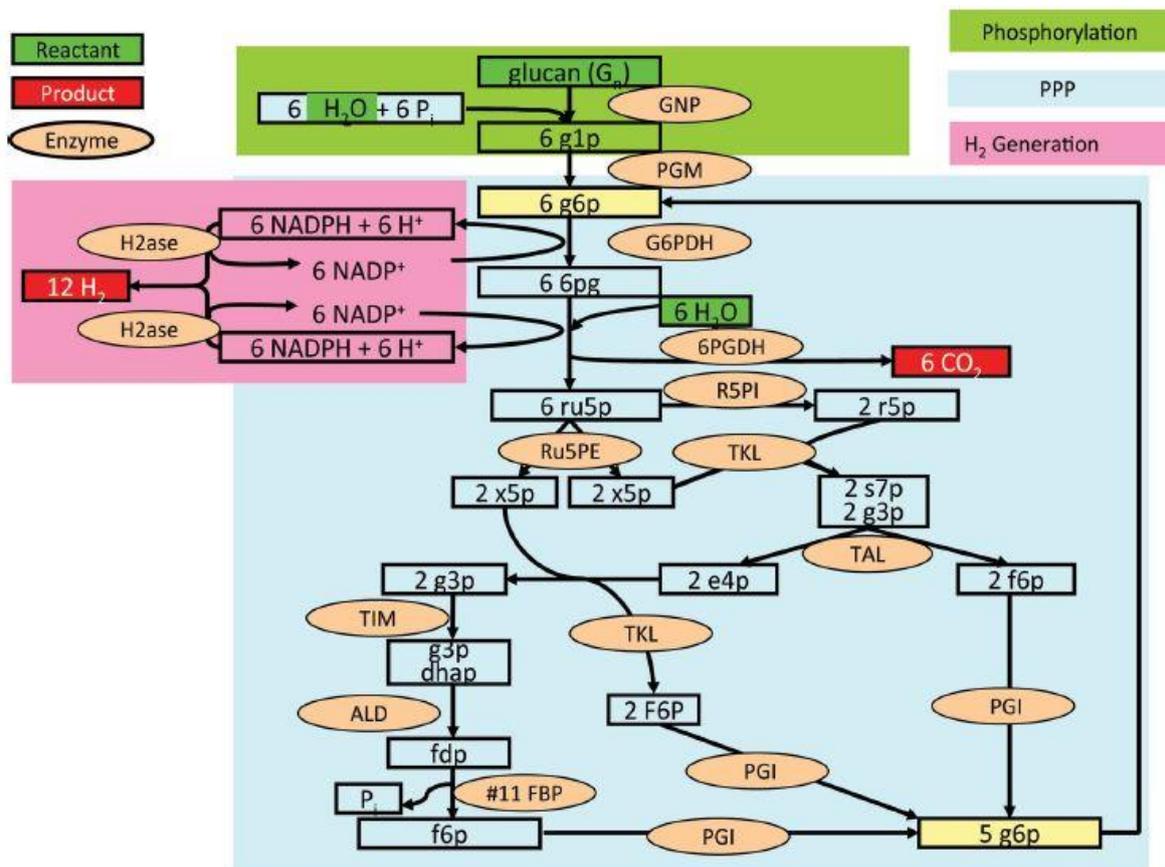


Abb. 1.12 Zellfreie Stoffwechselreaktion zur Produktion von molekularem Sauerstoff und CO₂ aus Glukan (ZHANG et al. 2007). PPP, Pentosephosphatweg; G1P, Glukose-1-phosphat; G6P, Glucose-6-phosphat; 6PG, 6-Phosphoglukonat; Ru5P, Ribulose-5-phosphat; P_i anorganisches Phosphat. Die eingesetzten Enzyme sind: **GNP** Glukanphosphorylase; **PGM**, Phosphoglukomutase; **G6PDH**, G-6-P-Dehydrogenase; **6PGDH**, 6-Phosphoglukonatdehydrogenase, **R5PI** Phosphoriboseisomerase; **Ru5PE**, Ribulose 5-phosphatepimerase; **TAL**, Transaldolase; **TKL**, Transketolase, **TIM**, Triosephosphatisomerase; **ALD**, Aldolase, **FBP**, Phosphoglukoseisomerase; **PGI**, Fructose-1, 6-bisphosphatase; und **H2ase**, Hydrogenase (MYUNG et al. 2014).

Der erste Teil besteht aus der Kettenverkürzung und Phosphorylierung des Substrats sowie der Verschiebung der Phosphatgruppe an C6 (Formel 1.1 (2)). Diese Eingangsreaktion kann mit Stärke, Xylose oder Cellulose durchgeführt werden (MARTÍN DEL CAMPO et al. 2013; YE et al. 2009; ZHANG 2009; ZHANG et al. 2007), wobei für das Substrat Xylose keine Kettenverkürzung stattfindet, sondern eine Isomerisierung zu Xylulose durchgeführt wird (MARTÍN DEL CAMPO et al. 2013). Der Hauptteil der Stoffwechselreaktion ist der Pentosephosphatweg. Dieser aus zehn unterschiedlichen Enzymen bestehende Stoffwechselweg bildet aus Glukose-6-phosphat und NADP⁺ die Produkte NADPH und CO₂ (Formel 1.1 (3)). Das entstandene NADPH wird dann in einem dritten Teil zu molekularem Wasserstoff und NADP oxidiert. Diese Reaktion wird von Hydrogenasen katalysiert (4). Das NADP⁺ wird nun erneut im Pentosephosphatweg reduziert und die Reaktion läuft weiter.

Der Pentosephosphatweg als zellfreies System, gekoppelt an Hydrogenasen zur Produktion von Wasserstoff, wurde erstmals von Woodward et al. 2000 veröffentlicht. Dort konnte gezeigt werden, dass ausgehend von Glukose-6-phosphat mit Hilfe des Pentosephosphatwegs und einer Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* pro Mol Substrat 11,6 Mol H₂ gebildet wurde (WOODWARD et al. 2000). Der Aufbau konnte jedoch nur eine Produktionsrate von 425 nmol h⁻¹ erreichen und wird lediglich als Wirksamkeitsnachweis angesehen. Der in Abb. 1.12 beschriebene Ansatz arbeitet mit 1000-fach höheren Substratkonzentrationen und ermöglicht eine H₂-Produktionsrate von 0,44 mM h⁻¹. Außerdem wurden molare Ausbeuten von 43 % für Wasserstoff und 86 % für CO₂ erreicht (ZHANG et al. 2007). Die Autoren erklären die unterschiedlichen Ausbeuten mit der Anreicherung von Intermediaten und des Cofaktors NADPH. Weitere Experimente haben gezeigt, dass das Substrat variabel ist und dass durch Optimierungen des Systems und den Austausch von einzelnen Enzymen höhere Produktionsraten erzeugt werden können. So konnten H₂-Bildungsraten von 2,23 mM h⁻¹ mit Xylose als Substrat (MARTÍN DEL CAMPO et al. 2013) und 3,92 mM h⁻¹ mit Cellopentoase als Substrat erreicht werden (YE et al. 2009).

Dieses vielversprechende System konnte aber auch auf der Produktseite erweitert werden. So wurde beispielweise eine auf dem gleichen enzymatischen Stoffwechselweg bestehende Brennstoffzelle entwickelt, die aus 1 Mol Glukose 24 Elektronen generieren kann. Deren Anwendung käme gezielt bei tragbaren Elektrogeräten zur Anwendung, die somit nicht geladen werden müssten, sondern mittels einer Substratlösung ‚betankt‘ werden könnten (ZHANG 2015; ZHU et al. 2014).

Die Forschung im Bereich von enzymatischen Kaskaden und Stoffwechselwegen kann nicht darüber hinwegtäuschen, dass bislang nur wenige Anwendungen industriell umgesetzt wurden. Die Gründe hierfür sind vielfältig und reichen von Enzym- und Cofaktorkosten über hohe Investitionskosten und bereits etablierte, effizientere Produktionsverfahren. Dennoch konnten sich verschiedene enzymatische Systeme aus unterschiedlichen Gründen in der Industrie etablieren. Im Folgenden wird auf drei enzymatische Systeme eingegangen, die heute eine große industrielle Relevanz besitzen.

1.2.5 Industrielle Biotechnologie in der Praxis

Diverse Produkte werden mittlerweile über biotechnologische Prozesse hergestellt und haben eine bedeutende wirtschaftliche Relevanz. Um einen Überblick darüber zu vermitteln und die Vielseitigkeit darzustellen, werden hier drei Beispiele genannt, wobei zunächst Bioethanol in den Fokus gerückt werden soll. Laut Bundesverband der deutschen Bioethanolwirtschaft e. V. wurden in Deutschland im Jahr 2017 673.000 t Bioethanol hergestellt. In diesem Abschnitt wird auf die modernste Variante der Cellulose-Bioethanol-Herstellung eingegangen. Das zweite Beispiel ist Bernsteinsäure, ein Produkt, das noch über ein chemisches Verfahren aus der C4-Fraktion von Naphtha gewonnen wird. Die biotechnologische Produktion hat jedoch signifikante Vorteile und nimmt deshalb stetig zu. Als drittes Beispiel wird die β -Lactam-Vorstufe 6-APA als pharmazeutisches Zwischenprodukt thematisiert. Die Herstellung dieser Antibiotika-Vorstufe soll vor allem zeigen, dass biotechnologische Prozesse in unterschiedlichen Bereichen zur Anwendungen kommen.

1.2.5.1 Cellulose-Bioethanol

Mit der Einführung von E10-Benzin an deutschen Tankstellen wurde eine große Zahl von Verbrauchern auf die Beimischung von Ethanol zum Normalbenzin aufmerksam. Dadurch wurden aber auch die Herstellungspraktiken von Bioethanol hinterfragt. Ethanol wird bei der Gärung von zuckerhaltiger Biomasse mit Hilfe von Mikroorganismen, vorzugsweise *Saccharomyces cerevisiae*, gebildet. So werden vor allem kohlenhydratreiche Pflanzen für die Bioethanol-Herstellung angebaut – in Mittel- und Lateinamerika Zuckerrohr, in Nordamerika Mais und in Europa Weizen und Zuckerrüben. Diese Herstellungsweise lässt jedoch einen Konflikt entstehen, da einerseits große Ackerflächen und viel Wasser benötigt werden, um ausreichende Mengen an Bioethanol herzustellen. Andererseits wird so auch direkt in die Lebensmittelproduktion eingegriffen (FARGIONE et al. 2008) (VON LAMPE et al. 2008). Hinzu kommt die massive staatliche Subventionierung von Bioethanol, um mit den konventionellen Treibstoffen wirtschaftlich konkurrieren zu können (DOORNBOSCH & STEENBLIK 2008). Um diese Probleme zu umgehen, wurden neue Prozesse entwickelt, die im Fall von Bioethanol als Bioethanol-Produktion der 1., 2. und 3. Generation bezeichnet werden. Ziel ist es, nicht nur den stärkehaltigen Teil der Pflanze zu nutzen, sondern die gesamte Pflanze, also auch Getreide- oder Maisstroh. Für Bioethanol-Produktionsstätten der 2. Generation können Pflanzen und Pflanzenrückstände, wie Forstrückstände (z. B. Holzreste), krautartige Pflanzen (z. B. Süßgräser) oder Pflanzen aus trockenen Regionen (z. B. Agaven) genutzt werden (SOMERVILLE et al. 2010), die zum größten Teil aus Cellulose (35–50 %, Trockenmasse), Hemicellulose (15–30 %), Pektin (2–5 %) und Lignin (12–35 %) bestehen (ZHU et al. 2009). Cellulose und Hemicellulose können zu verwertbaren Zuckern konvertiert werden, die dann zur Ethanolproduktion verwendet werden können. Dies geschieht mit Hilfe von Enzymen, so genannten Cellulasen und Hemicellulasen (KANG et al. 2004), die die Polymere hydrolysieren und die darin enthaltenen Mono- und Disaccharide (hauptsächlich Glukose, Xylose und Arabinose) bereitstellen. Beide Polymere bestehen zwar größtenteils aus Glukose, sind allerdings sehr schlecht wasserlöslich, da sie strukturegebend für die Pflanze und damit sehr widerstandsfähig sind. Dies bedeutet, dass die Biomasse vorbehandelt werden muss, um die

Handhabung zu erleichtern. Zusätzlich muss Lignin von der restlichen Biomasse getrennt und die Zugänglichkeit für die hydrolysierenden Enzyme erhöht werden (YANG & WYMAN 2008). Lignin ist ebenfalls ein strukturgebendes Polymer und wirkt inhibierend auf die Enzyme, die in der Fermentation der Mono- und Disaccharide eingesetzt werden. Darüber hinaus kann es nicht vollständig zu vergärbaren Monomeren zerkleinert werden und stellt daher aufgrund seiner Widerstandsfähigkeit biotechnologische Prozesse vor große Herausforderungen.

Grundsätzlich existieren verschiedene Möglichkeiten der Vorbehandlung. Gehäckselte Biomasse kann entweder chemisch oder physikalisch weiterbehandelt werden, um sie strukturell für den enzymatischen Verdau zugänglicher zu machen. Bei chemischen Verfahren werden Säuren zugegeben, wodurch die Struktur aufgebrochen wird (WYMAN et al. 2005). Physikalische Verfahren wie *steam explosion* arbeiten mit Wasser, das innerhalb der Zellstrukturen verdampft wird, um durch die Expansion die Biomasse aufzuschließen (ZHU et al. 2009). Auf die Vorbehandlung folgen eine enzymatische Hydrolyse und Ethanolfermentation. Da die Vorbehandlung und Hydrolyse die kostspieligsten Prozessschritte darstellen, haben sie besonders viel Aufmerksamkeit erhalten (LYND et al. 2008; ZHU & PAN 2010). Es konnten in den letzten Jahren viele Fortschritte erzielt werden, um die Produktion von Cellulose-Bioethanol effizienter und ökonomischer zu gestalten und damit den Teller/Tank-Konflikt zu entschärfen. Jedoch müssen weitere Fortschritte folgen, damit die Kosten für Produktionsanlagen weiter sinken und die Produktion profitabler wird (GUSAKOV 2013; KUMAR et al. 2016; SIMS et al. 2010). Ein wesentlicher Teil dieses Fortschritts sind die freien, gereinigten Enzyme, die dazu dienen, die Verfügbarkeit der Glukose zu erhöhen und damit die Fermentationsausbeute zu steigern. Im gleichen Zuge werden die Effizienz des Produktionsprozesses und die Wirtschaftlichkeit erhöht.

Im Sinne der Vollständigkeit soll die Bioethanolproduktion oder auch Biotreibstoffproduktion der 3. Generation hier noch genannt, aber nicht vertieft werden. Diese nutzt Algen als Kohlenstoffquelle, um entweder Biomasse oder von den Algen produzierte Lipide zu produzieren, die als Rohstoff verwendet werden. Ethanol als Produkt eignet sich nur bedingt für die 3. Generation Biotreibstoffe, bessere Produkte sind Methan, Biodiesel oder auch Wasserstoff (ALAM et al. 2015).

1.2.5.2 Bernsteinsäure

Bernsteinsäure ist eine Plattformchemikalie und damit Ausgangsstoff für viele andere Stoffe. Sie findet Verwendung in der Herstellung von Farben, Kunststoffen, Lebensmittelzusatzstoffen und weiteren Produkten (SONG & LEE 2006). Das Konzept der industriellen Biotechnologie wird hier genutzt, um die konventionelle Produktion zu ersetzen und dadurch ganze Prozesssysteme nachhaltiger zu gestalten. Die Säure wird chemisch aus n-Butan/Butadien über Maleinsäureanhydrid als Zwischenstufe hergestellt. Die Ausgangsstoffe finden sich in der C4-Fraktion von Naphtha. Mit Hilfe dieses Prozesses werden jährlich rund 15–30.000 t Bernsteinsäure hergestellt (CUKALOVIC & STEVENS 2008; ZEIKUS et al. 1999). Jedoch hat die fermentative Produktion über die Jahre an Bedeutung gewonnen (MARKETS 2017). Es wird geschätzt, dass bis zum Jahr 2021 70 % des weltweiten Bernsteinsäurebedarfs aus biotechnologischen Prozessrouten gewonnen wird. Bernsteinsäure ist ein Intermediat im Citratzyklus, findet sich demnach im Stoffwechsel vieler Organismen und kann somit durch rekombinante Mikroorganismen wie *E. coli* und *S. cerevisiae*

produziert werden. Die gängigen Produktionsstämme sind genetisch so verändert, dass der Stoffwechselweg zur Bernsteinsäure bevorzugt wird, da Enzyme zur Bildung der Nebenprodukte wie Lactat, Essigsäure und Ameisensäure deletiert wurden. Der große Vorteil der fermentativen Produktion liegt in der Bindung von CO₂; pro Mol Bernsteinsäure wird ein Mol CO₂ gebunden. Dementsprechend stellt die Produktion von Bernsteinsäure ein gutes Beispiel für die Produktion von Plattformchemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen dar (KUBICEK et al. 2009).

1.2.5.3 β -Lactam-Antibiotika

Die industrielle Biotechnologie findet auch in pharmazeutischen Prozessen erfolgreich Anwendung. Seit mehr als 60 Jahren sind β -Lactam-Antibiotika mittlerweile im Einsatz und zählen zu den am meisten verwendeten Antibiotika weltweit (ELANDER 2003). Alle β -Lactam-Antibiotika haben einen 2-azetidinone Ring, der auch als β -Lactam-Ring bezeichnet wird und für die Wirksamkeit des Antibiotikums verantwortlich ist. Die Food and Drug Administration (FDA) hat 32 β -Lactam-Antibiotika für die Behandlung am Menschen freigegeben. Aus diesen 32 in der Klinik eingesetzten Antibiotika werden jedoch nur zwei als natürlich angesehen. Penicillin G und Penicillin V werden komplett biotechnologisch durch eine Fermentation von *Penicillium chrysogenum* hergestellt und gelten damit als natürlich (WEGMAN et al. 2001). Die anderen Antibiotika werden entweder chemisch oder chemo-enzymatisch aus Vorläuferstufen produziert. Eine davon ist 6-Aminopenicillansäure (6-APA). 6-APA wurde in den späten 1950er Jahren entdeckt und in den 1970er Jahren von DSM großtechnisch hergestellt. Die chemische Hydrolyse zur Produktion von 6-APA stellte sich jedoch als ineffektiver Prozess heraus, da der Prozess teuer und umweltschädlich war (VANDAMME 1984). Zur Synthese werden Temperaturen von -40°C und gefährliche Chemikalien wie Phosphorpentachlorid und halogenierte Lösungsmittel benötigt (SHELDON 1994; WEISENBURGER & VAN DER HOEVEN 1970). In den 1980er Jahren wurde dann ein neuer Prozess eingeführt, bei dem nur ein Enzym – Penicillin-G-Acylase (PGA) – die Reaktion katalysiert. PGA katalysiert die Hydrolyse von Penicillin G stereoselektiv und stereospezifisch unter milden Bedingungen bei pH 5,8–8,5 und 28–40 °C. Der biotechnologische Prozess ist damit sehr umweltfreundlich und kostengünstig. Mit 8800 Tonnen jährlicher Produktion ist die β -Lactam-Vorstufe 6-APA die meistverkaufte von allen (FLICKINGER et al. 2009; WEGMAN et al. 2001).

1.3 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen zellfreie enzymatische Reaktionskaskaden entwickelt und analysiert werden, um aus nachwachsenden Rohstoffen für die chemische Industrie nützliche Produkte zu gewinnen. Dabei sollen sowohl neue Kaskadenreaktionen als auch bereits etablierte Systeme Anwendung finden. Ziel ist es, stabile und effiziente Systeme zu entwickeln, die es ermöglichen, die gewünschten Produkte effizient aus nachwachsenden Rohstoffen herzustellen.

Durch den Einsatz von neuen oder bereits verwendeten Enzymen und Enzymkaskaden sollen Substrate erschlossen werden, die bisher noch keine Anwendung gefunden haben, da sie durch konventionelle Methoden nicht zugänglich waren. Dabei liegt ein besonderes Interesse auf

Substratströmen, die bereits existieren, da dies die Substratverfügbarkeit für die neu entwickelten biotechnologischen Prozesse garantiert.

In jedem entwickelten System sollen alle beteiligten Enzyme untersucht und die bestmöglichen Reaktionsbedingungen ermittelt werden, gefolgt von der Optimierung der gesamten Enzymkaskade. Dabei soll besonderes auf den Stoffstrom durch die Kaskade geachtet werden und es gilt, mögliche Flaschenhälse zu identifizieren. Um dies effizient zu realisieren, müssen – soweit möglich – analytische Messmethoden für jedes Intermediat entwickelt und validiert werden.

So soll die bereits am Lehrstuhl entwickelte Reaktionskaskade zur Produktion von Ethanol bzw. Isobutanol aus Glukose im Detail analysiert und optimiert werden. Dabei sollen verbesserte Enzyme sowie Enzymproduktionsverfahren eingesetzt werden, um die Reaktionsraten und Ausbeuten zu erhöhen. Des Weiteren soll untersucht werden, ob es möglich ist, alle zu einem bestimmten Zeitpunkt gebildeten Intermediate zu detektieren und daraus eine Gesamtbilanz zu bilden. Dies soll dabei helfen, festzustellen, welches Enzym einen möglichen Rückstau in der Kaskade verursacht. Sollte sich herausstellen, dass die bisherigen Methoden zur Optimierung nicht ausreichen, ist eine Alternative zur bisherigen Kaskade zu entwickeln. Hinzu kommen mögliche Erweiterungen der Kaskade auf Substrat- und Produktseite. Hier sollen mögliche Substrate identifiziert und die nötigen Reaktionen mit den dazugehörigen Enzymen untersucht werden.

Als potenzielles neues Produkt käme 2,3-Butandiol in Frage. Dafür sollen 2,3-Butandioldehydrogenasen untersucht und auf ihre Anwendbarkeit in einer Enzymkaskade geprüft werden. Da 2,3-Butandiol ein chirales Produkt darstellt, soll ebenso untersucht werden, welche Dehydrogenase welches chirale Produkt bildet. Dies soll unter anderem durch eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden, für die potenzielle Enzyme kristallisiert werden müssen.

Außerdem sollen neue, noch nicht verwendete Substrate auf ihr Potenzial für enzymatische Synthesen untersucht werden. Es soll konkret ein System entwickelt werden, das die Möglichkeit schafft, das Lactat aus Silagepresssaft nutzbar zu machen und gleichzeitig das Anwendungsspektrum des Presssaftes durch eine Neutralisierung zu erweitern.

2. Materialien

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden im höchstmöglichen Qualitätsstandart von folgenden Herstellern erworben:

AppliChem GmbH	Darmstadt
Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Biozym Scientific GmbH	Hess. Oldendorf
Bode Chemie GmbH	Hamburg
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg
Life Technologies GmbH	Darmstadt
Merck KGaA D	Darmstadt
Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Sigma Aldrich	Deisenhofen
VWR International GmbH	Darmstadt

2.2 Enzyme

β -Galaktosidasen aus *Aspergillus oryzae* (G5160) und aus *E. coli* (G3153), Alkohol-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (A7011), Laktatoxidase aus *Aerococcus viridans* (L9795), Catalase aus Rinderleber (C40), Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* und Carboanhydrase aus Rindererythrozyten wurden bei Sigma Aldrich, Deisenhofen, erworben.

L-Lactate Dehydrogenase (LDH) aus Kaninchenmuskel wurde bei Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, erworben.

Restriktionsenzyme, Phusion[®] high-fidelity DNA Polymerase und T4 Ligase wurden von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) erworben und TAQ Polymerase bei Rapidozym (Berlin, Deutschland).

2.3 Kits

GeneJET [™] Plasmid-Miniprep-Kit	Thermo Fischer Scientific, Fermentas, St. Leon-Rot
NucleoSpinR Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Duren
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fischer Scientific, Fermentas, St. Leon-Rot
RotiR-Nanoquant Kit	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
JCSG-plus [™]	Molecular Dimensions; Suffolk; UK
PEGRx, PEG/Ion und PEG/Ion 400	Hampton Research; Aliso Viejo, CA, USA

2.4 Geräte

In alphabetischer Reihenfolge:

Autoklav: Varioklav 135S	Thermo Fischer Scientific
Flüssigchromatographie	
AKTA™ purifier ausgestattet mit Pumpe P-900	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Probenpumpe UP-960	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Kontrolleinheit UPC-900	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Säulen:	
HisTrap FastFlow 5 mL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
HiTrap Desalting HiPrep 26/10 Desalting	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
UltiMate 3000 RS LC System ausgestattet mit	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein
Degasser SRD 3400	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein
Pumpenmodul 3400RS	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein
Auto sampler WPS 3000TRS	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein
Column compartment TCC3000RS	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein
Diode array detector 3000RS	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein
Brechungsindexdetektor RI 101	Shodex, Tokyo, Japan
PDA-Detektor 210/278 nm	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein
Säulen:	
Metrosep A Supp 10-250/4.0	
250 mm, particle size 4,6 µm	Deutsche Metrohm GmbH, Filderstadt
Rezex-ROA-H+-Säule	Phenomenex®, Torrance, CA, USA,
Gaschromatographie:	
Trace GC Ultra mit FID und Autosampler	Thermo Fischer Scientific
Säule	
StabilWax, 30 m, 0,25 mm interner	Restek, Bellefonte, USA
Durchmesser, 0,25 mm Filmdicke	
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr-Hausgerate, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80 °C	Forma 906 -86°C ULT Thermo Fischer Scientific
Gefriertrockner Alpha 2-4 LD plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
Kristallisationsplatten 24-well	Hampton Research; Aliso Viejo, CA, USA
Mit Vakuumpumpe RC 6 VACUU	BRAND GmbH + Co. KG
Inkubatoren	
Klimakammer KBF 240 E5.1/C	BINDER GmbH, Tuttlingen
Inkubator Function Line B12	Thermo Fischer Scientific, Haeraeus
HAT Minitron	Infors AG, Bottmingen/Basel, Switzerland
MaxQ 2000	Thermo Fischer Scientific
TiMix 5 control	Edmund Buhler GmbH, Hechingen
Magnetrührer:	
MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach

VMS-C7	VWR International GmbH
Variomag Telesystem	Thermo Fischer Scientific
Mosquito® <i>crystal liquid handler</i>	TTP Labtech, UK
PCR Equipment:	
MJ Mini™ Personal Thermo Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH
MyCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH
CFX96 Touch	Bio-Rad Laboratories GmbH
pH Meter und Elektrode:	
FiveGo™	Mettler-Toledo GmbH, Giesen
FiveEasy™	Mettler-Toledo GmbH, Giesen
InLabR Expert Pro pH 0-14 ; 0-100 °C	Mettler-Toledo GmbH, Giesen
InLabR Micro Pro pH 0-14 ; 0-100 °C	Mettler-Toledo GmbH, Giesen
<i>Rock Imager</i> ® 1000	FORMULATRIX, MA, USA
Titrators:	
Titroline 7000	Thermo Fischer Scientific
Titroline 7750	Thermo Fischer Scientific
Ultrapure water system PURELAB Classic	ELGA LabWater, Celle
Ultrasonic Cleaner	VWR International GmbH
Ultrasonic homogeniser UIS250v Hielscher	Ultrasonics GmbH, Teltow
Sonotrode LS24d10	
Sonotrode VialTweeter	
UV-Vis Spektrophotometer:	
Multiskan Spectrum	Thermo Fischer Scientific
Varioskan	Thermo Fischer Scientific
Infinite 200 pro	Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland
Zentrifugen:	
Sorvall RC 6+	Thermo Fischer Scientific
Rotor F10-6x500y	Piramoontechnologies Inc, Santa Clara, USA
Rotor F9-4x1000y	Piramoontechnologies Inc, Santa Clara, USA
Rotor SH-3000	Thermo Fischer Scientific
Rotor SS-34	Thermo Fischer Scientific
Fresco 21 Centrifuge	Thermo Fischer Scientific
Concentrator Savant SpeedVac Plus SC210A	
mit Savant Refrigerated Vapor Trap	Thermo Fischer Scientific
RVT100	

2.5 Kulturmedien und Antibiotika

Hitzestabile Kulturmedien, Puffer und Lösungen wurden 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Hitzestabile Lösungen wurden durch einen sterilen Spritzenfilterhalter (0,2 µm, VWR International GmbH) filtriert. Bei Kulturmedien, die aus verschiedenen Lösungen bestehen, wurden alle Lösungen

zuerst sterilisiert und anschließend gemischt. Feste Medien wurden durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar-Agar vor dem Autoklavieren hergestellt. Alle verwendeten Medien sind in Unterkapitel 2.5.1 aufgeführt. Bei selektiven Medien wurde, nachdem das Medium abgekühlt war, der Lösung Kanamycin hinzugefügt und dabei eine Konzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ eingestellt. Für alle Medien, Puffer und Lösungen wurde gereinigtes Wasser, ddH₂O (PURELAB Classic), verwendet. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

2.5.1 Kulturmedien

LB-Medium (BERTANI 1951)

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,0 % (w/v) NaCl, 1,0 % (w/v) Trypton

Autoinduction medium (STUDIER 2005)

ZY-medium:

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,0 % (w/v) Trypton

50x 5052-Lösung:

25 % (w/v) Glycerin, 2,5 % (w/v) D-Glukose-Monohydrate, 10 % (w/v) Laktose-Monohydrate

20x NPS-Lösung:

6,6 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 13,6 % (w/v) KH_2PO_4 , 14,2 % (w/v) Na_2HPO_4

Alle Lösungen wurden getrennt eingewogen und getrennt autoklaviert. Das Medium setzt sich wie folgt zusammen:

	Volumen [mL]	Endkonzentration
ZY-Medium	928	
1 M MgSO₄	1	11 mM
50x 5052	20	1x
20x NPS	50	1x
Antibiotika 100 mg mL⁻¹	1	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Finales Volumen	1000	

2.6 Bakterienstämme, Plasmide, DNA-Fragmente und Oligonukleotide

2.6.1 Bakterienstämme

Zu Klonierungszwecken wurde *E. coli* XL1-Blue verwendet und zur Proteinexpression kamen *E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* HMS (DE3) zum Einsatz.

Tab. 2.1: Zusammenfassung der verwendeten Klonierungsstämme

Stamm	Genotyp	Anbieter
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene (Waldbronn)

<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3)</i>	Novagen (Merck, Darmstadt)
<i>E. coli</i> HMS (DE3)	<i>F- recA1 hsdR(rK12- mK12+) (DE3) (Rif R)</i>	Novagen (Merck, Darmstadt)

2.6.2 Plasmide

Tab. 2.2 Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	Größe/bp	Beschreibung	Referenz
pET28a	5369	Kan ^R , ColE1 Plac lacZ' lacI, Proteinexpressionsvektor mit T7-Expressionssystem unter der Kontrolle eines lac-Operators zur Proteinexpression	Novagen (Merck, Darmstadt)
pCBR	5310	Kan ^R , pET28a mit veränderter <i>multiple cloning site</i> mit den Restriktionsstellen <i>BfuAI</i> und <i>Bsal</i> zur Klonierung synthetisierter Gensequenzen ohne <i>tag</i>	Guterl
pCBR-SsDHAD	6963	Kan ^R , pCBR mit ssDHAD kloniert über die Schnittstellen <i>Bsal</i> und <i>BfuAI</i>	Carsten
pET28a_NHis_SsGDH	6285	Kan ^R , pET28a mit SsGDH kloniert über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	Guterl
pET28a_NHis_GsADH	6553	Kan ^R , pET28a mit GsADH kloniert über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	Guterl
ALDH			Guterl
pCBR_SaKDGA_CHis	6197	Kan ^R , pCBR mit SaKDGA kloniert über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>Bpu1102I</i>	Guterl
pET28a_NHis_ZmPDC	7084	Kan ^R , pET28a mit ZmPDC kloniert über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	Guterl
pET28a_NHis_BsALS	6825	Kan ^R , pET28a mit BsALS kloniert über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	Guterl
pET28a_NHis_BIALDC	5985	Kan ^R , pET28a mit BIALDC kloniert über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pET28a_NHis_SmBDDH	5895	Kan ^R , pET28a mit SmBDDH kloniert über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pET28a_NHis_BcBDDH	6143	Kan ^R , pET28a mit BcBDDH kloniert über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	diese Arbeit

2.6.3 Oligonukleotide

Tab. 2.3 Liste der verwendeten Oligonukleotide

Name	Länge	Beschreibung	Sequenz
Fw-ALDC-B.lich	42	Forward-Primer	ATATATCATATGAAAAGTGCA AGCAAACAAAAATAATTCAG
Rw-ALDC-B.lich	39	Reverse-Primer	ATATATCTCGAGTTATTCAGGG CTTCCTTCAGTTGTTTC

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Lagerung der *E. coli*-Stämme

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Glycerin (99,5 % p. a.)

Flüssiger Stickstoff

Kulturmedien

Die *E. coli*-Stämme wurden in Schüttelkolben in den jeweiligen Medien (siehe Unterkapitel 2.5.1) kultiviert und das Wachstum der Zellen wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte der Kultur gemessen (siehe Unterkapitel 3.1.2). Einzelkolonien wurden durch das Ausbreiten von Zellsuspensionen auf Agarplatten mit anschließender Inkubation geschaffen. Zur Langzeitlagerung von Zellkulturen wurden diese in Aliquots mit 50 % (v/v) Endkonzentration mit Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Bestimmung der optischen Dichte von Zellkulturen

Die optische Dichte (OD) der *E. coli*-Flüssigkulturen wurde mit 1 mL Probe bei 600 nm in Plastikküvetten (Thermo Fischer Scientific, Multiskan Spectrum) bestimmt. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht ungefähr einer Konzentration von $3,2 \times 10^8$ Zellen mL⁻¹.

3.1.3 Herstellung von *E. coli*-Zellen für chemische Transformation

Folgende Lösungen wurden verwendet:

50 mM CaCl₂ (steril)

85 % (v/v) CaCl₂ (50 mM) mit 15 % (v/v) Glycerin (steril)

Ausgehend von einer Einzelkolonie wurde eine Vorkultur angelegt und mit 2 mL eine 100 mL-Hauptkultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler (250 rpm) inkubiert, bis eine OD von 0,5–0,6 erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen geerntet (Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor, 3500g, 15 min, 4 °C) und vorsichtig mit 10 mL eiskalter CaCl₂-Lösung gewaschen. Das Volumen wurde dann auf 50 mL erhöht und die Zellen wurden für 1 h auf Eis inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellen in 85 % (v/v) CaCl₂-Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert, um eine OD von 50 zu erreichen. Aliquots von 100 µL wurden schockgefroren in 1,5 mL Reaktionsgefäßen und bei -80 °C gelagert.

3.1.4 Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen

Chemisch-kompetente Zellen wurden für ca. 10 min auf Eis aufgetaut. 1–10 µL (10–100 ng) Plasmid-DNA wurde hinzugefügt und die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 60 s wurden die Zellen erneut für 5 min auf Eis gekühlt und anschließend in 900 µL in

vorgewärmtem LB-Medium resuspendiert. Nach einer Regenerationsphase von 1 h bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler (250 rpm) wurden 100 µL der verdünnten Zellsuspension sowie 100 µL des resuspendierten Zellpellets auf Agarplatten ausgebreitet und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.1.5 Rekombinante Genexpression in *E. Coli*

E. coli BL21 (DE3) oder *E. coli* HMS (DE3) wurden mit den in Unterkapitel 2.6.2 aufgeführten Plasmiden transformiert.

Genexpression für analytische Zwecke

Für die Analyse der Genexpression in lösliche Proteine wurden Expressionsversuche im kleinen Maßstab in einem Volumen von 20 mL aus verschiedenen Selektivmedien (siehe Unterkapitel 2.5) in 100 mL Schüttelkolben durchgeführt. Aus einer einzelnen Kolonie wurde eine Vorkultur (5 mL) hergestellt, die zur Inokulation der Hauptkulturen verwendet wurde. Nach 3 h bei 37 °C und 150 rpm wurden die Kulturen gegebenenfalls mit 1 mM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und entweder bei 16 °C oder 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (2–4 mL), in 1 mL Puffer resuspendiert und durch Beschallung (Sonotrode VialTweeter, 100 Amplitude, 0,6 ms, 3x 45 sec Puls/45 sec Kühlung auf Eis) aufgeschlossen. Die lösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation (14.000 g, 30 min, 4 °C) gewonnen und sowohl die lösliche als auch die unlösliche Fraktion wurden mit SDS-PAGE (3.3.2) analysiert.

Genexpression für preparative Zwecke

Für die Herstellung rekombinanter Proteine wurden die entsprechenden Gene in einem Volumen von 200–1000 mL Selektivmedium (2.6) in einem 1000–5000 mL Schüttelkolben exprimiert. Die Wahl des Mediums hing dabei vom Ergebnis der Genexpressionstests ab (siehe oben). Aus einer einzelnen Kolonie wurde eine Vorkultur (50 mL) hergestellt, die zur Inokulation der Hauptkulturen verwendet wurde, um eine OD von 0,1 zu erreichen. Die Zellen wurden 3 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert, bis eine OD von 0,5–0,6 erreicht wurde. Anschließend wurden die Kulturen ggf. mit 1 mM IPTG induziert und je nach Bedarf über Nacht bei 16 °C oder 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Sorvall, RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor, 4.000 g, 15 min, 20 °C) geerntet und entweder direkt zur Proteinreinigung eingesetzt (3.3.3) oder bei -20 °C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei 260 nm gemessen (Thermo Fischer Scientific, Multiskan oder Implen, Nanophotometer P-Klasse). Nach dem Gesetz von Lambert-Beer entspricht bei 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm eine Extinktion von 1,0 50 µg/mL doppelsträngiger DNA oder 33 µg/mL einzelsträngiger DNA. Reine DNA-Lösungen zeigen keine Extinktion über 300 nm und das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm über 280 nm (45/46) beträgt mindestens 1,8 (ZÜNDORF 2009)

3.2.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die enzymatische Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* (MULLIS & FALOONA 1987; SAIKI et al. 1988). Die Annealing-Temperatur (T_A) entsprach der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Primer minus 3 °C, während die Schmelztemperaturen der Primer vom Hersteller angegeben wurden.

Für die Amplifikation von Genen zur Klonierung wurde die *PhusionTM High Fidelity* DNA-Polymerase (Thermo Fischer Scientific) eingesetzt. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von je 50 µL in einem Thermocycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, MJ MiniTM Personal Thermo Cycler oder MyCyclerTM Thermal Cycler) durchgeführt, wobei 50–100 ng Template-DNA, 0,5 mM von jedem Primer, 0,2 mM von jedem dNTP, 1 Einheit (U) DNA-Polymerase und 1x *PhusionTM HF*-Puffer (mit 1,5 mM MgCl₂) verwendet wurden. Die Reaktionsbedingungen sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Tab. 3.1: Standard PCR-Protokoll

Stufe	Temperatur/°C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30 s	1x
Denaturierung	98	10 s	25–30x
Annealing	T_A	30 s	
Verlängerung	72	30 s/kB	
Finale Verlängerung	72	10 min	1x
Lagerung	16	∞	

Dieses Verfahren wurde auch für die Amplifikation von Genen aus genomischer DNA angewandt. Hier wurden anstelle von Templates DNA-Zellen des interessierenden Organismus von einer Agarplatte hinzugefügt oder die Zellen in 100 µL ddH₂O resuspendiert, wobei 1 µL der Suspension als Template verwendet wurde. Der anfängliche Denaturierungsschritt wurde auf 5 min verlängert, um die Zellen aufzubrechen.

3.2.3 Isolation und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mit *E. coli* XL1-bue hergestellt. Die Isolierung und Reinigung wurden mit dem *GeneJETTM Plasmid-Miniprep-Kit* (Thermo Fischer Scientific, Fermentas) durchgeführt. Die Anweisungen des Herstellers wurden befolgt, wobei 4 mL Zellkultur verwendet wurden und die Plasmid-DNA mit 30–50 µL ddH₂O von der Säule eluiert wurde. Die Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

3.3 Proteinanalytik

3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie

Die Konzentration der gereinigten Proteine wurde durch UV-Spektroskopie mit einem Multiskan (Thermo Fisher Scientific) oder Nanophotometer (Implen) bestimmt. Sowohl das Molekulargewicht als auch der Extinktionskoeffizient aller Proteine wurden mit dem ProtParam-Tool (ExPASy) berechnet. Für letzteres wurde die Absorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sowie der Cystine (Disulfidbrücken) zwischen 250 und 300 nm berücksichtigt. Der Extinktionskoeffizient wurde dann durch die Formel 3.1 (Pace et al., 1995) berechnet. Dieser wurde verwendet, um mittels des Gesetzes von Lambert-Beer

$$\epsilon_{280} = \sum Trp5500 + \sum Tyr1490 + \sum Cystine125$$

Formel 3.1 Berechnung des Extinktionskoeffizienten für Proteine

Tab. 3.2: Liste aller in dieser Arbeit hergestellten Proteine, inklusive Molekulargewicht; Extinktionskoeffizient und GenBank-ID-Nummer

Protein	MW/g mol ⁻¹	$\epsilon_{280}/M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	GenBank ID
gaADH	35950	33390	KZE97934.1
blALDC	28863	20400	AJF45953.1
taALDH (wild type)	54782	82280	CAC11938.1
bcALS	61989	46870	KOS73351.1
bcBDDH	42732	50880	ETT73372.1
smBDDH	38222	40450	AFH00999.1
ssDHAD	59421	37820	WP009990927.1
ssGDH	40891	49390	CAA09918.1
saKDGA	32515	25330	WP011277145.1
zmPDC	60925	71280	WP011241152.1

3.3.2 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach dem Protokoll von Laemmli (1970) durchgeführt. Die folgenden Lösungen wurden hierzu verwendet:

Ammoniumpersulfat(APS)-Stammlösung, 10 %

10 % (w/v) APS wurden in ddH₂O gelöst und bei 4 °C gelagert.

Coomassie-Färbelösung

0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 und R250, 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) reine Essigsäure. Die Lösung wurde vor der Filtration 3 h lang gerührt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

4x SDS-PAGE Trenngel-Puffer

0,8 % (w/v) SDS, 1,5 M TRIS/HCl pH 8,8. Der pH-Wert wurde mit 37 % (v/v) HCl eingestellt.

4x SDS-PAGE Stapelgel-Puffer

0,8 % (w/v) SDS, 0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8. Der pH-Wert wurde mit 37 % (v/v) HCl eingestellt.

10x SDS-PAGE-Puffer

1 % (w/v) SDS, 0,25 M TRIS, 1,92 M Glycin. Der resultierende pH-Wert von 8,5 darf nicht verändert werden.

5x SDS-Beladungsfarbstoff

50 % (v/v) Glycerin; 12,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 7,5 % (w/v) SDS; 0,25 M TRIS, 0,25 g/L Bromphenolblau, pH 6,8. Der pH-Wert wurde mit 37 % (v/v) HCl eingestellt.

Die Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 3.3 zusammengefasst. Sie wurden mit der Mini-Protean[®] 3-*Multi-Casting Chamber* (Bio-Rad Laboratories GmbH) hergestellt.

Tab. 3.3: Anleitung zur Herstellung der Gele für SDS-Page (Menge für 14 einzelne Gele angegeben)

	Trenngel (80 mL) (12 %)	Stapelgel (40 mL) (5 %)
Acrylamide/Bisacrylamide-Lösung (40 % (w/v); 37.5:1)	24 mL	5,2 mL
Trenngel/Stapelgel-Puffer (4x)	20 mL	10 mL
ddH₂O	34,32 mL	23,96 mL
SDS (10 % (w/v))	800 μ L	400 μ L
Die Polymerisation wurde mit folgendem initiiert		
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	80 μ L	40 μ L
APS (10 % (w/v))	800 μ L	400 μ L

Die Proben wurden zunächst, falls erforderlich, mit Wasser verdünnt und mit 5x Beladungsfarbstoff gemischt, um eine Endkonzentration von 1x zu erhalten. Nach einer fünfminütigen Erhitzung bei 95 °C wurden sie zentrifugiert (Thermo Fischer Scientific Heraeus, Fresco 21 Zentrifuge, 21.000 g, 10 s) und konnten dann mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden. In letzterem Fall wurden die Proben erneut erhitzt und zentrifugiert, bevor 5–15 μ L mit einer Mikroliter-Spritze auf das Gel aufgetragen wurden und die Elektrophorese bei einem konstanten Strom von 30 mA pro Gel für etwa 50 min durchgeführt wurde (Bio-Rad Laboratories GmbH, Mini-PROTEAN Tetra Cell). Zum Nachweis von Proteinen wurden die Gele zunächst 15 min mit Coomassie Brillant Blau gefärbt, wobei die Nachweisgrenze bei 0,2–0,5 μ g/mm² liegt. Für eine erste Analyse wurden die gefärbten Gele in kochendem Wasser (Mikrowelle, dreimal) und danach in Wasser bei Raumtemperatur weiter über Nacht entfärbt. Hier wurde ein Papierhandtuch hinzugefügt, um die Farbe zu binden.

3.3.3 Proteinreinigung

Ultraschallzellaufschluss

Zellen der Expressionskulturen wurden in Bindungspuffer (100 mM HEPES (pH 7) mit 20 mM Imidazol und 500 mM NaCl) resuspendiert (10–20 % (w/v)) und auf Eis durch Beschallung aufgeschlossen: 80 % Amplitude, 0,6 ms Puls, 3x 5 min (UIS250v mit Sonotrode LS24d10, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow). Die lösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation (Sorvall RC 6+

Zentrifuge, SS34 Rotor, 14.000 g, 45 min, 4 °C) gewonnen, aus der die His-markierten Proteine durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie gereinigt wurden.

Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

Die immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) wurde mit HisTrap™ FF-Säulen (GE Healthcare, Säulenvolumen (SV): 5 mL) durchgeführt. Dabei binden die His-getaggten Proteine an die Säule und können mit Imidazol eluiert werden. Es wurde das Aufreinigungssystem ÄKTA™ (GE Healthcare) verwendet, wobei das folgende Verfahren Anwendung fand und die folgenden Puffer eingesetzt wurden:

Flussrate:	5 mL/min
Äquilibrierung:	2 SV Bindepuffer
Beladung:	5 mL/min lösliche Fraktion des Zelllysates
Waschen:	3 SV Bindepuffer
Elution:	10 SV mit einem Gradienten von 0–100 % Elutionspuffer 2 mL Fraktionen wurden gesammelt

Bindepuffer: 100 mM HEPES (pH 7) mit 20 mM Imidazol und 500 mM NaCl

Elutionspuffer: 100 mM HEPES (pH 7) mit 500 mM Imidazol und 500 mM NaCl

Das gesamte Verfahren wurde online durch UV-Messung bei 280 nm überwacht. Die gesammelten Fraktionen sowie das Lysat und der Durchfluss des Waschschrittes wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die das Zielprotein in ausreichender Reinheit enthielten, wurden gesammelt und mit der Entsalzungssäule *HiPrep 26/10* entsalzt.

Größenausschluss-Chromatographie zur Entsalzung von Proteinpräparaten

Um die Puffer zu wechseln und Salze zu entfernen, wurde eine Größenausschlusschromatographie der Proteinpräparate durchgeführt. Hierzu wurde das ÄKTA™ Purifier-System (GE Healthcare) mit der Säule *HiPrep 26/10 Desalting* (GE Healthcare) eingesetzt. Das folgende Verfahren wurde angewendet und die folgenden Puffer wurden eingesetzt:

Flussrate:	5–10 mL/min
Äquilibrierung:	2 SV Austauschpuffer
Beladung:	15 mL Proteinpreparation
Elution:	2 SV Austauschpuffer, die Fraktion mit Protein wurde UV-gestützt manuell gesammelt

Austauschpuffer: 100 mM HEPES (pH 7)

3.3.4 Enzymaktivität

Alle spektrophotometrischen Messungen wurden mittels eines Multiscan- oder Varioscan-Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. Die verwendeten Puffer wurden auf Basis von Stoll, V. S., Blanchard, J. S., 2009 (STOLL & BLANCHARD 2009) hergestellt. NADH-Konzentrationen wurden mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von

6,22 L mMol⁻¹ cm⁻¹ bei einer Wellenlänge von 340 nm berechnet. Eine Unit ist dabei definiert als die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 μmol Substrat pro Minute umzusetzen.

Die Aktivität von GDH wurde bei 50 °C in 50 mM HEPES mit pH 7 bestimmt. Die Oxidation von 50 mM Glukose zu Glukonat und 2 mM NAD⁺ zu NADH wurde bei 340 nm untersucht, die Aktivität von DHAD wurde mittels HPLC bestimmt. 0,1–0,2 mg mL⁻¹ DHAD wurden mit 20 mM Substrat, entweder Glukonat oder Glycerat, für 20–60 min bei 50 °C, 100 mM HEPES (pH 7) und 2,5 mM MgCl₂ inkubiert. Die entstandenen Produkte wurden nach der unten beschriebenen Methode quantifiziert, worüber auch die Aktivität berechnet wurde.

Die Aktivität von KDGA wurde in Richtung der Carbo-Ligation bestimmt, was mit einem gekoppelten Assay auf Basis von (WOLTERINK-VAN LOO et al. 2007) erfolgt ist. Glycerinaldehyd und Pyruvat wurde mit KDGA inkubiert, um KDG zu produzieren. Zu definierten Zeitpunkten wurde die Konzentration von Pyruvat mittels Lactatdehydrogenase bestimmt (Rabbit Muscle LDH, Serva), die NADH benötigt, um Pyruvat in Lactat umzuwandeln. Durch die Bestimmung der Abnahme an NADH bei 340 nm konnte dann auf die KDG-Konzentration geschlossen werden. Die Messungen wurden bei 50 °C mit 50 mM HEPES (pH7), 10 mM Pyruvat und 20 mM Glycerinaldehyd durchgeführt. Die LDH-Reaktion wurde bei Raumtemperatur und mit 50 mM HEPES (pH7), 0,25 mM NADH und 50 U LDH durchgeführt.

Die Aktivität von ALDH wurde bei 50 °C gemessen. Glycerinaldehyd wurde zu Glycerat oxidiert, parallel wurde NAD⁺ zu NADH reduziert. Diese Parallelreaktion wurde bei 340 nm photometrisch bestimmt und auf die Aktivität von ALDH rückgeschlossen. Der Assay wurde mit 50 mM HEPES (pH7), 2,5 mM MgCl₂, 4 mM NAD⁺ und 5 mM D,L-Glyceraldehyd durchgeführt.

Die Aktivität von PDC wurde mittels einer gekoppelten Enzymreaktion bestimmt. Pyruvat wurde von PDC zu Acetaldehyd decarboxyliert, das dann durch ADH zu Ethanol unter NADH-Verbrauch reduziert wurde. Diese Abnahme wurde gemessen und genutzt, um auf die PDC-Aktivität rückzuschließen. Die Reaktion wurde bei 50 °C mit 50 mM HEPES (pH7), 0,1 mM TDP, 2,5 mM MgCl₂, 35 mM Pyruvat, 2,5 mM NADH und 3 U ADH (*S. cerevisiae*, Sigma Aldrich) betrieben.

Die Aktivität von ADH wurde durch das Messen der Abnahme von NADH bei 340 nm bestimmt. ADH katalysiert die Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol bei gleichzeitiger Oxidation von NADH zu NAD⁺. Die Reaktion wurde bei 50 °C mit 100 mM HEPES (pH7), 10 mM Acetaldehyd und 0,6 mM NADH durchgeführt.

Der Glukose-Assay wurde nach Gallati (1979) durchgeführt (GALLATI 1979). Das Reaktionsgemisch enthielt 20 mM Kaliumphosphat (pH6), 0,75 mM 2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline)-6-Sulfonsäure (ABTS), 2 U Glukose Oxidase und 0,1 U Peroxidase (alle Sigma Aldrich). Nach Zugabe der Proben wurde alles für 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 418 nm und 480 nm gemessen. Die Kalibrierung des Assays wurde mittels externen Glukose-Standards durchgeführt.

Die ALS-Aktivität wurde bestimmt, indem die Abnahme der Absorbanz von Pyruvat bei 320 nm gemessen wurde. Die Kalibrierung wurde mit Hilfe eines externen Standards durchgeführt. Die BDDH-Aktivität wurde anhand der Abnahme der NADH-Konzentration bei 340 nm gemessen. Als Substratkonzentration wurden 50 mM Acetoin und 0,25 mM NADH gewählt.

Um die ALDC-Aktivität zu bestimmen, musste das Substrat 2-Acetolactat hergestellt werden, das durch Inkubation von 200 mM Pyruvat und 10 U ALS bei pH 6,5 und 40 °C produziert wurde. Anschließend wurde die ALS mittels Filtration (10 kDa MWCO, *modified* PES; VWR, Darmstadt,

Germany) entfernt. Die 2-Acetylactat-Lösung wurde immer frisch hergestellt und nicht länger als 1 h aufbewahrt. Die ALDC-Aktivität wurde dann bestimmt, indem die Menge an Acetoin ermittelt wurde, die nach 2 min entstand. Die Acetoinkonzentration wurde mittels GC-FID festgelegt.

Um die optimalen Reaktionsbedingungen und das Verhältnis zwischen allen relevanten Enzymen zu ermitteln, wurde das System um BDDH erweitert und die Abnahme von NADH bei 340 nm überwacht. Diese Experimente wurden in 96-Well-Platten mit einem totalen Volumen von 200 μL durchgeführt. Die Enzymkonzentrationen von LOX, ALS und ALDC wurden variiert, während die von CAT und BDDH konstant bei 50 bzw. 5,9 U mL^{-1} gehalten wurden. Die Reaktionen wurden bei 40 °C mit 50 mM Milchsäure und 1 mM NADH in 100 mM MOPS (pH 6,5) durchgeführt.

Um die FDH-Aktivität festzustellen, wurde FDH mit einer Konzentration von 0,3 U eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen waren 5 mM NAD, 100 mM Formiat und 100 mM HEPES pH 7 bei 25 °C. Alle Komponenten wurden gemischt, woraufhin die Bildung von NADH photometrisch verfolgt wurde. Für die Bestimmung des CO_2 -Einflusses wurde das Reaktionsgemisch ohne Enzym mit CO_2 für 5 min begast. Es wurde jeweils der identische Versuchsansatz mit und ohne Carboanhydrase (245 U) verglichen. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt.

3.3.5 Proteinkristallisation

Die verwendeten Kristallisationsscreenings zur Bestimmung der optimalen Bedingungen waren: JCSG-plus™ (Molecular Dimensions; Suffolk; UK), PEGRx, PEG/Ion und PEG/Ion 400 (Hampton Research; Aliso Viejo, CA, USA). Sie bestehen aus jeweils 96 unterschiedlichen Kristallisationslösungen (Anhang 2-4). Diese wurde nach Anleitung hergestellt, woraufhin jeweils 50 μL der Lösung in die dazugehörige 96-well-Mikrotiterplattenkavität überführt wurden. Anschließend wurden mit Hilfe eines Mosquito® *crystal liquid handler* (TTP Labtech, UK) jeweils 0,5 μL Pufferlösung mit 0,5 μL Proteinlösung gemischt und auf eine Folie aufgebracht. Diese wurde dann gedreht und als Verschluss der Mikrotiterplatte verwendet, sodass eine *Hanging-Drop*-Kristallisation ermöglicht wurde. Damit befand sich in der jeweiligen Kavität dieselbe Pufferlösung wie in dem Tropfen auf der Folie. Die verschlossene Mikrotiterplatte wurde in einen *Rock Imager*® 1000 (FORMULATRIX, MA, USA) gegeben und inkubiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Aufnahmen von jeder Kavität gemacht und analysiert. Bei einer einsetzenden Kristallisation wurden die Bedingungen wiederholt und verfeinert, um möglichst große Proteinkristalle zu erhalten.

Für größere Ansätze wurden 24-well-Kristallisationsplatten (Hampton Research; Aliso Viejo, CA, USA) verwendet. Diese wurden mit Objektträgern verschlossen, auf denen die Proteintropfen vorher aufgebracht wurden. Es wurden auf jedem Objektträger bis zu drei Tropfen bestehend aus 1 μL Protein und 1 μL Lösung aufgebracht und das Reservoir wurde mit 1 mL Kristallisationslösung befüllt. Handelsübliche Vaseline wurde verwendet, um die Kristallisationsplatte luftdicht mit dem Objektträger zu verschließen. Die Platten wurden bei 25 °C gelagert und die Kristallbildung wurde unter einem Stereomikroskop beobachtet.

3.3.6 Test der Bindungsaffinität von Aldehyden an Proteinen

Für diese Experimente wurden Reaktionsansätze mit den obigen Enzymkonzentrationen sowie 2, 5, 10 und 50 mM Glycerinaldehyd hergestellt. Außerdem wurden 100 mM HEPES (pH7), 0,1 mM TDP und 2,5 mM MgCl₂ hinzugefügt. Die Gemische wurden für 240 min bei 50 °C inkubiert, wobei zu definierten Zeitpunkten Proben genommen wurden und die Aldehydkonzentration bestimmt wurde. Kontrollen wurden ohne Zugabe von Enzym durchgeführt.

3.4 Enzymreaktionen

3.4.1 Ethanol-Synthese

Alle Reaktionen wurden in 20 mL GC-Gefäßen mit 100 mM HEPES (pH 7), 0,1 mM TDP und 2,5 mM MgCl₂ bei 50 °C durchgeführt. Die Gefäße wurden in einem Wasserbad beheizt und die Reaktionslösung wurde mit 100 rpm durchmischt. Für die Reaktionen mit Glukose wurden Enzymkonzentrationen von GDH 12 U; DHAD 40 U; KDGA, ALDH, PDC und ADH je 20 U verwendet. Gestartet wurde das Experiment mit der Zugabe von 22,7 mM D-Glukose und 5 mM NAD⁺.

Für Reaktionen mit Laktose als Substrat wurden die identischen Enzymkonzentrationen der Arbeiten von Guterl et al. (2012) verwendet, demnach 6 U GDH, 20 U DHAD und 10 U KDGA, ALDH, PDC und ADH. β -Galaktosidase wurde mit entweder 6 U, 10 U oder 20 U hinzugegeben. Laktose und NAD⁺ wurden mit einer Konzentration von 25 mM und 5 mM zugegeben, um die Reaktion zu starten. Die Kontrollreaktionen wurden ohne Substrat durchgeführt.

Proben wurden in definierten Abständen genommen und für die jeweilige Analyse vorbereitet.

3.4.1 Acetoinsynthese

Für die Acetoinsynthese wurde eine 30 mL Reaktionslösung bestehend aus 50 mM Milchsäure hergestellt. Sobald SPJ verwendet wurde, wurde dieser auf die entsprechende Milchsäurekonzentration verdünnt. Alle Reaktionen beinhalteten 0,1 mM TDP und 2,5 mM MgCl₂ und wurden mit 100 % Sauerstoff belüftet (Flussrate 10 mL min⁻¹). Die Reaktionsbedingungen waren 50 mM MOPS (pH 6,5) bei 40 °C. Die Titrations wurden entweder mit 100 mM HCL, 500 mM Milchsäure oder unverdünntem SPJ durchgeführt, da durch den Verbrauch von Milchsäure während des Versuchs eine Erhöhung des pH-Wertes stattfindet. Ein automatischer Titrator (TitroLine 7000, SI Analytics, Weilheim, Deutschland) kam dabei zum Einsatz. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym entweder gelöst oder immobilisiert gestartet. Reaktionen mit gelöstem Enzym wurden mit Enzymkonzentrationen von LOX 50 μ g mL⁻¹, ALS 94,5 μ g mL⁻¹, ALDC 7,3 μ g mL⁻¹ und CAT 166,7 μ g mL⁻¹ durchgeführt. Dies entspricht 30, 18, 55 und 10000 U. Diese Konzentration stellt das experimentell ermittelte Optimum dar. Reaktionen mit immobilisierten Enzymen enthielten immer die Menge aus einer Enzymimmobilisierungspräparation. Die Proben wurden nach definierten Zeitpunkten entnommen und für die HPLC-Analyse filtriert.

3.5 Instrumentelle Analytik

3.5.1 Gaschromatographie

Acetaldehyd und Ethanol wurden mittels GC-FID unter Verwendung des Thermo Scientific Trace GC Ultra, ausgestattet mit einem *Flame Ionization Detector* (FID) und einem *Headspace Tri Plus* Autosampler, verwendet. Die Trennung wurde durch eine StabilWax-Säule (30 m Länge, 0,25 mm interner Durchmesser und 0,25 mm Schichtdicke; Restek, Bellefonte, USA) erreicht. Als Trägergas wurde Helium (0,8 oder 1,2 mL min⁻¹) verwendet. Die Ofentemperatur wurde darauf programmiert, dass 50 °C für 2 min gehalten wurden und anschließend wurde ein Gradient von 10 °C min⁻¹–150 °C eingestellt. 150 °C wurden abschließend für 1 min gehalten. Injektor und Detektor wurden bei 200 °C betrieben. Die Proben wurden vor der Injektion bei 40 °C für 15 min inkubiert. Die Injektion erfolgte in einem Split-Modus mit einem Fluss von 10 mL min⁻¹ und einem Volumen von 700 µL.

3.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Metrosep

Glukonat, 2-Keto-3-Deoxy-Glukonat, Pyruvat und Glycerat wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, HPLC (Ultimate-3000 HPLC System; Thermo Scientific), quantifiziert. Das System ist mit einem Autosampler und einem Diodenarraydetektor ausgestattet. Für die Trennung wurde eine Metrosep-A-Supp10–250/40-Säule (250 mm, Partikelgröße 4,6 mm; Metrohm, Filderstadt, Deutschland) verwendet. Die isokratische Elution wurde bei 65 °C und mit 12 mM Ammoniumbicarbonat (pH 10) durchgeführt. Anschließend wurde die Säule mit 30 mM Natriumcarbonat (pH 10,4) gewaschen, wobei ein Fluss von 0,2 mL min⁻¹ eingestellt wurde. Das Probenvolumen betrug 10 µL. Zur Kalibrierung wurden externe Standards der zu untersuchenden Substanzen verwendet. Vor den Messungen wurden alle Proben mittels eines 0,2 µm PVDF-Filters filtriert (Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland).

Rezex

Mittels eines HPLC-Systems (Dionex[®], Sunnyvale, CA, USA) wurden die Konzentrationen der organischen Säuren, Zwischen- und Endprodukte in wässriger Lösung bestimmt. Das System war mit einer Rezex-ROA-H⁺-Säule (Phenomenex[®], Torrance, CA, USA), einem Brechungsindexdetektor (RI 101, Shodex, Tokyo, Japan) und einem PDA-Detektor (210/278 nm, Dionex[®], Sunnyvale, CA, USA) ausgestattet. Die mobile Phase (2,5 mM Schwefelsäure) wurde auf eine Flussrate von 0,5 mL min⁻¹ bei einer Ofentemperatur von 70 °C eingestellt. Vor den Messungen wurden alle Proben mittels eines 0,2 µm PVDF-Filters filtriert (Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Die Detektionslimits wurden für Milch- und Essigsäure auf 0,3 mM und für Pyruvat auf 43 µM festgelegt.

PMP-Methode

Reduzierbare Zucker und Zuckerderivate können durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), gekoppelt mit Massenspektrometrie (MS), als 1-Phenyl-3-Methyl-5-Pyrazolon(PMP)-Derivate nach der Methode von Rühmann et al. (2014) analysiert werden. Die Proben wurden in

Wasser verdünnt und mit 0,1 M PMP und 0,4 % Ammoniumhydroxid in Methanol derivatisiert. Nach 100 min bei 70 °C wurde die Reaktion mit 16,7 mM Essigsäure abgebrochen und filtriert (Restek, 0,22 µm, PVDF). Wurde eine Elution der Probe vor 3 min erwartet, wurde die Probe mit Chloroform (dreimal) extrahiert, um überschüssiges PMP zu reduzieren, und dann filtriert. Das HPLC-System (UltiMate 3000RS, Dionex) bestand aus einem Entgaser (SRD 3400), einem Pumpmodul (HPG 3400RS), einem automatischen Probengeber (WPS 3000TRS), einem Säulenabteil (TCC3000RS), einem Diodenarray-Detektor (DAD 3000RS) und einem Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer (ESI) (MS, Bruker). Die Daten wurden mit der Bruker HyStar-Software erfasst und analysiert. Die Säule (Schwerkraft C18, 100 Methoden 45 mm Länge, 2 mm i.d.; 1,8 µm Partikelgröße; Macherey-Nagel) wurde bei 50 °C mit einer mobilen Phase A (5 mM Ammoniumacetat-Puffer, pH 5,6, mit 15 % Acetonitril) und einer chromatographischen Flussrate von 0,6 mL/min betrieben. Der Gradient (mobile Phase B mit reinem Acetonitril) lässt sich wie folgt zusammenfassen: Start der mobilen Phase B bei 1 %, mit einem Anstieg auf 5 % über 5 min, 2 min halten, dann auf 18 % über 1 min erhöhen. Der Gradient wurde weiter auf 40 % über 0,3 min erhöht, für 2 min gehalten und innerhalb von 0,2 min wieder auf die Ausgangsbedingungen für 1,5 min zurückgeführt. Wurden die Proben nicht extrahiert, wurden die ersten 3 min des chromatographischen Flusses durch ein Schaltventil hinter dem UV-Detektor (245 nm) verweigert. Vor dem Eintritt in die ESI-MS wurde der Fluss im Verhältnis 1:20 geteilt (genauer Nachsäulenteiler, Dionex). Die Temperatur des Autosamplers wurde auf 20 °C eingestellt, und es wurde ein Injektionsvolumen von 10 µL verwendet. ESI-Ionenfallen-Parameter: Die Ionenfalle arbeitete im Ultra-Scan-Modus (26.000 m/z/s) von 50–1000 m/z. Das ICC-Target wurde auf 200.000 mit einer maximalen Akkumulationszeit von 50 ms und vier Mittelwerten eingestellt. Die Parameter der Ionenquelle wurden wie folgt eingestellt: Kapillarspannung 4 kV, Trockentemperatur 325 °C, Zerstäubendruck 40 psi und Trockengasfluss 6 L/min. Es wurde der Auto-MS-Modus mit einer intelligenten Zielmasse von 600 m/z und einer MS/MS-Fragmentierungsamplitude von 0,5 V verwendet. Die Analyse wurde mit dem extrahierten Ion durchgeführt. Chromatogramme des den protonierten Molekülen entsprechenden m/z-Wertes.

3.6 Sonstige Methoden

3.6.1 Enzymimmobilisierung

Cross-linked Enzyme Aggregates

Die Enzymaggregate wurden aus gereinigten Enzymen mit den folgenden Konzentrationen hergestellt: LOX 10 mg mL⁻¹, ALS 7,4 mg mL⁻¹, ALDC 2,6 mg mL⁻¹, CAT 10 mg mL⁻¹ und BSA 10 mg mL⁻¹; dies repräsentiert das experimentell festgestellte optimale Verhältnis zwischen den einzelnen Komponenten. Die Proteinlösung wurde durch die Zugabe eines gleichen Teils eiskalter gesättigter Ammoniumsulfatlösung unter konstantem Rühren für 15 min gefällt. Anschließend wurde das Volumen auf 75 mM Glutaraldehyd eingestellt, um die Enzyme quervernetzten. Das Gemisch wurde für 2 h konstant auf Eis gehalten und gerührt. Die Aggregate wurden anschließend mittels Zentrifugation gesammelt und dreifach mit Reaktionspuffer (100 mM MOPS pH 6,5) gereinigt.

Enzymeinschluss

Für den Einschluss der Reaktionskaskade wurde eine fünfprozentige Na-Alginat-Lösung hergestellt. Um das Na-Alginat vollständig zu lösen, wurde es auf 60 °C erhitzt. Luftblasen wurden entfernt, indem die Lösung für mindestens 2 h gerührt wurde. Anschließend wurden 5 mL der fünfprozentigen Na-Alginat-Lösung mit 1,25 mL Enzymlösung, bestehend aus: LOX 0,3 mg mL⁻¹, ALS 0,57 mg mL⁻¹, ALDC 0,044 mg mL⁻¹ and CAT 1 mg mL⁻¹, gemischt und dann in ein 0,2 mM CaCl₂-Bad getropft. Dazu wurde eine Spritze mit einem Innendurchmesser von 0,4 mm verwendet. Die sich dabei formenden Alginatkügelchen wurden für mindestens 1,5 h ausgehärtet und anschließend in Reaktionspuffern gelagert.

3.6.1 Vorbereitung von Silagepresssaft

Der Silagepresssaft (SPJ) für diese Experimente wurde nach Anleitung von Schwarz et al. (2016) bereitgestellt. Nach einer mechanischen Fest/flüssig-Trennung der silierten, feuchten Biomasse wurde der SPJ durch einen 250 µm Filterbeutel (Schwegmann-Filtrations-Technik GmbH, Graftschaf-Gelsdorf, Deutschland) gefiltert, um grobe Partikel zu entfernen. Die dunkelbraune Flüssigkeit wurde bis auf weiteres bei 4 °C gelagert. Vor den Kaskadenreaktionen wurde der SPJ noch weiter geklärt. Auf einen Zentrifugationsschritt (12.000 g für 30 min) folgten eine Filtration (5–8 µm, Type 13A Cellulose; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) und ein weiterer Zentrifugationsschritt (35.000°g für 30°min).

4. Ergebnisse

4.1 In vitro metabolisches Engineering einer minimierten, enzymatischen Reaktionskaskade zur Alkoholproduktion

4.1.1 Einführung

Wie bereits in Unterkapitel 1.2.3 beschrieben, handelt es sich bei zellfreien Biokatalysen um Systeme, die eine nachhaltige Produktion von chemischen Grunderzeugnissen aus nachwachsenden Rohstoffen ermöglichen können. Ein solches System wurde bereits am Lehrstuhl entwickelt und publiziert (GUTERL et al. 2012). Diese Reaktionskaskade ermöglicht es, mittels sechs bzw. acht verschiedener Enzyme Ethanol oder Isobutanol aus D-Glukose zu produzieren. Dem System liegt ein modifizierter nichtphosphorylierender Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg zu Grunde (VAN DER OOST et al. 2005), der simplifiziert wurde, indem die Substratpromiskuität der Dihydroxysäure-Dehydratase ausgenutzt wurde (CARSTEN et al. 2015; KIM & LEE 2006). Um die Flexibilität zu erhöhen, wurde ein Baukastensystem mit verschiedenen kombinierbaren Modulen entwickelt, die in einer ‚Ein-Topf-Reaktion‘ zusammenkommen. Im ersten Modul wird aus Glukose Pyruvat gebildet (Abb. 4.1), das dann um ein weiteres Modul komplettiert werden kann, um entweder Ethanol oder Isobutanol zu produzieren (Abb. 4.2). Als Cofaktor wurde NAD^+ gewählt, da dieses im Vergleich mit anderen Cofaktoren (z. B. NADP^+) kostengünstiger ist. Die in Frage kommenden Oxidoreduktasen setzen für eine Anwendung in diesem System voraus, dass sie mit NAD^+ als Cofaktor aktiv sind. Die Gesamtreaktion ist cofaktorneutral. Die entstandenen NADH -Äquivalente im ersten Modul werden anschließend bei der Bildung von Ethanol bzw. Isobutanol verbraucht und somit im System recycelt. Ein externes Cofaktor-Recycling ist nicht nötig.

Da mit Pyruvat ein Hauptintermediat vieler verschiedener Stoffwechselwege gewählt wurde, ist eine Erweiterung zu anderen Produkten wie 2,3-Butandiol oder verschiedenen Aminosäuren vorstellbar. Ebenso kann das System auf der Eduktseite erweitert werden und es können andere Kohlenhydrate zum Einsatz kommen. Neu in das System eingebrachte Enzyme haben demnach in der Regel keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der restlichen Enzyme (siehe dazu Unterkapitel 1.2.3 sowie 1.2.4).

In Abb. 4.1 ist die Reaktionskaskade mit Fokus auf der Pyruvatbildung schematisch dargestellt. Im ersten Schritt oxidiert Glukosedehydrogenase (GDH) D-Glukose zu Glukonat (GluA), bei gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ . Als nächstes wird aus GluA 2-Keto-3-Deoxyglukonat (KDG) synthetisiert, wobei diese Reaktion durch die Dihydroxysäure-Dehydratase (DHAD) katalysiert wird. Anschließend spaltet KDG-Aldolase (KDGA) KDG in das erste Mol Pyruvat und Glycerinaldehyd (GA). GA wird dann durch Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) zu Glycerat (GlyA) oxidiert, wobei ein weiteres Mol NADH gebildet wird. Die hier verwendete ALDH zeigt keine Nebenaktivität gegenüber anderen Aldehyden und ist deshalb für die Anwendung in dieser Kaskade ideal (STEFFLER & SIEBER 2013). Die Reaktion von GlyA zum zweiten Mol Pyruvat wird durch die Substratpromiskuität der DHAD ermöglicht (CARSTEN et al. 2015; KIM & LEE 2006). Zum besseren Verständnis der Kaskade wird die Reaktionsroute zum Pyruvat in zwei Wege unterteilt: zum einen in den Hauptweg, der die Reaktion direkt von Glukose zu Glukonat, KDG und zum ersten Mol Pyruvat beschreibt, und zum

anderen in den Nebenweg, der die Reaktionskaskade von KDG über GA weiter zu GlyA und zum zweiten Mol Pyruvat bezeichnet.

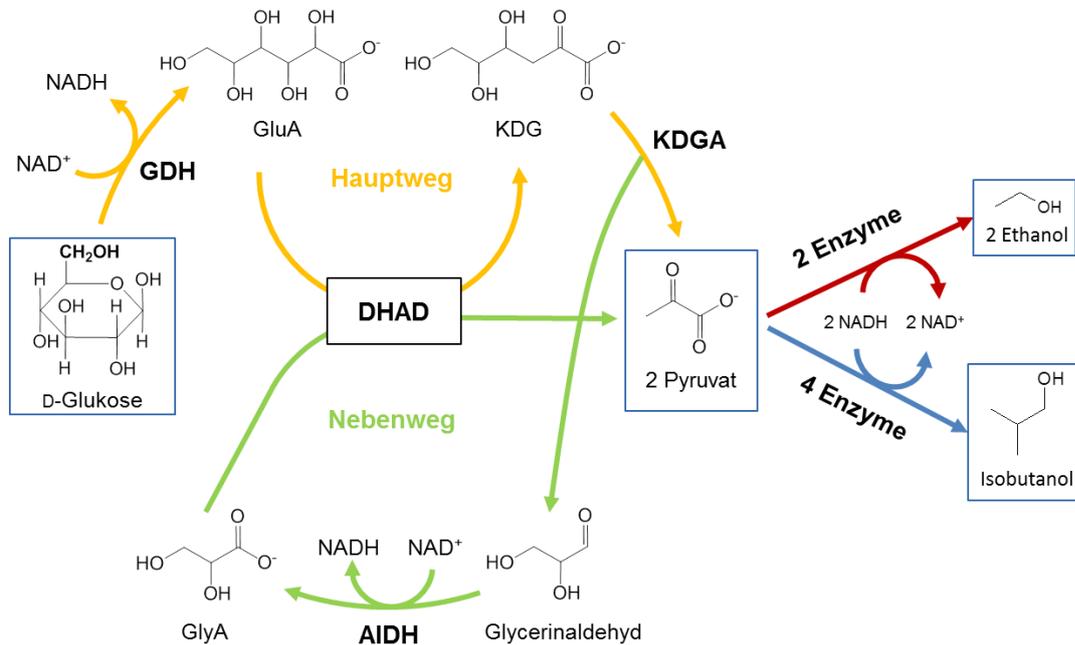


Abb. 4.1: Vierstufige enzymatische Reaktionskaskade ausgehend von D-Glukose zum Schlüsselintermediat Pyruvat. Dabei sind die involvierten Enzyme **GDH**: Glukosedehydrogenase; **DHAD**: Dihydroxysäure-Dehydratase; **KDGA**: KDG-Aldolase; **ALDH**: Aldehyd-Dehydrogenase (GUTERL et al. 2012). Diese Synthese kann in zwei Teile unterteilt werden, den Hauptweg (KDG zu Pyruvat) und den Nebenweg (KDG zu Glycerinaldehyd, Glycerat und weiter zu Pyruvat). Diese Unterteilung ermöglicht eine exaktere Analyse. Vom Pyruvat ausgehend kann dann entweder mit zwei oder vier weiteren Enzymen Ethanol bzw. Isobutanol hergestellt werden (siehe Abb. 3.2) GluA: Glukonat; KDG: 2-Keto-3-Deoxygluconat; GlyA: Glycerat.

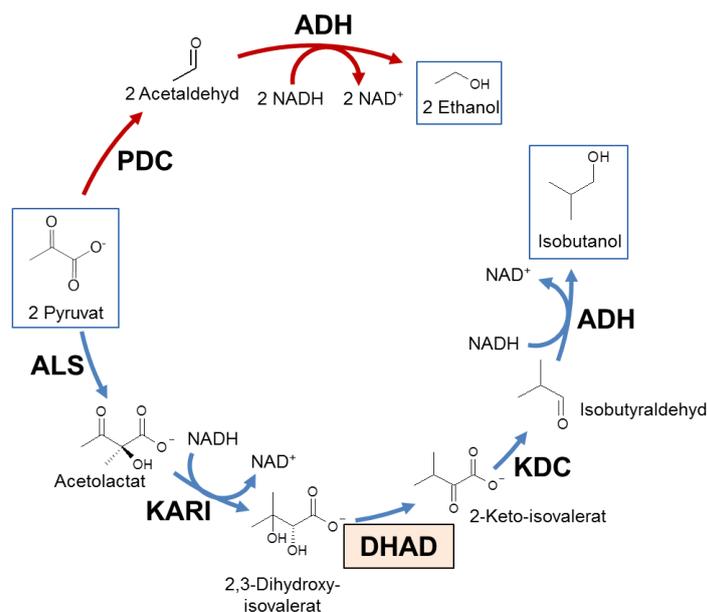


Abb. 4.2: Reaktionskaskade ausgehend von Pyruvat zur Bildung von Ethanol bzw. Isobutanol. Für die Ethanol-Synthese werden Pyruvat-Decarboxylase (**PDC**) und Alkohol-Dehydrogenase (**ADH**) und für die Synthese von Isobutanol Acetolactat-Synthase (**ALS**), Ketolsäure-Reductoisomerase

(**KARI**), Dihydroxysäure-Dehydratase (**DHAD**; die spezielle Formatierung in der Abbildung ist ohne Bedeutung), Ketosäure-Decarboxylase (**KDC**) und Alkohol-Dehydrogenase (**ADH**) benötigt (CARSTEN et al. 2015).

Anschließend an die Bildung von Pyruvat folgen die Alkoholkaskaden, dargestellt in Abb. 4.2. Die Ethanolkaskade besteht aus Pyruvat-Decarboxylase (PDC), die Pyruvat zu Acetaldehyd decarboxyliert, und Alkohol-Dehydrogenase (ADH), die die Bildung von Ethanol aus Acetaldehyd und NADH katalysiert. Die Isobutanolkaskade beginnt mit Acetolactat-Synthase (ALS), die aus zwei Molekülen Pyruvat Acetolactat bildet, wobei CO₂ abgespalten wird. Darauf folgend katalysiert Ketolsäure-Reductoisomerase (KARI) unter Verwendung von NADH 2,3-Dihydroxyisovalerat. Auch in diesem Teil der Reaktionskaskade wird die Substratpromiskuität von DHAD ausgenutzt. Dieses Mal wird aus 2,3-Dihydroxyisovalerat Ketoisovalerat gebildet. Die letzten beiden Reaktionsschritte ähneln der Ethanol-Route. Ketosäure-Decarboxylase (KDC) decarboxyliert Ketoisovalerat (KIV) und dieselbe ADH reduziert das entstandene Isobutyraldehyd zu Isobutanol und verbraucht dabei NADH. Beide Alkoholrouten benötigen jeweils 2 Mol NADH und verbrauchen damit die im ersten Modul gebildeten Äquivalente.

Die Reaktion wurde bei 50 °C betrieben und konnte über einen Zeitraum von 24 h aus 25 mM eingesetzter Glukose 28,7 mM Ethanol und 10,3 mM Isobutanol produzieren. Dies entspricht einer molaren Ausbeute von 57,4 % für Ethanol und 53 % für Isobutanol. Eine Quantifizierung aller gemessenen Intermediate und Produkte ergab, dass 80 % der eingesetzten Glukose wiedergefunden werden konnte. Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass das System funktioniert und eine Produktbildung sowie eine interne Regeneration des Cofaktors stattfinden.

Jedoch besteht in einigen Teilen der Kaskade Bedarf zur Optimierung. Zum einen war in den bisherigen Arbeiten keine Quantifizierung des Glycerinaldehyds möglich und ein signifikanter Teil der Reaktion blieb somit unerkannt. Dies konnte bislang nur in sehr geringem Umfang untersucht werden, da das Substrat nicht mit den bisher verwendeten Analysemethoden detektierbar war. Darüber hinaus weist ALDH mit einem sehr hohen K_m-Wert von 22,7 mM für NAD⁺ einen weiteren Nachteil auf. Zum anderen zeigte sich, dass die Substrate der DHAD zu einem signifikanten Teil angereichert werden. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Optimierungsversuche unternommen, um die Aktivität der einzelnen Flaschenhalsenzyme zu erhöhen und die Quantifizierung aller aufkommenden Intermediate zu ermöglichen.

Als Flaschenhalsenzyme wurden daher DHAD und ALDH identifiziert, da beide nur eine geringe Aktivität gegenüber ihren Substraten zeigen. Aus diesem Grund wurden als Optimierungsansätze zum einen die Enzyme und deren Herstellung verbessert und zum anderen wurde eine Methode zur Bestimmung der GA-Konzentration entwickelt. Im Fall von DHAD konnte die Produktionsmethode dahingehend optimiert werden, dass mehr des Eisen-Schwefel-Clusters in den Enzymen eingebaut wurde und damit die Menge an aktivem Enzym erhöht werden konnte (CARSTEN et al. 2015). ALDH wurde durch ein Enzymengineering verbessert, mit der Folge, dass der K_m-Wert auf 16,7 mM gesenkt werden konnte (STEFFLER et al. 2013).

Als Analysemethoden für GA wurde eine am Lehrstuhl entwickelte Methode zur Bestimmung von Aldehyden angewandt (RÜHMANN et al. 2014), die auf einer Derivatisierung von reduzierenden Kohlenhydraten mit 1-Phenyl-3-Methyl-5-Pyrazolon (PMP) basiert (HONDA et al. 1989). Unter milden Bedingungen können damit Aldehyde selektiv markiert und über HPLC-MS/MS detektiert

werden. Diese Methode wurde zu einer Hochdurchsatzmethode weiterentwickelt, wodurch die hohe Probenanzahl bewältigt werden kann.

Da die PMP-Methode jegliche Aldehyde erfasst, war zusätzlich eine Glukose-Quantifizierung möglich. Dies wurde bislang mittels eines gekoppelten Enzymassays durchgeführt. Die Etablierung dieser Methode als Teil der Analyse des Gesamtsystems ermöglicht außerdem, dass ohne eine umfassende Methodenentwicklung auch das Substrat verändert werden kann. Es können nun auch andere Aldosen quantifiziert und verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte demnach untersucht werden, wie sich das Verhalten der Kaskade durch die Verbesserung von ALDH und DHAD verändert hat. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob die PMP-Methode geeignet ist, um eine Aldehydquantifizierung im System zu bewerkstelligen. Angesichts der potenziellen Möglichkeiten dieser neuen Methode und neuer Erkenntnisse der Substratpromisquität von DHAD (CARSTEN et al. 2015) wurde die Reaktion auf der Substratseite hin zu Laktose erweitert. GDH und KDGA weisen ebenso Promisquität auf. Untersucht werden soll demnach, inwieweit Laktose als neues Startsubstrat in Frage kommen kann. Laktose fällt in großer Menge bei der Käseherstellung an und steht somit kostengünstig zur Verfügung. Dieses Disaccharid besteht aus Glukose und Galaktose und wird durch das Enzym β -Galaktosidase gespalten. Damit ist es möglich, mit nur einem zusätzlichen Enzym die Kaskade zu erweitern und Laktose als Ausgangssubstrat zu verwenden. Mit der PMP-Methode kann eine Analyse der gesamten Kaskade realisiert werden.

4.1.2 Ergebnisse

4.1.2.1 Effektivität und Optimierung der enzymatischen Reaktionskaskade

Zu Beginn wurde die Ethanol-Route der Kaskade dahingehend untersucht, ob der Einsatz der verbesserten Enzyme auch eine Erhöhung der Gesamtausbeute zur Folge hat. Mit Hilfe der neu angewendeten PMP-Methode sollte untersucht werden, inwieweit eine komplette Bilanzierung aller Intermediate möglich ist. Um die Komplexität der Experimente zu begrenzen, wurde nur die Ethanol-Route analysiert. Im Gegensatz zu früheren Experimenten wurde die Aktivität verdoppelt. Dementsprechend wurden 12 U GDH, 40 U DHAD (bezogen auf das Substrat Glukonat) und 20 U KDGA, ALDH, PDC und ADH eingesetzt.

Nach 21 h betrug die gemessene Ethanolkonzentration 35 mM, was einer molaren Ausbeute von 78,8 % entspricht. Dies stellt einen Anstieg von 22 % im Vergleich zu den früheren Ergebnissen dar (GUTERL et al. 2012). Die Ergebnisse sind in Abb. 4.3 dargestellt und in Anhang 1 finden sich die zugehörigen Rohdaten.

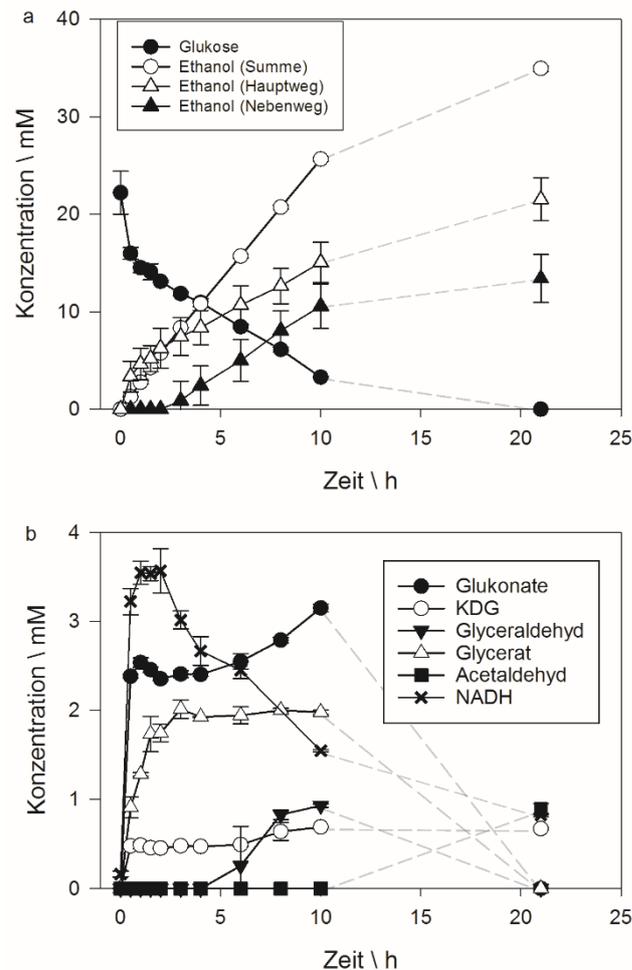


Abb. 4.3: Zeitlicher Verlauf aller detektierten Komponenten bei der Synthese von Ethanol aus Glukose mittels einer enzymatischen Reaktionskaskade. Dargestellt sind Glukose und Ethanol (a) und alle weiteren Intermediate sowie NADH (b). Zur besseren Verständlichkeit wurde die Ethanol-Synthese in Haupt- und Nebenweg aufgeteilt.

Hier sind eine lineare Zunahme von Ethanol und eine lineare Abnahme von Glukose in den ersten 10 h deutlich erkennbar. Jedoch ist davon ausgegangen worden, dass eine Verdopplung der Enzymkonzentration auch eine Verdopplung der Reaktionsrate zur Folge hat. Mit einer Rate von $2,5 \text{ mM h}^{-1}$ konnte nur eine Steigerung von 9 % erreicht werden. In vorangegangenen Experimenten betrug diese $2,3 \text{ mM h}^{-1}$ (GUTERL et al. 2012). Anscheinend sind die Enzymkonzentrationen nicht die geschwindigkeitsbestimmenden Faktoren. Festgestellt werden konnte indes, dass die Stabilität und Effektivität der gesamten Kaskade deutlich erhöht werden konnten. Dies zeigt sich anhand der gesteigerten Ausbeute.

Für die Enzymreaktion von Glukose zu Glukonat und weiter zu KDG bildet sich ein stabiles Fließgleichgewicht, dargestellt im Verhältnis der Konzentrationen der beiden Intermediate gegen die Zeit (Abb. 4.4).

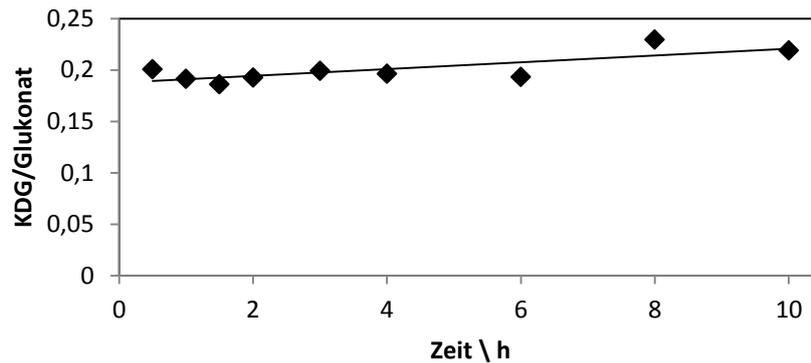


Abb. 4.4: Darstellung des Verhältnisses der KDG- und Glukonat-Konzentration über die Zeit. Es stellt sich ein Fließgleichgewicht ein und kann über 10 h konstant beobachtet werden.

Dies verdeutlicht, dass sich in Bezug auf die erste DHAD-Reaktion ein stabiler Substratfluss einstellt und somit DHAD die Reaktion konstant katalysiert. Die Tatsache, dass diese geringe Aktivität über den gesamten Messzeitraum stabil bleibt, spricht dafür, dass das Enzym bis zum Ende der Reaktion nicht oder nur in geringem Maße an Aktivität verliert.

Zu Beginn der Reaktion springt die Konzentration von Glukonat und KDG auf jeweils ca. 2,5 mM und 0,5 mM (Abb. 4.3), bevor sich das Fließgleichgewicht im weiteren Verlauf bei ebendieser Konzentration einstellt und für ca. 6 h konstant bleibt. Danach steigt die Konzentration von Glukonat auf 3,15 mM an, um bis zum Ende der Reaktion komplett zu verschwinden. Dieser Anstieg und der komplette Verbrauch sind ebenso bei KDG zu beobachten. Dieses Fließgleichgewicht ist vermutlich auch von der NAD^+ -Konzentration abhängig, da Glukonat nur bei ausreichender Verfügbarkeit von NAD^+ gebildet werden kann.

Ein ähnliches, aber um 3 h zeitversetztes Verhalten ist bei Glycerat zu beobachten. Dort wird ein Fließgleichgewicht bei einer Konzentration von 2 mM erreicht. Parallel dazu akkumuliert Glukonat weiter bis 3,15 mM. Dies geschieht vermutlich, da die Präsenz des zweiten DHAD-Substrates dafür sorgt, dass die Aktivität gegenüber Glukonat inhibiert wird (CARSTEN et al. 2015). Nach 10 h sinken beide Intermediatkonzentrationen unter die Detektionsgrenze. Diese langsame Abnahme ist in der niedrigen Wechselzahl der DHAD begründet. Eine Akkumulierung beider Stoffe wurde erwartet, da die Aktivität von DHAD gegenüber Glycerat ca. zehnmal niedriger ist und Glycerat selbst inhibierend wirkt (CARSTEN et al. 2015). Jedoch zeigt sich, dass, sobald der Substratfluss stoppt, beide Intermediate verbraucht werden, obwohl sie sich angereichert haben, weshalb von einer kontinuierlichen und stabilen Aktivität von DHAD während des gesamten Prozesses ausgegangen werden kann.

Am Ende der Reaktion, nach 21 h, konnten nur die Intermediate KDG und Acetaldehyd gemessen werden. Dies ist erstaunlich, da KDGA eines der temperaturstabilsten Enzyme der Kaskade darstellt und deshalb eigentlich keine Anreicherung auftreten sollte. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liegt in der Reaktivität der entstandenen Aldehyde mit dem katalytisch aktiven Lysin von KDGA. Auf die Reaktivität von Aldehyden wird in Unterkapitel 4.1.2.3 detaillierter eingegangen.

Hinzu kommt die beobachtete Acetaldehydkonzentration von 1 mM, die entweder durch einen Aktivitätsverlust von ADH oder des NADH-Recyclings erklärt werden kann.

Dem Verlauf der NADH-Konzentration folgend zeigen sich eine schnelle Bildung von 3,2 mM während der ersten 30 min und eine Stabilisierung bei 3,5 mM für die folgenden 2 h. Danach fällt die Konzentration bis zum Ende der Reaktion kontinuierlich ab. Dieses Verhalten wurde auch bereits in früheren Publikationen beobachtet (GUTERL et al. 2012) und erscheint plausibel, da GDH zu Beginn der Reaktion das einzige Enzym ist, dem Substrat und Cofaktor zur Verfügung stehen. Demnach war ein zügiger Anstieg der NADH-Konzentration zu erwarten. Dies bedeutet jedoch im Gegenzug, dass die ohnehin schon geringe Aktivität von ALDH noch zusätzlich beeinflusst wird und vermutlich selbst in Gegenwart von GA nicht stattfinden kann. Die geringe Aktivität von ALDH gegenüber GA kann sich negativ auf die Gesamtbilanz auswirken, da das reaktive Aldehyd dem System durch eine möglich Nebenreaktion verloren gehen kann.

4.1.2.2 Aldehydquantifizierung und Bilanzierung der Gesamtreaktion

Um die Vorteile der PMP-Methode zur Messung von Glukose darzustellen, wurde zum Vergleich ein enzymatischer Assay zur Bestimmung der Glukosekonzentration durchgeführt. Dahingehend ist anzumerken, dass es bei der Vorbereitung des Versuches zu einem Rechenfehler gekommen ist; anstelle der geplanten 25 mM Glukose wurden nur 22,7 mM eingewogen. Der Vergleich beider Methoden ist in Abb. 4.5 dargestellt. Bei 0 h konnte der Assay nur 18,2 mM der eingesetzten 22,7 mM Glukose messen, die PMP-Methode dagegen 22,2 mM.

Beide Methoden neigen demnach dazu, eine zu geringe Glukosekonzentration zu detektieren. In den hier aufgeführten Experimenten detektierte der Assay durchschnittlich 2,45 mM Glukose weniger als die PMP-Methode. Durch die hohe Anzahl an Verdünnungen von mindestens 1:1000, die die hohe Sensitivität des Assays voraussetzt, entstehen vermutlich häufiger Fehler und Messungenauigkeiten. Der Bereich der Kalibrierung für den Enzymassay liegt zwischen 1 und 500 μ M, wohingegen die PMP-Methode einen Detektionsbereich von 0,8–6,8 mM besitzt. Die höheren Detektionslimits sind in diesem Fall von Vorteil, da weniger Verdünnungsschritte vorgenommen werden müssen und somit die Fehleranfälligkeit sinkt. Hinzu kommt ein weiterer Vorteil der PMP-Methode, denn alle in der Reaktion vorkommenden Aldehyde – im Speziellen das Glycerinaldehyd (GA) – können gemessen werden.

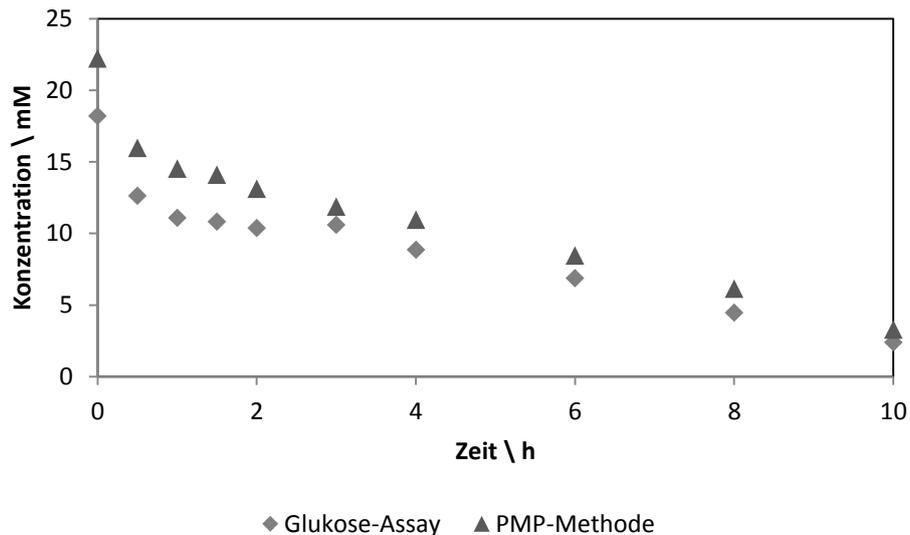


Abb. 4.5: Vergleich unterschiedlicher Glukosebestimmungsmethoden; gekoppelter, enzymatischer Glukose-Assay (◆) und 1-Phenyl-3-Methyl-5-Pyrazolon(PMP)-Methode (▲).

Da bisher noch keine Analysemethoden für GA bereitstanden, ist eine Gegenüberstellung wie im Fall von Glukose nicht möglich. Um die Validität der Ergebnisse dennoch zu überprüfen und die Flaschenhalse des Systems zu identifizieren, wurde der gesamte Reaktionsverlauf bilanziert, wozu der Prozess in die zwei möglichen Produktionsrouten aufgeteilt wurde. Der Hauptweg führt dabei direkt nach der Spaltung von KDG zu Pyruvat und weiter zu Ethanol, der Nebenweg führt nach der Spaltung von KDG über Glycerinaldehyd und Glycerat zu Pyruvat und schlussendlich zu Ethanol (Abb. 4.1). Diese Einteilung ermöglicht eine detaillierte Analyse und veranschaulicht, welche einzelnen Enzymreaktionen die Schwachstellen des Prozesses darstellen. Dafür wurde zuerst die Menge an Pyruvat berechnet, die zu einem bestimmten Zeitpunkt zur Verfügung stand (Formel 4.1). Die zu einem Zeitpunkt t gemessene Glukosemenge wird von der Summe aller C6-Moleküle, GluA und KDG subtrahiert. Dies entspricht der Menge an Pyruvat, das dem System zur Verfügung stand. Aus 1 Mol Glukose entstehen 2 Mol Pyruvat.

$$(n_0(\text{Glukose}) - \sum n_t(\text{C6-Molekül})) * 2 = n_t \text{ Pyruvat}$$

Formel 4.1 Berechnung der möglichen insgesamt entstandenen Pyruvatmenge zu einem bestimmten Zeitpunkt (t). Die Summe der Menge der C6-Moleküle (Glukose, Glukonat und KDG) zu einem Zeitpunkt (t) wird von der D-Glukose-Menge zum selben Zeitpunkt abgezogen. Da aus 1 Mol Glukose 2 Mol Pyruvat gebildet werden, wird die Pyruvatmenge halbiert. Dies entspricht der Menge an Pyruvat, die dem System zur Verfügung gestanden haben muss.

Es wird angenommen, dass während der ersten 10 h das gesamte Pyruvat und Acetaldehyd zu Ethanol umgewandelt wurde; demnach entspricht die Pyruvatmenge auch der Ethanolmenge. Diese Annahme basiert auf den sehr niedrigen Detektionslimits für Pyruvat (125 μM) und Acetaldehyd (20 μM) und der Tatsache, dass diese Intermediate während der ersten 10 h nicht gemessen wurden. Daraus

resultierend konnten die exakten Mengen an Ethanol berechnet werden, die über den Haupt- bzw. Nebenweg produziert wurden.

Für den Hauptweg musste die Hälfte der zur Verfügung stehenden Pyruvatmenge konvertiert werden (Formel 4.1, Abb. 4.3a). Die Ethanolmenge, die aus dem Nebenweg resultiert, wurde berechnet, indem die Menge des Hauptweges von der gemessenen Menge subtrahiert wurde.

$$\text{a) } n_t \text{ Ethanol Hauptweg} = n_t \text{ Pyruvat} / 2$$

$$\text{b) } n_t \text{ Ethanol Nebenweg} = n_t \text{ Ethanol gemessen} - n_t \text{ Ethanol Hauptweg}$$

Formel 4.2 Berechnung der aus dem Hauptweg (a) bzw. Nebenweg (b) resultierenden Ethanolmenge zum Zeitpunkt t.

Diese Berechnungen, dargestellt in Abb. 4.3a, geben einen Einblick in den Verlauf der gesamten Reaktion sowie in die theoretisch verfügbare Menge an Glycerinaldehyd zu bestimmten Zeitpunkten (siehe 4.1.2.3). Während der ersten 2 h wird kein Ethanol über den Nebenweg gebildet, einzig der Hauptweg der Reaktion ist aktiv, obwohl Glycerat direkt nach dem Start verfügbar ist. Erst nachdem Glycerat die Konzentration des Fließgleichgewichts nach ca. 3 h (Abb. 4.3 b) erreicht hat, wird auch der Nebenweg aktiv und es wird Ethanol darüber gebildet. Grund hierfür ist wahrscheinlich die niedrige Aktivität von DHAD gegenüber Glycerat.

Mit der Kombination aller analytischen Methoden ist es möglich, eine Gesamtbilanz über die Reaktion zu ziehen (Abb. 4.6). Es ist zu beobachten, dass bereits nach 30 min 10,2 % der Reaktanten in der Bilanz nicht zu detektieren sind. Während der nächsten 3 h bleibt dieses Niveau nahezu unverändert. Erst die Messungen nach 4 und 5 h zeigen eine Verbesserung der Wiederfindung, und nach 8 h konnten 96,1 % und nach 10 h 96,4 % aller möglichen Reaktanten wiedergefunden werden. Bei längerer Inkubation von 21 h gehen wiederum 17 % verloren. Dieses Verhalten legt eine oder mehrere Nebenreaktionen nahe, die bislang jedoch noch nicht festgestellt werden konnten. Es wird vermutet, dass GA der Bilanzierung entgeht, da seine Reaktivität dies zum einen ermöglicht, und zum anderen wird es erst nach 6 h gemessen, was dem Verlauf der anderen Reaktanten widerspricht.

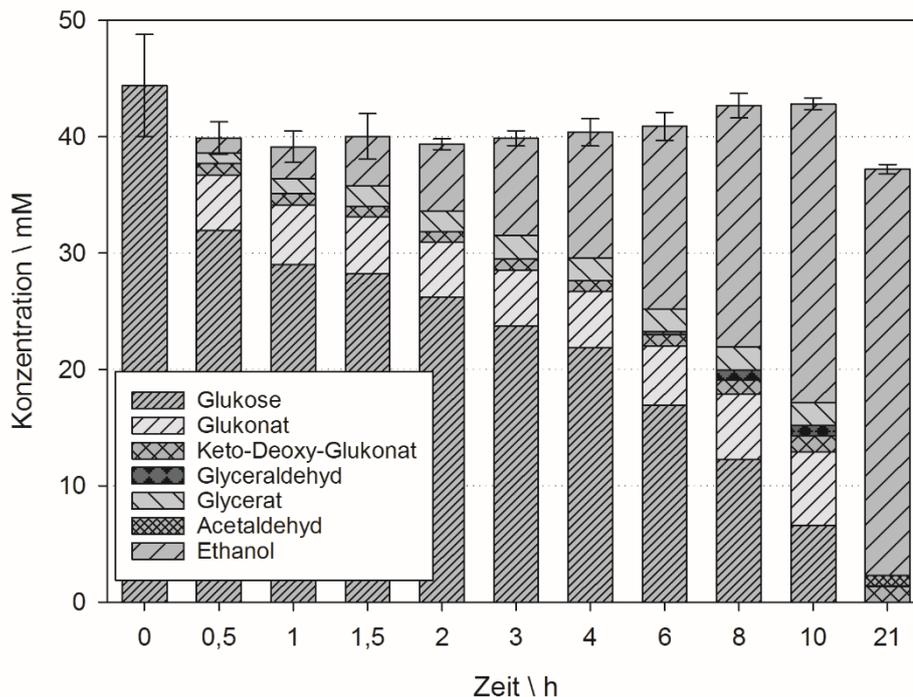


Abb. 4.6: Gesamtbilanz aller gemessenen Reaktanten.

4.1.2.3 Reaktivität des Glycerinaldehyds

Ausgehend von der Beobachtung, dass während der ersten 10 h zeitweise über 10 % der theoretischen Gesamtmenge an Intermediaten nicht nachweisbar war, wurden weitere Untersuchungen veranlasst. Dabei wurde das Verhalten der Glycerinaldehydkonzentration genauer in Betracht gezogen, da dieses sich nicht wie erwartet verhielt. Es wurde ein zügiger Anstieg bis zu einem gewissen Niveau, ähnlich dem Verlauf von KDG oder Glycerat, angenommen. Da diese beiden Intermediate in der Kaskade vor und nach Glycerinaldehyd vorkommen, sollte dieses auch nachweisbar sein. Da es aber erst nach 6 h messbar ist, muss angenommen werden, dass es in einer Nebenreaktion gebunden und dadurch auch der Gesamtbilanz entzogen wird. Indem die gemessenen Intermediatkonzentrationen zur Hilfe genommen werden, ist es möglich, die theoretisch gebildete Menge an Glycerinaldehyd zu berechnen, das zur Verfügung stehen sollte. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.7 und Tab. 4.1 aufgeführt. Demnach hätte in den ersten 6 h zwischen 4 und 5 mM Glycerinaldehyd gemessen werden müssen. Da aber erst nach 6 h 0,26 mM erscheint, bleibt ein großer Teil nicht nachweisbar.

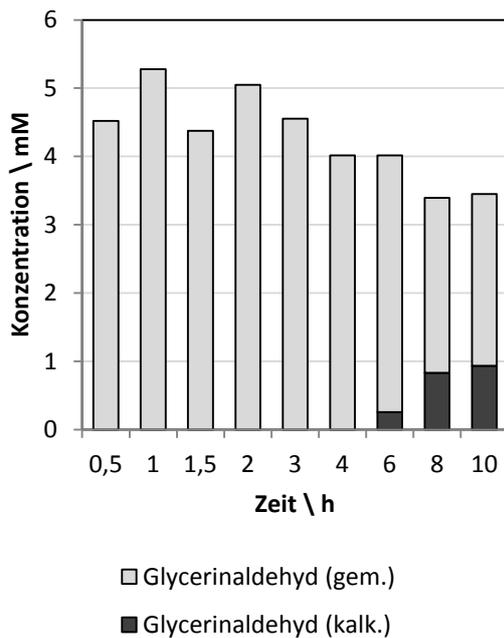


Abb. 4.7: Darstellung der gemessenen (gem.) Glycerinaldehydkonzentration und der theoretisch bestimmten (kalk.) Menge.

Tab. 4.1: Vergleich zwischen der gemessenen Glycerinaldehydkonzentration und der theoretisch bestimmten Menge

Zeit \ h	GA	GA	Δ GA	Δ GA
	gem \ mM	cal \ mM	\ mM	%
0	0	0,00	0,00	0
0,5	0	4,52	4,52	100
1	0	5,28	5,28	100
1,5	0	4,38	4,38	100
2	0	5,05	5,05	100
3	0	4,55	4,55	100
4	0	4,02	4,02	100
6	0,26	3,76	3,50	93,08
8	0,83	2,56	1,73	67,58
10	0,93	2,52	1,59	63,01

Eine Hypothese für das Verschwinden des Glycerinaldehyds basiert auf der Reaktivität des Aldehyds mit primären Aminen. Es wird angenommen, dass Schiffsbasen mit den Aminofunktionen der Proteine gebildet werden und dadurch keine Detektion des Aldehyds mehr stattfinden kann. Dieser gebundene Aldehyd geht der Kaskade verloren und wirkt sich damit auch auf die gesamte Ausbeute des Systems aus. Um zu überprüfen, ob diese Reaktion stattfindet, wurden spezielle Experimente entwickelt, die die Affinität der Aldehyde gegenüber den Aminen/Proteinen bestimmen soll. Ziel dieser Experimente sollte sein, den Reaktionsmechanismus näher zu erläutern und herauszufinden, ob eine Konzentrationsabhängigkeit vorliegt. Dazu wurden die Bedingungen der Kaskadenreaktion ohne das Substrat Glukose und Co-Faktor NAD^+ nachgestellt. Hinzugegeben wurden dann verschiedene Konzentrationen an GA, um anschließend bei $50\text{ }^\circ\text{C}$ zu inkubieren. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben genommen und es wurde die GA-Konzentration mittels PMP-Methode bestimmt. Es wurden 2 und 5 mM GA als Konzentrationsstufen gewählt, da diese nahe an dem zu erwartenden Wert der eigentlichen Ethanol-Synthese liegen. Die Mengen 10 und 50 mM GA wurden gewählt, um festzustellen, ob eine Sättigung aller primären Amine des Proteins möglich ist. Als Kontrolle wurde je ein Ansatz ohne Protein vorbereitet. Diese Kontrollexperimente zeigten, dass die GA-Wiederfindung Schwankungen ausgesetzt war. Im Durchschnitt konnten zwar 95 % des GAs wiedergefunden werden, jedoch gibt es Messungen, die bis zu 28 % vom Soll abweichen. Gerade bei GA scheint es nicht möglich zu sein, konstant zuverlässige Messergebnisse zu erzeugen. Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Messungenauigkeiten durch die PMP-Methode oder weitere Stoffe entstehen, die sich in der Reaktion befinden. Die Reaktivität von GA ist sehr hoch und eine vergleichende Methode stand nicht zur Verfügung.

Trotz dieser methodischen und systematischen Unzulänglichkeiten konnte in den Experimenten, in denen sich Enzym in der Reaktion befand, ein eindeutiger Verlust an freiem GA festgestellt werden

(Abb. 4.8). Nach 60 min konnten noch 50,9 % des 2-mM-Ansatzes, 62,9 % des 5-mM-Ansatzes, 55,9 % des 10-mM-Ansatzes und 71,3 % des 50-mM-Ansatzes gemessen werden. Diese Berechnungen wurden auf die Konzentrationen, gemessen zum Zeitpunkt $t_{0\text{min}}$ und $t_{60\text{min}}$, bezogen. Beim Vergleich der Ergebnisse untereinander wird deutlich, dass, je mehr Aldehyd sich in der Reaktion befindet, dieses umso schneller verschwindet. Dies zeigt sich besonders deutlich anhand der absoluten Werte. Bei 2 mM GA ist nach 60 min ein Verlust von lediglich 0,94 mM zu beobachten; im Vergleich dazu beträgt nach derselben Zeit und derselben Menge an Protein in der Lösung der Verlust im 50-mM-Ansatz 13,14 mM.

Das Experiment mit 5 mM GA spiegelt die Bedingungen der Reaktionskaskade am besten wider. Dort wurde eine GA-Konzentration von 4–5 mM während der ersten 6 h erwartet (Tab. 4.1). In dem hier durchgeführten Experiment fällt die Menge an gemessenem GA von 4,2 mM auf 2,6 mM innerhalb der ersten Stunde, was einem Verlust von GA von 37,1 % entspricht. Während der gesamten Dauer des Versuches von 4 h verschwindet 70 % des eingesetzten GA. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass das während der Enzymkaskade freigesetzte GA leicht an die Proteinreste gebunden werden kann und sich demnach der Reaktion und der Bilanzierung entzieht.

Unter der Annahme, dass die Bindung des GA mit den primären Aminen stattfindet, bleibt die Frage offen, wie viele primäre Amine in der Gesamtkaskadenreaktion überhaupt zur Verfügung stehen. Wird die theoretisch verfügbare Menge an primären Aminen berechnet, wird deutlich, dass die Konzentration aller Amine der Aminosäuren Lysin, Arginin, Glutamin und Asparagin deutlich zu niedrig ist, um die Reaktion mit 4–5 mM GA zu ermöglichen. Es müssen demnach noch weitere GA-verringende Faktoren existieren.

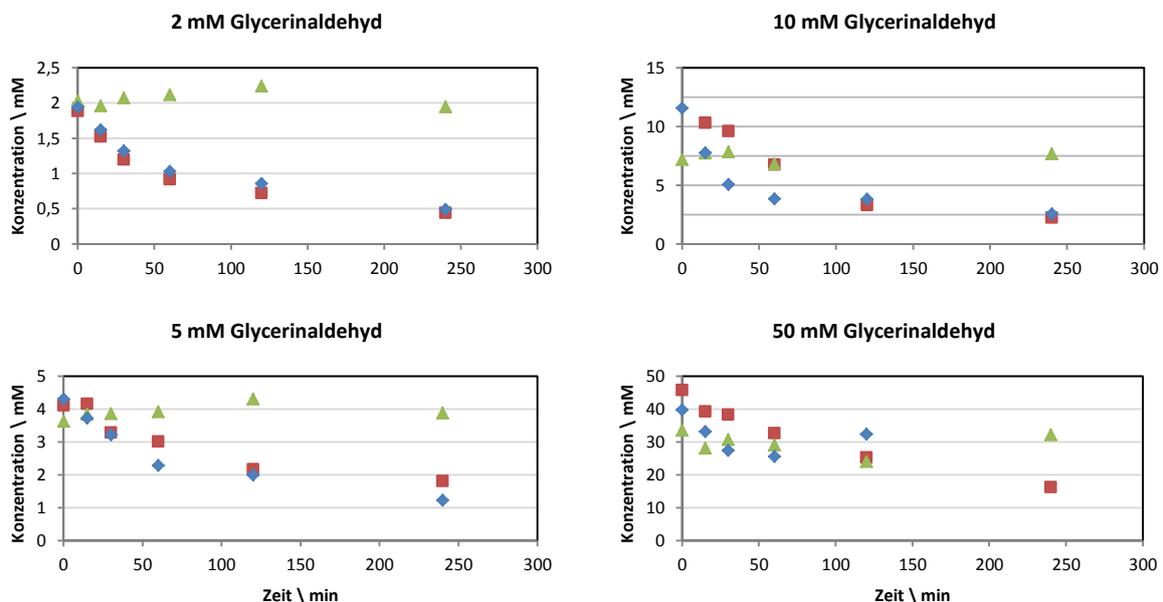


Abb. 4.8: Darstellung der Glycerinaldehydbindung an die Proteine der Reaktionskaskade. ■ und ◆ sind die Ergebnisse ▲ die Kontrolle ohne den Einsatz von Protein.

4.1.2.4 Laktose als Substrat für eine zellfreie Enzymreaktion zur Produktion von Ethanol

Laktose wurde ausgewählt, um zu untersuchen, ob es möglich ist, das Substratspektrum der Reaktionskaskade zu einem alternativen aber auch komplexeren Substrat zu erweitern. Da nur ein einzelnes zusätzliches Enzym nötig ist, um Laktose umzusetzen, musste wenig am bereits etablierten System geändert werden. Die Spaltung von Laktose wird durch β -Galaktosidasen katalysiert. Beide daraus resultierenden Zucker, Glukose und Galaktose, können von den Enzymen der etablierten Kaskade umgesetzt werden. Die unter 3.5.2 beschriebene Methode diente als Basis für die Analyse der Aldehyde und der Zuckersäuren. Dabei wurde keine weitere Probenvorbereitung benötigt. In Tab. 4.2 sind die Aktivitäten der Enzyme gegenüber den alten und neuen Substraten dargestellt. So zeigt GDH einen um den Faktor 2,6 gegenüber Galaktose verringerten K_m -Wert und nur 80 % des k_{cat} (MILBURN et al. 2006). DHAD weist eine verringerte Aktivität gegenüber Galaktonat auf (KIM & LEE 2006) und KDGA unterscheidet sich in seinen K_m -Werten um den Faktor 2,3 zwischen KDG und 2-Keto-3-Deoxy-Galaktonat (KDGal) (LAMBLE et al. 2005).

Tab. 4.2: Aktivität der Enzyme GDH, DHAD und KDGA gegenüber Glukose und Galaktose sowie deren Derivate (CARSTEN et al. 2015; KIM & LEE 2006; MILBURN et al. 2006; WOLTERINK-VAN LOO et al. 2007(Lamble, 2005 #324)

Substrat	K_{cat} [s^{-1}]		K_m [mM]	
	Glukose	Galaktose	Glukose	Galaktose
GDH	75	61	1.5	0.5
DHAD	Glukonat	Galaktonat	Glukonat	Galaktonat
	0,7	0,26	na.	na.
KDGA	KDG	KDGal	KDG	KDGal
	5	5.4	3.6	8.1

Aufgrund der Tatsache, dass Galaktose und seine Derivate von den etablierten Enzymen verwertet werden können, wurden Ansätze mit dem Substrat Laktose durchgeführt. Die ersten Experimente zeigten jedoch, dass lediglich 50 % der üblichen Produktionsrate erreicht werden konnte. Dieses Ergebnis ist überraschend, denn in separaten Untersuchungen konnten keine inhibitorischen Effekte von Laktose auf die einzelnen Enzyme festgestellt werden. Zu beobachten war außerdem, dass ein Großteil der eingesetzten Laktose nicht umgesetzt wurde. Die Kaskade scheint demnach bereits an der Spaltung der Laktose zu scheitern. Die eingesetzte β -Galaktosidase aus *E. coli* besitzt ein niedrigeres Temperaturoptimum im Vergleich zu den restlichen Enzymen der Kaskade, was zur Folge hat, dass die Bereitstellung von Glukose und Galaktose deutlich eingeschränkt und die gesamte Reaktion verlangsamt ist. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Anfangstemperatur gesenkt. Die Reaktion lag für die ersten 30 min bei 37 °C, der optimalen Höhe für β -Galaktosidase aus *E. coli*. Dies sollte eine schnelle Spaltung der Laktose zur Folge haben und damit die Reaktion starten. Nach 30 min wurde dann die Temperatur auf 50 °C erhöht, damit die restlichen Enzyme ihre bei 50 °C bestimmte Aktivität erreichen können. Die Ergebnisse des Experimentes sind in Abb. 4.9 dargestellt. Durch den veränderten Versuchsaufbau konnte eine beinahe vollständige Spaltung der eingesetzten Laktose während der ersten 60 min erreicht werden. Die maximal gemessene Konzentration an Monosacchariden betrug nach 60 min 21,3 mM Glukose und 16,1 mM Galaktose. Der gemessene Unterschied liegt zum einen an den unterschiedlichen K_m -Werten von GDH gegenüber den beiden

4.2 Neutralisierung von Silagepresssaft bei gleichzeitiger kontinuierlicher Produktion von Acetoin aus Milchsäure mittels einer immobilisierten enzymatischen Kaskadenreaktion

4.2.1 Einleitung

Wie bereits unter 1.1.2 beschrieben, bieten Bioraffinerien eine vielversprechende Lösung, um aus nachwachsenden Rohstoffen die Nachfrage an Treibstoffen und Chemikalien zu decken. Sie verbinden eine Herstellung vieler verschiedener Produkte mit integrativen Konzepten. Dies ermöglicht eine vollständige Nutzung der biologischen Ressourcen und damit auch eine wirtschaftlichere Produktion (CHERUBINI 2010). Um Teller-Tank-Problematiken zu vermeiden, ist die Wahl der Ressource entscheidend. Ein möglicher Rohstoff mit geringem Konflikt zu Nahrungsrohstoffen ist lignozellulosehaltige Biomasse aus Gras (HUANG et al. 2008). Graspflanzen sind weit verbreitet und bewachsen ca. 40,5 % der Landmasse der Erde. Um Umweltstandards einzuhalten, hat die Europäische Union existierende Graslandökosysteme unter Schutz gestellt (EUROPEAN-COMMISSION 2013). Darüber hinaus ist die industrielle Nachfrage an dieser Biomasse gesunken. Insgesamt entstehen jährlich ca. 8 t ha⁻¹ an Grasabfällen, die in alternativen, z. B. biotechnologischen, Prozessen verwertet werden könnten. Da in Zukunft mehr europäische Graslandregionen der gemäßigten Breiten unter Schutz gestellt werden sollen und gleichzeitig die benötigte Menge für die Milchkuhhaltung und Viehzucht (Hauptkonsumenten) voraussichtlich abnehmen wird, ist sogar noch von einer Zunahme der jährlichen Rohstoffmenge auszugehen (KAMM et al. 2007; MANDL 2010). Um die verderbliche Grasbiomasse zu konservieren, wurde sie seit Jahrhunderten siliert. In diesem Vorgang werden einfach zugängliche Kohlenhydrate durch anaerobe Bakterien zu kurzkettigen Carbonsäuren, hauptsächlich Essig und Milchsäure, vergoren. Die Säuren führen im nassen Rohmaterial dazu, dass der pH-Wert sinkt und dadurch das Wachstum von anderen Mikroben inhibiert wird. Die Silage ist damit lagerfähig und kann für weiterführende Prozesse verwendet werden. Durch den hohen Wasseranteil der Grassilage ist es möglich, eine Fest/Flüssig-Trennung durchzuführen. Die flüssige Phase, der Silagepresssaft (SPS), beinhaltet dabei die gelösten Stoffe und ist direkt für biotechnologische Anwendungen verfügbar. Der faserige Rest der Silage besteht zum größten Teil aus Lignocellulose und kann potenziell ebenfalls weiterverarbeitet werden (SCHWARZ et al. 2016; XIU & SHAHBAZI 2015). Im Konzept der Grünen Bioraffinerie können beide Rohstoffströme verwendet werden, um unterschiedliche Produkte herzustellen und so das größtmögliche Potential zu nutzen (ECKER et al. 2012; KAMM 2007; KROMUS et al. 2004; MANDL 2010).

Im Fokus dieser Arbeit steht die flüssige Phase der Silage – der Silagepresssaft (SPS). Generell unterscheidet sich die Zusammensetzung des SPS jedoch stark in Abhängigkeit von der Herkunft und Herstellungsmethode. Jedoch gibt es auch Anteile, die sich konstant verhalten. Die Kohlenhydratkonzentration z. B. variiert zwischen 6,8 g L⁻¹ (KROMUS et al. 2004) und 16,9 g L⁻¹ (THANG & NOVALIN 2008). Im Gegensatz dazu ist die Gesamt-Proteinkonzentration relativ stabil; sie schwankt lediglich zwischen 25 g L⁻¹ (ECKER et al. 2012) und 29 g L⁻¹ (KAMM et al. 2008; KROMUS et al. 2004). Milchsäure ist die vorherrschende Komponente im SPS mit einer Konzentration von 30,5 g L⁻¹ bis zu 37,5 g L⁻¹ (KAMM et al. 2008; THANG & NOVALIN 2008). Folglich liegt der pH-Wert

im sauren Bereich bei pH 4. SPS stellt eine sehr reichhaltige Ressource dar; er weist hohe Konzentrationen an verschiedenen organischen Säuren und Kohlenhydraten sowie Proteinen, Aminosäuren, Metallionen und Vitaminen auf. Vor diesem Hintergrund wurden einige Fermentationsversuche mit SPS durchgeführt, um Polyhydroxybutyrate (CERRONE et al. 2015) oder auch Ethanol daraus herzustellen (SIEKER et al. 2011). Gleichwohl bedeutet SPS als Ressource für traditionelle Fermentationsprozesse wegen seines niedrigen pH-Wertes und hohen Carbonsäuregehalts eine Herausforderung. Denn, wie bereits angesprochen, ist die Intention der Silierung, mikrobielles Wachstum zu inhibieren. Eine selektive Senkung der Säurekonzentration könnte es demnach ermöglichen, den SPS zu neutralisieren und somit besser für Fermentationen nutzbar zu machen. Um dieses Ziel zu erreichen, muss ein System entwickelt werden, das den pH-Wert erhöht, ohne dabei auf große Mengen an Base zurückzugreifen. Eine selektive physiochemische Entfernung von Milchsäure aus einer wässrigen Lösung ist aufwendig und deshalb nicht durchführbar. Als möglicher Ausweg bieten sich zellfreie Enzymkaskadenreaktionen an, bei denen Enzyme eingesetzt werden, die die selektive Umwandlung von organischen Säuren zu nichtsauren Verbindungen katalysieren. Anschließend kann der entstandene, neutralere SPS für Fermentationen eingesetzt werden. Dieser Prozess kann unter milden Reaktionsbedingungen ablaufen, um dabei die temperaturempfindlichen Inhaltsstoffe des SPS nicht zu beeinträchtigen. Lediglich die gewünschte Reaktionskaskade – die Neutralisierung von Carbonsäuren – würde stattfinden. Das Prinzip der zellfreien, enzymatischen Kaskadenreaktion wurde bereits erfolgreich in der Produktion von Biotreibstoffen, Elektrizität und hochwertigen Chemikalien eingesetzt. Eine detaillierte Beschreibung von zellfreien Enzymkaskaden sowie deren Vor- und Nachteilen befindet sich in Unterkapitel 1.2.3 (BEER et al. 2017; GUTERL & SIEBER 2013; HODGMAN & JEWETT 2012; JANDT et al. 2013; ZHANG 2010a).

Da im SPS Milchsäure mit durchschnittlich 30–37 mM mit Abstand die häufigste Säure darstellt, wurde die Reaktionskaskade daraufhin entwickelt. Essigsäure ist mit 2,0–6,1 mM deutlich niedriger konzentriert (ECKER et al. 2012; KAMM et al. 1997; KROMUS et al. 2004; THANG & NOVALIN 2008). Außerdem weist Milchsäure einen niedrigeren pKa-Wert (3,86) auf als Essigsäure (4,76) und hat damit einen größeren Einfluss auf den pH-Wert des SPS. Das System soll demnach Milchsäure selektiv zu einem neutralen Stoff umwandeln, der idealerweise selbst noch eine Wertsteigerung bewirkt.

Um dieses System zu entwickeln, sollten zwei Dinge beachtet werden: Zum einen muss der Reaktionsweg so kompakt wie möglich sein, zum anderen sollten keine Cofaktoren (z. B. NAD^+) zum Einsatz kommen. Cofaktoren und deren bei einem stöchiometrischen Ungleichgewicht innerhalb einer zellfreien Reaktionskaskade benötigte Regeneration (siehe 1.2.3.1) erhöhen die Komplexität signifikant und machen das System teuer und störanfällig.

Als mögliches Produkt kam Acetoin (3-Hydroxybutanon) in Frage. Dieses hat keinen Effekt auf den pH-Wert und kann in nur drei Reaktionsschritten aus Milchsäure gebildet werden. Die erste Reaktion, die Oxidation von Milchsäure zu Pyruvat, kann von zwei unterschiedlichen Enzymen katalysiert werden: Lactatdehydrogenase (LDH) oder Lactatoxidase (LOX). LDH ist ein häufig genutztes Enzym, das sehr gut beschrieben ist, jedoch NAD^+ als Cofaktor benötigt. Dieses muss entweder stöchiometrisch zugegeben werden oder es muss zusätzlich ein Regenerationssystem hinzugefügt werden. Hinzu kommt, dass Nikotinamidcofaktoren eine verringerte Stabilität unter nichtneutralen Bedingungen aufweisen (NOWAK et al. 2015). Im Gegensatz dazu benötigt LOX als Co-Substrat

molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Diese Reaktion ist FMN-abhängig und da dieses stark im Enzym gebunden ist, werden weder stöchiometrische Mengen noch ein Regenerationssystem benötigt. Der große Nachteil der LOX-katalysierten Reaktion liegt in der Entstehung von Wasserstoffperoxid. Dieses muss aus dem System entfernt werden, da es die Aktivität der Enzyme beeinflussen kann (FINNEGAN et al. 2010). Daher wurde in dem hier beschriebenen System Katalase verwendet, um die H_2O_2 -Problematik zu umgehen.

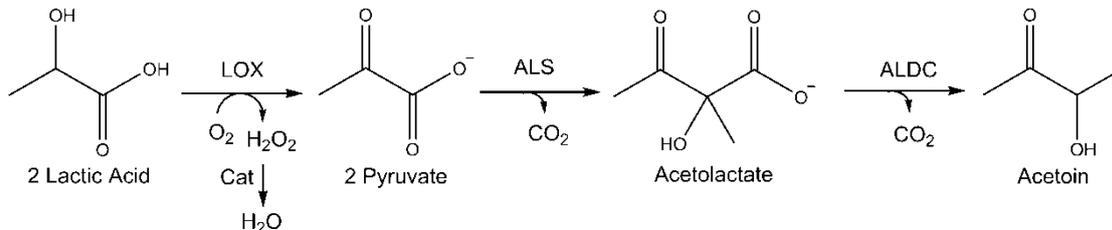


Abb. 4.10: Schematische Darstellung der entwickelten Reaktionskaskade; Milchsäure wird von Lactatoxidase (LOX) zu Pyruvat und H_2O_2 oxidiert; Katalase (Cat) reduziert H_2O_2 zu H_2O . Acetolactat-Synthase (ALS) synthetisiert aus Pyruvat Acetolactat. Acetolactat wird von Acetolactat-Decarboxylase (ALDC) zu Acetoin decarboxyliert.

Um die Reaktionskaskade ausgehend von Milchsäure zu Acetoin zu vervollständigen, werden noch zwei weitere Enzyme benötigt: Acetolactat-Synthase (ALS) und Acetolactat-Decarboxylase (ALDC) (Abb. 4.10). ALS verwendet Mg^{2+} und Thiamindiphosphat (TDP), um aus zwei Pyruvatmolekülen 2-Acetolactat zu bilden. Dieses wird anschließend von ALDC decarboxyliert (WIEGESHOFF & MARAHIEL 2007). ALDC selbst wird industriell sehr häufig eingesetzt, um zum Beispiel in Brauprozessen das Fehlaroma Diacetyl zu vermeiden (DULIEU et al. 2000; MARLOW et al. 2013).

Das Zielprodukt Acetoin hat in den letzten Jahren immer mehr Aufmerksamkeit erhalten, da es in einer Vielzahl von Anwendungen nicht nur als ungiftiger, natürlicher Aromastoff, sondern auch als Biokraftstoff und Kraftstoffzusatz oder als Vorstufe für Kunststoffe oder Epoxidharze eingesetzt werden kann (LIU et al. 2011; SUN et al. 2012; XIAO et al. 2007).

Die aus LOX, ALS und ALDC bestehende Kaskade ermöglicht es somit, aus 2 Mol Milchsäure 1 Mol Acetoin herzustellen. Dabei wird auf kostspielige Cofaktoren und deren Recyclingsysteme verzichtet und gleichzeitig wird das hochwertige Endprodukt Acetoin hergestellt. Die folgenden Methoden wurden entwickelt, um den reichhaltigen Silagepresssaft zugänglicher für die fermentative Nutzung zu machen und zeitgleich eine Wertschöpfung durch die Produktion von Acetoin zu betreiben.

4.2.2 Ergebnisse

4.2.2.1 Enzymauswahl und Charakterisierung

Lactatoxidase (LOX) und Katalase (Cat) sind kommerziell verfügbare Enzyme. Da zu LOX nur wenig beschreibende Literatur vorhanden war und eine eigenständige Suche nach möglichen Varianten sowie deren Expression zu viel Zeit in Anspruch genommen hätte, wurde auf die kommerzielle Variante zurückgegriffen. Laut Herstellerangaben besitzt dieses Enzym eine Aktivität von 20 U mg^{-1} (Sigma Aldrich Lot-Nummer: L0638). Cat aus Rinderleber ist ein hochaktives (10000 U mg^{-1}) und

kostengünstiges Enzym, das in großen Mengen erworben werden kann. Deshalb wurde in dieser Arbeit Cat aus Rinderleber verwendet (Sigma Aldrich Lot-Nummer: C40).

Acetolactat-Synthase (ALS) aus *Bacillus subtilis* wurde genutzt, da es bereits in vorherigen Arbeiten am Lehrstuhl verwendet wurde. Dieses Enzym hat seinen optimalen Aktivitätsbereich bei pH 6,0 und 40 °C (SOMMER et al. 2015), was den Bedingungen für die Acetoin synthese entspricht (vgl. Unterkapitel 3.4.1).

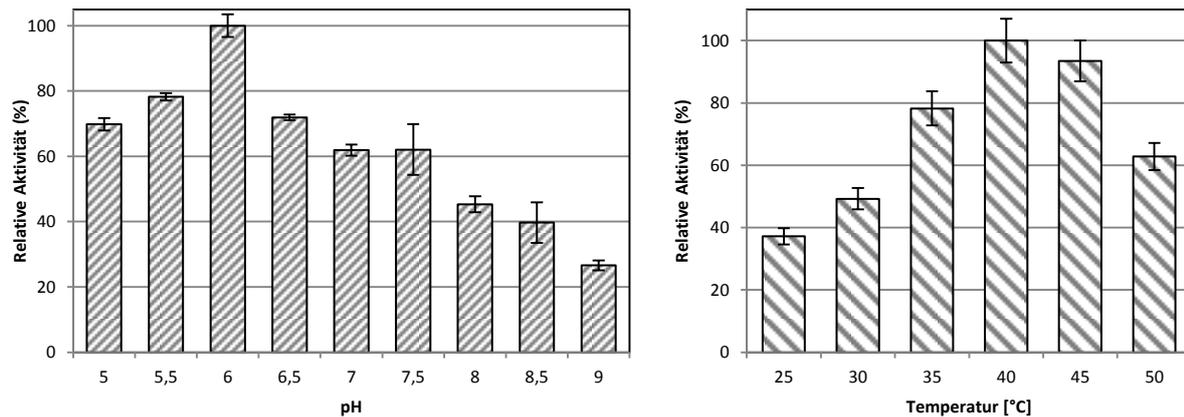


Abb. 4.11: Darstellung des pH- und Temperaturoptimums für Acetolactat-Decarboxylase (ALDC) aus *B. licheniformis*. Acetolactat wurde mit einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. Das pH-Optimum wurde mit MOPS-Puffer, pH 5-7, und Tris-Puffer, pH 7,5-9, ermittelt und das Temperaturoptimum wurde bei 100 mM MOPS pH 6,5 festgestellt.

Für Acetolactat-Decarboxylase wurden verschiedene Gene aus unterschiedlichen Organismen untersucht, und die entsprechende ALDC aus *B. licheniformis* konnte erfolgreich heterolog exprimiert werden. Die Charakterisierung zeigte eine Aktivität von $220 \pm 54 \text{ U mg}^{-1}$. Das pH- und Temperaturoptimum konnte bei 6 und 40 °C ermittelt werden. Die entsprechenden Daten sind in Abb. 4.12 dargestellt. Aufgrund dieser Eigenschaften sind dieses Enzym ideal für den Einsatz in der hier entwickelten Kaskade.

4.2.2.2 Bestimmung der Enzymzusammensetzung

Eines der Hauptziele für die Entwicklung von zellfreien Enzymkaskaden liegt in einem konstanten Reaktionsfluss. Eine Anreicherung von jeglichen Zwischenprodukten ist ungewollt und könnte zu unerwünschten Nebenreaktionen führen (YE et al. 2012). Es ist deshalb essenziell, dass sich das Enzym und die dazugehörige Reaktion in Bezug auf die Aktivität im Gleichgewicht befinden. Jaturapaktrarak et al. beschreiben hierfür eine Methode, die sie als Flussbestimmung (*Flux Analysis*) bezeichnen (JATURAPAKTRARAK et al. 2014).

Für die hier aufgeführten Studien wurde diese Methode angepasst, um die exakte Menge an Enzym zu bestimmen, die benötigt wird, um die Reaktion im Gleichgewicht zu halten. Mittels eines Reporterenzym war es möglich, die Kaskade an eine NADH-abhängige Reaktion zu koppeln. Dieses Enzym, eine Butandiol-Dehydrogenase (BDDH) aus *B. cereus*, verwendet Acetoin und NADH als Substrat und wandelt es in 2,3-Butandiol und NAD^+ um. Die NADH-Abnahme kann dann bei 340 nm

spektrophotometrisch beobachtet werden und die Geschwindigkeit der Abnahme wird als Maß für den Fluss durch das gesamte System herangezogen. Dies ermöglichte eine zügige Bestimmung der optimalen Enzymkonzentrationen, die benötigt werden, um einen konstanten und maximalen Fluss durch das System im optimalen Reaktionsgleichgewicht zu erhalten. Die Optimierung lief nach folgendem Prinzip ab: Die Enzymkonzentration eines Enzyms wird variiert, während die Konzentrationen aller anderen Enzyme konstant gehalten werden und der Fluss gemessen wird. Die Enzymkonzentration, bei der der höchste Fluss gemessen wurde, wird anschließend konstant eingesetzt, um die optimale Enzymkonzentration für die zweiten Enzyme der gesamten Kaskade zu bestimmen. Dies wird für jedes Enzym wiederholt, bis der höchstmögliche Fluss, also die höchstmögliche NADH-Abnahme, gemessen wird. Diese Analyse wurde mit einem Überschuss an BDDH durchgeführt. In Tab. 4.3 sind die jeweiligen Versuchsreihen aufgeführt und die Ergebnisse in Abb. 4.12 graphisch dargestellt. Eine Erhöhung der ALS-Konzentration von über 50 % konnte zwar keine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit erzielen, jedoch war es möglich, diese zu erhöhen, indem die ALDC-Konzentration angehoben wurde. Eine Verdoppelung der ALDC-Konzentration rief eine 79-prozentige Steigerung der gemessenen Reaktionsrate hervor. Eine weitere Erhöhung der ALDC-Konzentration konnte die Reaktionsrate indes nicht weiter steigern. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine 30-prozentige Senkung der ALS-Konzentration ohne einen nennenswerten Verlust an Gesamtaktivität blieb. Als optimal wurde ein Verhältnis von 1:0,6:1,8 LOX:ALS:ALDC bestimmt.

Tab. 4.3: Bestimmung der Enzymkonzentration für einen optimalen Stofffluss der Reaktionskaskade. Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und die Reaktionsrate wurde mittels der Abnahme an NADH bei 340 nm bestimmt

Eingesetzte Enzymkonzentration [U mL ⁻¹]					Gemessene Reaktionsrate	
LOX	ALS	ALDC	CAT	BDDH	mM min ⁻¹	SD
1	0,9	0,9	50	5,9	0,0486	0,0035
1	1,2	0,9	50	5,9	0,0473	0,0047
1	1,5	0,9	50	5,9	0,0487	0,0034
1	0,9	1,2	50	5,9	0,0686	0,0028
1	0,9	1,5	50	5,9	0,0765	0,0032
1	0,9	1,8	50	5,9	0,0868	0,0043
1	0,9	2,5	50	5,9	0,0872	0,0045
1	0,6	1,8	50	5,9	0,0896	0,0063
1	0,3	1,8	50	5,9	0,0722	0,0050

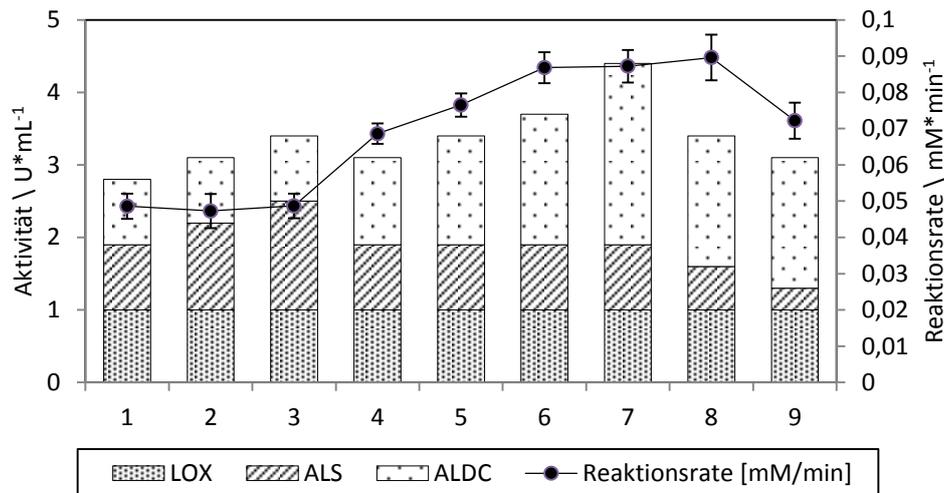


Abb. 4.12: Graphische Darstellung der Flussbestimmung mit unterschiedlichen Konzentrationen an ALS und ALDC und konstanter Konzentration an LOX. Zusätzlich ist die Reaktionsrate in $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$ dargestellt.

4.2.2.3 Reine Milchsäure als Substrat zur Produktion von Acetoin

Das System wurde auf ein Reaktionsvolumen von 30 mL vergrößert, um eine optimale Belüftung und Titration zu ermöglichen. Die Titrations wurden mit 0,1 M HCl durchgeführt und 10 U LOX, 5,9 U ALS und 18,3 U ALDC wurden als Enzymmenge eingesetzt. Diese Konzentrationen sind das Resultat der Flussanalyse des vorherigen Abschnitts. Um ein schnelles Entfernen von Wasserstoffperoxid zu ermöglichen, wurden 1000 U CAT zugegeben. Mit diesem Versuchsaufbau wurden 10 % der zugegebenen Milchsäure in Acetoin umgewandelt und die Reaktion kam bereits nach 15 min zum Erliegen. Durch das Verdoppeln der Enzymkonzentrationen auf 20 U LOX, 11,8 ALS, 36,6 ALDC und 1000 CAT konnten Erkenntnisse über die Stabilität der Enzyme unter den Reaktionsbedingungen gewonnen werden. Durch die Erhöhung der Enzymkonzentration konnten 25 % der Milchsäure in Acetoin umgewandelt werden und die Prozessstabilität wurde auf 30 min erhöht.

Bemerkenswerterweise wurde bei diesen Versuchen 2,3 mM bzw. 4,7 mM Essigsäure gebildet. Dies ist wahrscheinlich auf eine unvollständige Reduktion des Wasserstoffperoxids zurückzuführen. Es ist bekannt, dass H_2O_2 α -Keto-Säuren decarboxylieren kann und im Fall von Pyruvat entstehen dadurch die gemessene Essigsäure sowie CO_2 und Wasser (LOPALCO et al. 2016). Liegt zu viel Wasserstoffperoxid vor, wirkt sich dies außerdem auch auf die Enzymstabilität aus. Die hinzugegebene Menge an CAT war anscheinend zu gering, um das anfallende H_2O_2 vollständig zu reduzieren. In einem weiteren Versuch wurde die eingesetzte CAT-Aktivität verzehnfacht. CAT ist kostengünstig und kann in großen Mengen zugegeben werden, da sie über eine sehr hohe spezifische Aktivität von $10.000 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ verfügt. Dies ermöglichte eine sehr niedrige H_2O_2 -Konzentration während des gesamten Prozesses, was sich in einer Erhöhung der Enzymstabilität und einer verminderten Bildung von Essigsäure widerspiegelt.

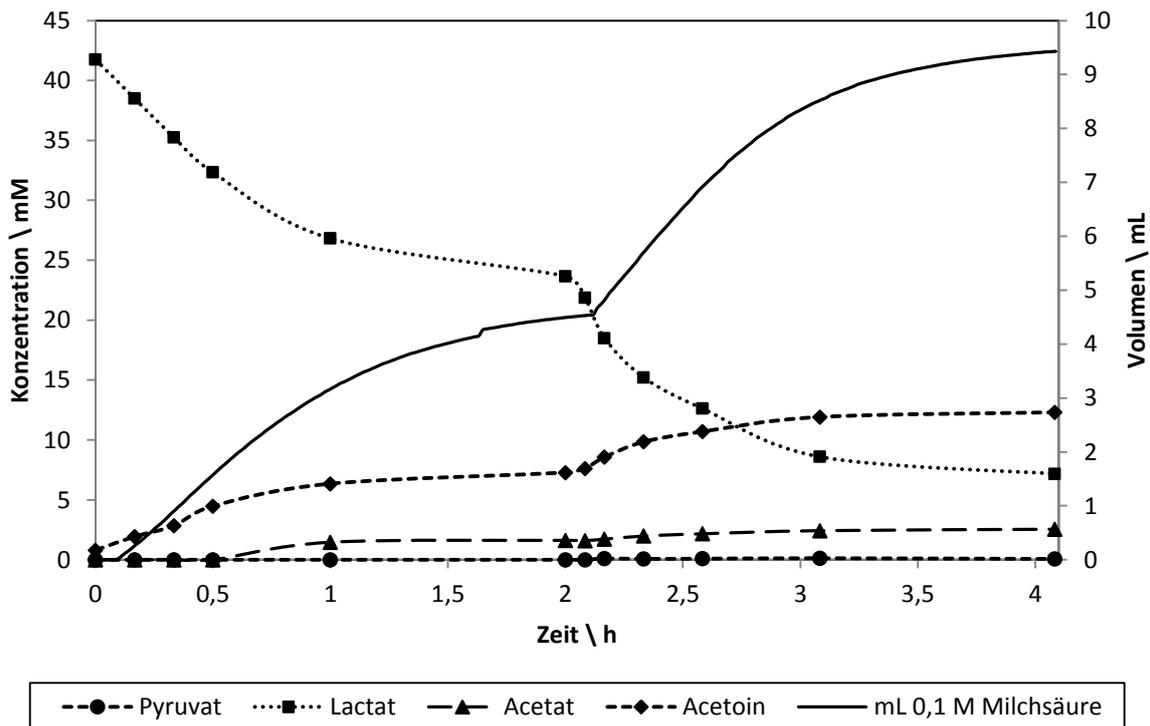


Abb. 4.13: Produktion von Acetoin aus Milchsäure mittels einer dreistufigen enzymatischen Reaktionskaskade. Alle Komponenten waren in Lösung und die Reaktion wurde bei 40 °C und konstantem pH von 6,5 durchgeführt. Die eingesetzte Enzymaktivität betrug 30 U LOX, 17,86 U ALS, 55 U ALDC, 10000 U CAT. Nach 2,08 h wurde frisches Enzym in gleicher Menge hinzugefügt.

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen wurde ein Prozess mit den folgenden Enzymmengen aufgesetzt: 30 U LOX, 18 U ALS, 55 U ALDC und 10.000 U CAT. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.13 dargestellt und lassen einen linearen Abfall der Milchsäurekonzentration innerhalb der ersten 30 min erkennen. Die Zugabe von Salzsäure hängt direkt mit der Konversion des Substrates zusammen, da durch den Verbrauch der Milchsäure der pH-Wert ansteigt. Die Titrationskurve zeigt, dass bei diesem Experiment nach ca. 1 h eine Verlangsamung der Milchsäure-Konversion eintritt. Nach insgesamt 2 h kommt es zu einem kompletten Verlust der Enzymaktivität. Die Zugabe von zusätzlichem, frischem Enzym nach 2 h konnte ein sofortiges Wiedereinsetzen der Titration auslösen. Während der ersten 2 h wurden 38 % der Milchsäure umgesetzt. Die zweite Zugabe von Enzym führte zu einer insgesamt Ausbeute von 74 %. Daraus kann geschlossen werden, dass der Hauptgrund für die Verlangsamung der Konversionsrate nach 30 min und den kompletten Stillstand der Reaktion nach 2 h im Verlust der Enzymaktivität liegt. Da LOX Sauerstoff für ihre katalytische Aktivität benötigt, wurden, um Sauerstofflimitationen zu vermeiden, 100 % Sauerstoff mit einer Flussrate von 10 mL min⁻¹ durch die Reaktionslösung gepumpt. Diese Begasung führte dazu, dass das Protein in der Lösung präzipitierte. Es wurden unterschiedliche Versuche unternommen, um das Problem des Systems mit gelöstem Enzym zu beheben, allerdings ohne Erfolg. Eine Verringerung der Begasungsrate war aus technischen Gründen nicht möglich. Ebenso war es nicht möglich, die Bläschengröße zu verringern und damit eine Oberflächendenaturierung zu verhindern. Um die Enzyme für diesen Versuchsaufbau zu stabilisieren, wurde deshalb eine Immobilisierung der gesamten Kaskade vorgenommen.

4.2.2.4 Immobilisierung der Reaktionskaskade

Eine Immobilisierung der gesamten Kaskade schien unter den gegebenen Bedingungen eine Möglichkeit darzustellen, um das System zu stabilisieren und robuster zu machen. Dabei wurden zwei Methoden ausgewählt und verglichen: Enzymquervernetzung und Verkapselung in Alginatkügelchen. Die Enzymquervernetzung basiert auf der Reaktivität von primären Aminen auf der Oberfläche der Proteine. Diese funktionellen Gruppen, hauptsächlich Lysinreste, werden mittels Glutaraldehyd quervernetzt (SCISM & BACHMANN 2010). Während dieses Prozesses fügen sich die Enzyme zu kleinen Partikeln zusammen und können anschließend als heterogener Katalysator verwendet werden.

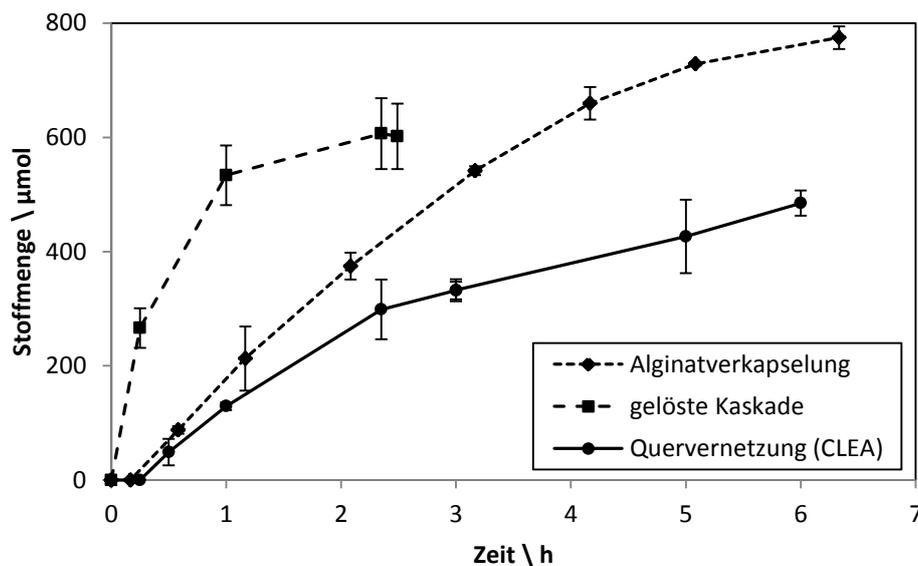


Abb. 4.14: Vergleich zwischen der gelösten Enzymkaskade (■) und zweier Immobilisierungstechniken, der Quervernetzung (●) und der Alginatverkapselung (◆). Mit diesen Techniken wurde versucht, einen stabileren Prozess zu etablieren. Alle Ergebnisse sind auf μmol Acetoin normalisiert.

Es wurde angenommen, dass die große Oberfläche, die durch die Sauerstoffblasen entsteht, sowie die sehr hohe Sauerstoffkonzentration in unmittelbarer Nähe der Bläschen ausschlaggebend für die Denaturierung der Proteine sind. Die Verkapselung wurde daher als Immobilisierungsmethode gewählt, um die Enzyme vor dem direkten physiochemischen Einfluss der Sauerstoffbläschen zu schützen. Der wesentliche Nachteil dieser Methode besteht gleichwohl in der Einführung einer Diffusionsbarriere für Substrate und Intermediate. Die Arbeiten von Haider und Husain (2007) wurden angewandt, um den Nutzen dieser Methode zu testen (HAIDER & HUSAIN 2007). Es handelt sich dabei um eine häufig beschriebene Alginat-Einschlussmethode. Abb. 4.14 vergleicht immobilisierte Enzymkaskaden mit einer Kaskadenreaktion, bei der gelöste Enzyme eingesetzt wurden. Es ist deutlich zu sehen, dass die Aktivität der Enzyme in Lösung nach 2 h vollständig zum Erliegen gekommen ist, wohingegen die immobilisierten Kaskaden nach 6 h eine – wenn auch verminderte – Aktivität aufweisen. Um die unterschiedlichen Datenreihen in Abb. 4.14 vergleichen zu können, wurden alle Messwerte auf die Gesamt-Acetoinproduktion in μmol normalisiert, da sich das Gesamtvolumen im Verlauf der einzelnen Experimente durch die Titration mit Säure ändert und somit Konzentrationsangaben nicht vergleichbare Aussagen liefern. Schlussendlich hat sich das

Alginateinschlussverfahren als Methode durchgesetzt – nicht nur, weil es die höchsten Aktivitäten und Konversionsraten im Vergleich zur Quervernetzungsmethode gezeigt hat, sondern auch aus praktischen Gründen. Die Quervernetzungsmethode wies große Nachteile in der Vorbereitung und Anwendung auf. So dauerte es mindestens 4 h, um eine einsatzbereite Charge an immobilisiertem Enzym herzustellen. Hinzu kam, dass es kompliziert war, den Katalysator im Reaktionsgefäß gleichmäßig zu verteilen. Im Speziellen entstanden während der Kaskadenreaktion Verklumpungen, die sich an den Reaktorwänden anlagerten, was den gesamten Prozess fehleranfällig und unzuverlässig werden ließ.

Im Gegensatz dazu konnte die Vorbereitungszeit für die Verkapselung auf 2 h reduziert werden und die Handhabung der Kügelchen war einfach und reproduzierbar. Zusätzlich ist eine Abtrennung aus der Reaktionslösung leicht möglich. Es wurde festgestellt, dass sich niederviskoses Alginat für diese Reaktionsbedingungen am besten eignet. Alginat mit höherer Viskosität löste sich kurze Zeit nach Zugabe in den Reaktor wieder auf. Der größte und schwerwiegendste Nachteil der Verkapselung liegt gleichwohl in der zusätzlichen Diffusionsbarriere. Frühere Publikationen weisen darauf hin, dass Kugelgrößen von 2 mm Durchmesser am effektivsten sind. Noch kleinere Größen haben weniger Einfluss auf die Sauerstoffaufnahme, sind jedoch deutlich zeitaufwendiger in der Herstellung (CHEN & HUANG 1988). Der zweite Parameter, der sich auf die Diffusion auswirkt, ist die Alginatkonzentration. Je höher die Konzentration ist, desto stabiler sind die Kügelchen. Allerdings sinkt die Diffusionsrate. Als optimal hat sich eine 4%-Alginatkonzentration herausgestellt. Niedrigere Konzentrationen lösten sich während des Prozesses auf, wohingegen höhere weniger effizient waren.

4.2.2.5 Kontinuierliche Produktion von Acetoin mittels einer verkapselten enzymatischen Reaktionskaskade

Um zu testen, ob es möglich ist, SPS kontinuierlich mittels einer enzymatischen Reaktionskaskade zu neutralisieren und gleichzeitig Acetoin zu produzieren, wurde ein Substratfluss an das System angelegt, der mit Milchsäure als Titriermittel betrieben wurde. Dies garantierte zum einen einen konstanten pH-Wert und zum anderen gleichzeitig die Zuführung von neuem Substrat. Als definierte Substratlösung wurde 0,5 M Milchsäure gewählt. In Abb. 4.15 ist ein Gesamtüberblick des Prozesses dargestellt. Die Titration gilt als Indikator für die Aktivität der Kaskade. Nach ca. 30 min erreichte die Acetoinkonzentration ein detektierbares Niveau. Während der nächsten 5 h stieg die Produktkonzentration kontinuierlich an.

Da die Reaktion durch Milchsäure titriert wurde, blieb die Konzentration konstant. Während der 6 h Reaktionszeit wurden 91 % der zugegebenen Milchsäure zu Acetoin konvertiert. Pyruvat erreichte ein Maximum bei 4,5 mM nach ca. 2 h und sank danach auf 2,7 mM ab. Dieses Verhalten kann durch die Reaktivität mit Wasserstoffperoxid erklärt werden, da die Nebenreaktion mit H_2O_2 , wie bereits beschrieben, zur Bildung von Essigsäure (Asmus et al., 2015) führt. Es konnten Essigsäurekonzentrationen von bis zu 3,6 mM an verschiedenen Zeitpunkten gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurden keine detektierbaren Mengen an H_2O_2 festgestellt. Nur bei Experimenten, bei denen CAT bewusst weggelassen wurde, konnten signifikante Mengen gemessen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Reaktion zwischen H_2O_2 und Pyruvat bereits in den Enzymkügelchen abläuft und CAT dieses nicht direkt reduzieren kann.

Es ist möglich, eine Massenbilanz über alle messbaren Intermediate zu erstellen, die Aufschluss darüber gibt, wieviel Substrat während der Reaktion verloren gegangen ist. Nach 6 h konnten 94 % des verwendeten Substrates in entweder Produkt oder Intermediaten wiedergefunden werden. Dabei gingen lediglich 6 % des eingesetzten Substrats durch undefinierte Nebenreaktionen verloren.

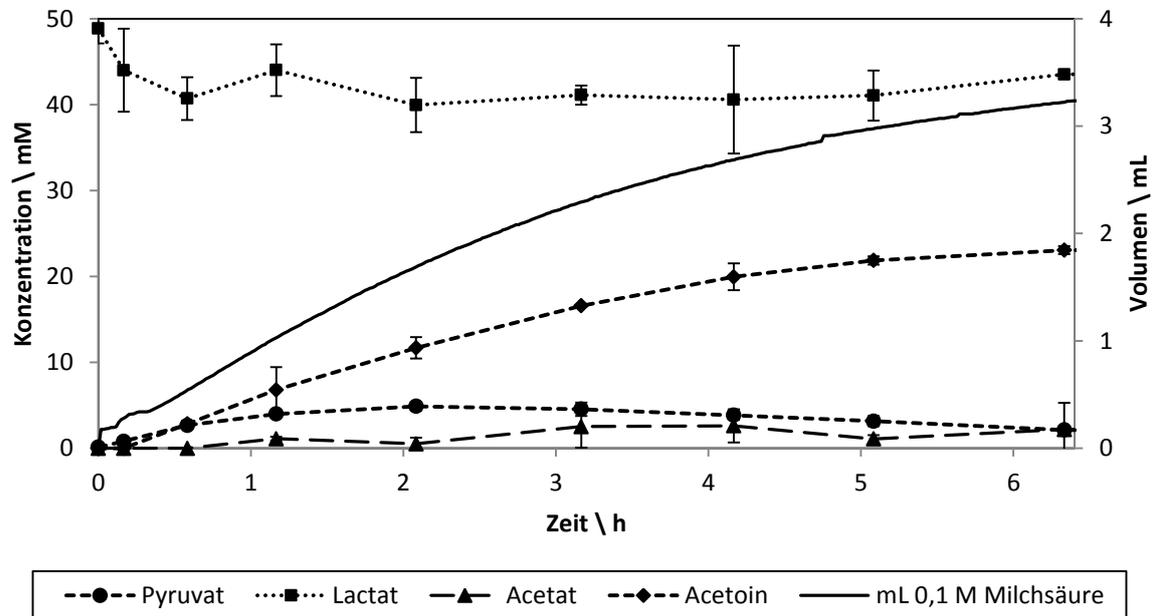


Abb. 4.15: Produktion von Acetoin mittels einer immobilisierten enzymatischen Reaktionskaskade und 0,5 M Milchsäure als Titriermittel. Alle Enzyme waren in einem 4-prozentigen Ca-Alginatpolymer eingeschlossen. Die Reaktion wurde bei 40 °C und einem konstanten pH-Wert von 6,5 betrieben.

Da in diesem Reaktionsaufbau kein Vollumsatz erreicht werden konnte, wurde die Ausbeute mittels der Menge an zugegebener Milchsäure und der produzierten Menge an Acetoin ermittelt. Während der Reaktionszeit von 6 h wurden 91 % der zugegebenen Milchsäure zu Acetoin konvertiert. In Bezug auf die gesamte Substratmenge innerhalb des Reaktors, die initiale Menge und die zu titrierende Menge konnte eine Ausbeute von 47,9 % berechnet werden. Die finale Acetoinkonzentration betrug 24,4 mM von möglichen 50,8 mM und die Produktbildungsrate lag bei 7,43 mM Acetoin während der ersten Stunde. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass es möglich ist, stabil und kontinuierlich Acetoin mittels einer immobilisierten, zellfreien, enzymatischen Reaktionskaskade aus Milchsäure zu produzieren. Zwar haben vernachlässigbare Nebenreaktionen stattgefunden, dennoch konnte gezeigt werden, dass die Reaktion dank der Immobilisierung der Enzyme innerhalb des Ca-Alginatpolymers unempfindlicher gegenüber der Begasung mit Sauerstoff war.

4.2.2.6 Milchsäure aus Silagepresssaft als Substrat für die Produktion von Acetoin

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorherigen Experimente mit kontinuierlicher Milchsäurezugabe wurden kontinuierliche Versuche mit SPS entwickelt und durchgeführt. Hierfür wurde SPS von einem Hof aus der Oberpfalz (Bayern, Deutschland) nach der Anleitung von Schwarz et al. 2016 frisch hergestellt. Es konnten $0,53 \text{ L kg}^{-1}$ Presssaft aus der Grassilage gewonnen werden. Die Dichte betrug $1,05 \text{ g mL}^{-1}$, die Trockenmasse betrug 12,2 % und der pH lag bei 4,3 (SCHWARZ et al. 2016). Die

häufigste Komponente war Milchsäure mit einer durchschnittlichen Konzentration von $35,3 \text{ g L}^{-1}$. Proteine und wasserlösliche Kohlenhydrate folgten mit jeweils $30,3$ und $28,5 \text{ g L}^{-1}$. Essigsäure wurde auf $10,0 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt. Hinzu kamen verschiedene Metallionen wie Kalium, Calcium oder Natrium in unterschiedlichen Konzentrationen. Eine komplette Auflistung anhand der prozentualen Verteilung ist in Anhang 3 zu finden.

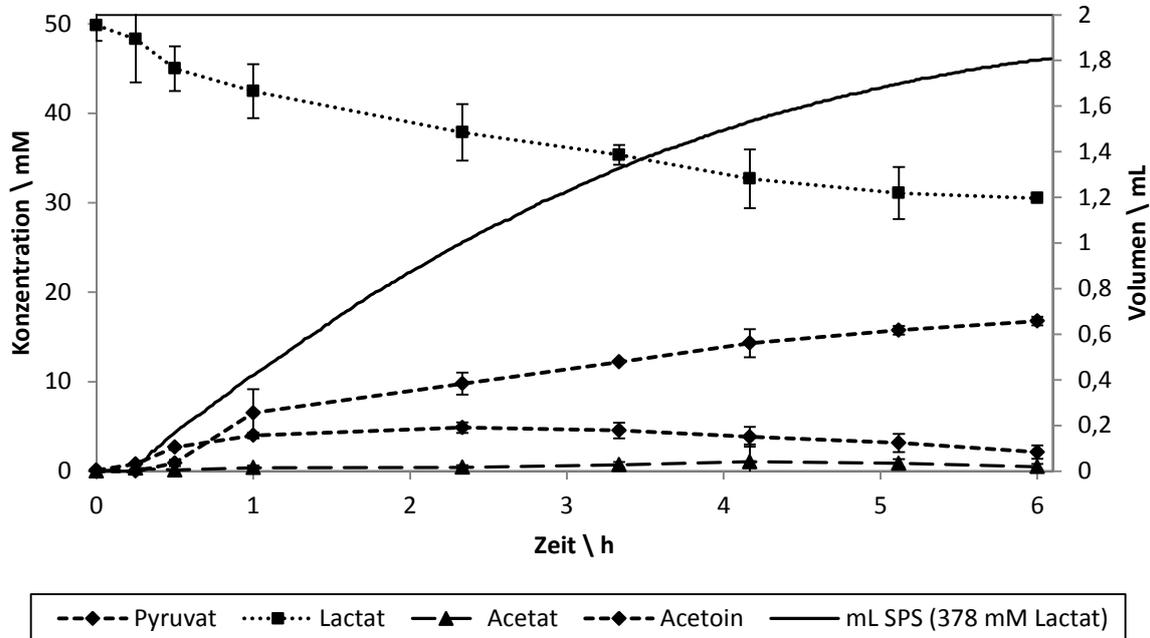


Abb. 4.16: Acetoinproduktion aus Milchsäure mittels der in Ca-Alginat immobilisierten Enzymkaskade. Als Titriermittel wurde unverdünnter SPS verwendet. Alle Enzyme waren in einem vierprozentigen Ca-Alginatpolymer eingeschlossen und die Reaktion wurde bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ bei einem konstanten pH-Wert von 6,5 betrieben.

Die Verwendung von SPS als Milchsäurequelle zur zellfreien Produktion von Acetoin lässt eine verringerte Aktivität der Enzyme vermuten, da sich die Vielzahl an unterschiedlichen Komponenten im SPS negativ auf die Aktivität der verwendeten Enzyme auswirken könnte. Das erste Experiment wurde daher wie folgt aufgesetzt: 50 mM Milchsäure wurde unter den Standardbedingungen (siehe Unterkapitel 3.4.1) angesetzt und das System wurde mit unverdünntem SPS (378 mM Milchsäure) titriert. Abb. 4.16 veranschaulicht, dass die zellfreie Reaktionskaskade tatsächlich Milchsäure aus SPS zu Acetoin umsetzen kann. Die Reaktion war 6 h aktiv. $1,8 \text{ mL}$ SPS wurde bis zum Ende hinzugegeben. Innerhalb der ersten Stunde konnte eine Produktionsrate von $6,5 \text{ mM Acetoin h}^{-1}$ ($0,57 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) erreicht werden und die Endkonzentration betrug $16,8 \text{ mM Acetoin}$. Dieses Ergebnis hat dieselbe Größenordnung wie die Ergebnisse der Experimente mit purer Milchsäure. Die Mengen der Essigsäure, die in Abb. 4.16 dargestellt sind, wurden um die durch den SPS zugegebene Menge an Essigsäure korrigiert. Somit sind nur Essigsäurekonzentrationen angegeben, die durch die Reaktion entstanden sind. Dies ist ebenso der Fall in Bezug auf die Milchsäurekonzentration. Diese nimmt über den Verlauf der Reaktion ab, anstatt konstant zu bleiben (zum Vergleich siehe Abb. 4.15). Durch die Titration mit SPS wurde Essigsäure angereichert, demnach ist die Senkung des pH-Wertes nicht ausschließlich auf Milchsäure zurückzuführen. Die gesamte Ausbeute der Konversion beläuft sich auf

49 % und liegt ebenso in derselben Größenordnung wie mit den Ergebnissen bezüglich purer Milchsäure (siehe oben). Dies trifft auch auf den Konzentrationsverlauf von Pyruvat (Abb. 4.15, Abb. 4.16) zu. Bei der Berechnung der Massenbilanz der Ergebnisse konnten 95 % des eingesetzten Substrats in Intermediaten der Kaskade wiedergefunden werden. Nur 5 % konnten nicht bilanziert werden. Diese Experimente zeigen, dass sich SPS als Titrationsagenz verwenden lässt und eine zellfreie Reaktionskaskade damit bis zu 6 h betrieben werden kann. Der nächste Schritt waren Experimente, bei denen 100 % der verwendeten Milchsäure aus SPS stammen. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in Abb. 4.17 dargestellt.

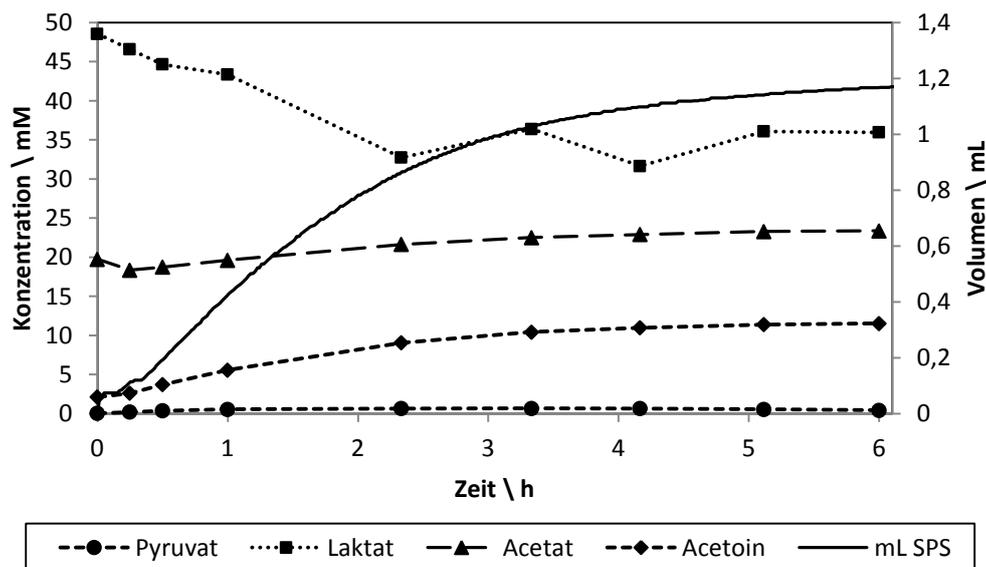


Abb. 4.17: Enzymatische Produktion von Acetoin aus Milchsäure, die ausschließlich aus SPS bereitgestellt wird. Als Titriermittel wurde unverdünnter SPS verwendet. Alle Enzyme waren in einem vierprozentigen Ca-Alginatpolymer eingeschlossen und die Reaktion wurde bei 40 °C bei einem konstanten pH-Wert von 6,5 betrieben.

Der Aufbau ähnelt den vorangegangenen Ansätzen. SPS wurde auf eine Konzentration von 50 mM Milchsäure verdünnt. Daraus folgt eine Essigsäurestartkonzentration von 21,1 mM. Die Reaktion wurde mittels unverdünntem SPS titriert. Bereits zum Zeitpunkt t_0 , was einer Messung direkt nach Zugabe der Enzympräparation entspricht, konnte eine Acetoin-Konzentration von 2,13 mM gemessen werden. Darüber hinaus konnte belegt werden, dass der Umsatz von Milchsäure aus SPS als Substratquelle möglich ist. Die Berechnung der Massenbilanz zeigt, dass nur wenig Substrat während des Prozesses verloren geht. 93 % der eingesetzten Milchsäure konnte in Komponenten mit Bezug zur Kaskade wiedergefunden werden. Mit einer Maximalkonzentration von 0,6 mM nach 30 min war Pyruvat deutlich geringer vorhanden als bei Reaktionsansätzen, die mit purer Milchsäure betrieben wurden. Dort konnten Werte von bis zu 4,5 mM gemessen werden. Hinzu kommt, dass sich ein Pyruvat-*Steady-State* über den gesamten Reaktionsverlauf bei einer Konzentration von 0,5 mM einstellt, der unter dem Niveau vorheriger Experimente liegt (3 mM; Abb. 4.15). Im Vergleich der Reaktionsraten zwischen purer Milchsäure und Milchsäure aus SPS als Substrat konnte lediglich eine 17-prozentige Reduktion festgestellt werden. Jedoch war die Zeit, in der die Kaskade aktiv war,

kürzer. Bereits nach 4 h konnte kein weiterer signifikanter Anstieg an Acetoin festgestellt werden (siehe Abb. 4.17). Die Acetoin-Endkonzentration belief sich auf 11,5 mM und die Ausbeute lag bei 37 %.

Eine visuelle Untersuchung der Alginatkügelchen offenbarte, dass diese die dunkelbraune Farbe des Silagepresssaftes angenommen hatten. Obwohl der SPS filtriert und zweifach zentrifugiert wurde, blieben einige Teilchen in der flüssigen Phase zurück. Diese lagerten sich an den Alginatkügelchen an und sorgten für die Farbveränderung. Die Anlagerung könnte dafür verantwortlich sein, dass die Poren der Kügelchen verstopft wurden, wodurch die Diffusionsraten nach innen und außen zusätzlich reduziert wurden. Die Verstopfung und die daraus folgende reduzierte Diffusion könnten demnach der Grund für die reduzierte Reaktionsrate, Ausbeute, Laufzeit und Pyruvatkonzentration sein. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die immobilisierten Enzyme durch anorganische oder organische Komponenten des SPS inhibiert wurden. Da es allerdings schwierig ist, zwischen den physikalischen, chemischen und enzymatischen Einflüssen des SPS zu unterscheiden, müssen detailliertere Charakterisierungen durchgeführt werden.

4.2.2.7 Wirtschaftliche Einschätzung

Ziel der hier entwickelten Reaktionskaskade ist deren Einsatz in einer Bioraffinerie. Dort soll sie dazu beitragen, dass die natürliche Ressource Grasssilage komplett verwertet werden kann (ECKER et al. 2012; KAMM et al. 2008; SCHWARZ et al. 2016). Eine immobilisierte enzymatische Reaktionskaskade erweist sich in der hier entwickelten Form als einfach in der Handhabung. Sie kann mit wenig Aufwand zur Reaktionslösung hinzugefügt und entfernt werden. Hinzu kommt, dass kein zusätzlicher Cofaktor benötigt wird, was ein Upscaling vereinfacht.

Ein großes Hindernis bei der Integration einer enzymatischen Reaktion in einen technischen Prozess stellen die hohen Enzymkosten dar. Eine eindeutige Kostenanalyse der Enzyme ist zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, da nicht alle verwendeten Enzyme kommerziell erhältlich sind. Die aktuellen Preise für ALDC und CAT sind vergleichsweise niedrig, da sie bereit großtechnisch produziert werden und in industriellen Prozessen zum Einsatz kommen. Die ALDC-Kosten belaufen sich auf 0,16 € g⁻¹ Enzym mit einer Aktivität von 2 U mg⁻¹ (Murphy and Sun Limited, Nottingham UK, Brewhouse Enzymes, 2017). Die CAT-Kosten befinden sich bei 0,1 € g⁻¹ bei einer Enzymaktivität von >50000 U mg⁻¹ (Xian Nutragreenlife Biotechnology). Dies zeigt, dass Enzymkosten niedrig sein können, sobald der Produktionsmaßstab steigt.

Um das System der zellfreien Enzymreaktion zur Produktion von Acetoin aus Milchsäure erfolgreich zu implementieren, müssen zuallererst die Prozessstabilität und Ausbeute erhöht werden. Nur so ist eine ökonomische Anwendung möglich.

4.3 Charakterisierung und Kristallisation von Butandiol-Dehydrogenasen

4.3.1 Einleitung

Die große Vielzahl an möglichen Einsatzgebieten lässt 2,3-Butandiol (BDL) zu einem sehr interessanten Produkt werden – gerade im Hinblick auf die Produktion innerhalb einer Bioraffinerie (siehe dazu Unterkapitel 1.1.2). Das industrielle Anwendungsspektrum von BDL reicht von Biokraftstoff und Kraftstoffzusatz über synthetischen Gummi bis hin zu Vorstufen von pharmazeutischen Wirkstoffen (JI et al. 2011). Die fermentative Herstellung aus nachwachsenden Rohstoffen ermöglicht eine Integration in Bioraffinerieprozesse, die wiederum das Produktspektrum der Raffinerie erhöht (KAMM & KAMM 2004). Diese Kombination ist ideal und macht BDL zu einer Chemikalie mit großem Potential für die industrielle Biotechnologie.

Erste Berichte über die Produktion von BDL wurden bereits 1906 von Harden und Walpole in Bezug auf die Fermentation von *Enterobacter aerogenes* verfasst und beschrieben. 20 Jahre später konnten Donker et al. mittels einer *Bacillus-polymyxa*-Fermentation ebenso das Diol herstellen (REHM 2013). Vorschläge für eine industrielle Produktion wurden dann von Fulmer 1933 formuliert (FULMER et al. 1933). Während des Zweiten Weltkrieges erhielt die Produktion von BDL besondere Aufmerksamkeit, da daraus 1,3-Butadien hergestellt werden konnte, das für synthetischen Gummi benötigt wurde. Letztendlich hatte die fermentative Produktion von BDL trotz zufriedenstellender Effektivität indes keine Zukunft, da sie durch alternative und kostengünstigere, erdölbasierte Prozesse verdrängt wurde. In Zeiten sich verknappender Ressourcen rückt BDL gleichwohl wieder stärker ins Zentrum der industriellen Aufmerksamkeit, gerade weil die Anwendungsmöglichkeiten sehr groß sind und eine Herstellung aus nachwachsenden Rohstoffen möglich ist (CELIŃSKA & GRAJEK 2009).

2,3-Butandiol besitzt ein Molekulargewicht von $90,1 \text{ g mol}^{-1}$ und kann in drei verschiedenen Stereoisomeren vorkommen, dem (R,R)-2,3-Butandiol, (S,S)-2,3-Butandiol sowie meso-2,3-Butandiol (Abb. 4.18). Welches Isomer gebildet wird, hängt von dem jeweiligen Mikroorganismus und den dort exprimierten Butandiol-Dehydrogenasen (BDDH) ab.

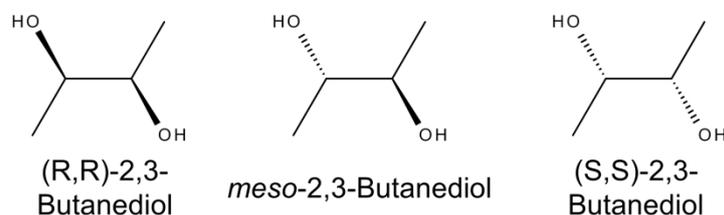


Abb. 4.18 Unterschiedliche Stereoisomere von 2,3-Butandiol.

Der Stoffwechselweg zur Bildung von BDL beginnt mit der Synthese von Acetolactat aus zwei Molekülen Pyruvat, katalysiert von einer Acetolactat-Synthase (ALS). Dieses wird anschließend von einer Acetolactat-Decarboxylase (ALDC) decarboxyliert und es entsteht Acetoin, das unter NADH-Verbrauch von einer BDDH zu BDL reduziert wird. Dieser Butanoat-Stoffwechselweg findet sich in

einigen Mikroorganismen wieder, darunter die Spezies *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* und *Serratia* (MADDOX 1996). Tab. 4.4 enthält einen Überblick über BDL-produzierende Stämme. Der Butanoat-Stoffwechselweg ist Teil der gemischten Säuregärung und der dazugehörigen Enzyme. Die biologische Funktion von BDL ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass BDL gebildet wird, um eine Übersäuerung der Zelle zu verhindern, da das Diol neutral ist und so als Protonenspeicher dienen könnte (BLOMQVIST et al. 1993; NAKASHIMADA et al. 2000). Des Weiteren wird angenommen, dass die Bildung von BDL regulierend auf die NAD⁺/NADH-Bilanz wirkt oder aber auch lediglich als Kohlenstoff/Energiespeicher fungiert (XIAO & XU 2007).

Tab. 4.4: Mikroorganismen, die 2,3-Butandiol in signifikanter Menge bilden können (CELIŃSKA & GRAJEK 2009; Ji et al. 2011; MADDOX 1996)

Stamm	2,3-BDL Isomer (ungefähres Verhältnis)	Referenz
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso/ s,s (1/1)	(Li et al. 2010; MA et al. 2009)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso/ s,s (9/1)	(Ji et al. 2009; Ji et al. 2010)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	meso/ s,s (9/1)	(ZENG et al. 1990)
<i>Serratia marcescens</i>	meso	(ZHANG et al. 2010)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	R,R	(GAO et al. 2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	R,R/ meso (3/2)	(MOES et al. 1985)
<i>Bacillus licheniformis</i>	R,R/ meso (1/1)	(NILEGAONKAR et al. 1992)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	R,R/ meso (1/1)	(ALAM et al. 1990)

Wie alle Alkoholdehydrogenasen (ADH) werden auch die BDDHs in unterschiedliche Superfamilien eingeteilt. S,S- und meso-BDDHs gehören zu den *short-chain*-Reduktasen/Alkoholdehydrogenasen (SDR), wohingegen R,R-BDDHs zu den *medium-chain*-Reduktasen/Alkoholdehydrogenasen (MDR) gezählt werden. Diese Unterscheidung in Superfamilien hat sich aus einem geschichtlichen Hintergrund entwickelt und ist nicht immer eindeutig, weshalb sie unter Umständen für Verwirrung sorgen kann. Einerseits beruht sie auf der Länge der Aminosäuresequenz; MDR haben eine Kettenlänge von ~350 AS, wohingegen SDR eine Länge von ~250 AS besitzen. Des Weiteren haben viele MDRs Metalle wie Zink in ihren katalytischen Zentren gebunden, wohingegen die Aktivität von SDRs im Allgemeinen als metallfrei beschrieben wird. Gemeinsamkeiten wie die Cofaktorbindestelle können jedoch in ADHs über viele Millionen Jahre zurückverfolgt werden, was den Schluss nahe legt, dass SDRs und MDRs aus einem gemeinsamen ADH-Vorfahren entstanden sind (EKLUND & RAMASWAMY 2008; JÖRNVALL 2008; JÖRNVALL et al. 1981; LADENSTEIN et al. 2008).

SDRs, zu denen S,S- und meso-BDDHs gehören, bilden wiederum eine große, funktionell sehr heterogene Proteinfamilie, zu der ca. 3000 Primär- und 30 3D-Strukturen veröffentlicht wurden. Es besteht untereinander eine geringe Sequenzhomologie von lediglich 15–30 %, allerdings besitzen sie eine hohe strukturelle Ähnlichkeit in ihrem α/β -Faltungsmuster mit zentralem β -Faltblatt, das typisch für einen *Rossmann-Fold* ist (PERSSON et al. 2003). Konservierte Sequenzregionen sind: Ein N-terminales T-G-X₃-G-X-G-Motiv, das Teil der Nukleotidbinderegion ist, und die im aktiven Zentrum vorhandene katalytische Triade, bestehend aus Serin, Tyrosin, Lysin-Resten. Tyrosin ist dabei in der gesamten Familie am häufigsten konserviert (JÖRNVALL et al. 1995; OPPERMANN et al. 2003). Weitere häufig vorkommende Sequenzmotive sind ebenso in Tab. 4.5 aufgeführt.

Tab. 4.5: Sequenzmotive, die in SDR-Enzymen konserviert sind. Die Positionen beziehen sich auf die meso-2,3-Butandiol-Dehydrogenase aus *Klebsiella pneumoniae* (PDB Code 1GEG) (OPPERMANN et al. 2003; OTAGIRI et al. 2001a)

Motiv	Position (bezogen aus PDB Code 1GEG)	Funktion
TGXXXGXG	18-25	Cofaktorbinderegion
D	64	Schwache Cofaktorbindung
NNAG	90-94	Stabilisierung des zentralen β -Faltblatts
ESYK	123, 139, 152, 156	Aktives Zentrum
N	179	Verbindung zur Substratbindestelle und zum aktiven Zentrum
PG	182-183	Richtung der Reaktion
T	187	H-Brücke zum Carboxamid des Nikotinamidrings

Wie SDRs besteht auch die Superfamilie der MDRs aus sehr heterogenen, einzelnen Proteinfamilien. Dazu zählen Quiononreduktasen, Leukotrien-B4-Dehydrogenasen, Zink-abhängige-Alkoholdehydrogenasen (ZnADHs) und viele weitere. Bei R,R-Butandiol-Dehydrogenasen handelt es sich um ZnADHs (NORDLING et al. 2002; PERSSON et al. 1994). Aufgebaut sind ZnADHs generell aus zwei Untereinheiten, wobei die eine den Cofaktor bindet und die andere die Zinkionen koordiniert und somit die katalytisch aktive Domäne formt (EKLUND et al. 1985). Die Cofaktorbindedomäne besteht wie auch bei SDRs aus einem *Rossmann-Fold* (BAKER et al. 2009). ZnADHs besitzen typischerweise zwei tetraedrisch koordinierte Zinkionen, von denen eines katalytische Aktivität aufweist und sich im aktiven Zentrum des Enzyms befindet, wohingegen das zweite strukturelle Funktionen übernimmt, indem es die Bindung der Untereinheiten koordiniert. Das katalytische Zinkion interagiert mit drei Liganden, einem Histidin, zwei Cysteinen und einem Wassermolekül. Das andere wird von vier Proteinliganden beeinflusst (AULD & BERGMAN 2008; TIWARI et al. 2012).

Diese große Menge an Informationen über die Struktur von SDRs und MDRs lässt viele verschiedene Aussagen über die Reaktivität und den Reaktionsmechanismus zu. Jedoch ist eine detaillierte Erklärung bezüglich der Stereospezifität von BDDHs bislang noch nicht möglich. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde noch keine Struktur einer R,R-Butandiol-Dehydrogenase aufgeklärt. Es sind jedoch Strukturen von meso- und S,S-BDDH verfügbar, mit deren Hilfe und den dazugehörigen Experimenten die Möglichkeit bestand, die strukturelle Basis für die Substraterkennung sowie mögliche chirale Erkennungsmechanismen zu erklären. So wurde von der Arbeitsgruppe um Kusunoki 2001 die erste Struktur einer BDDH veröffentlicht. Es wurde eine meso-BDDH aus *Klebsiella pneumoniae* (*KpBDDH*) kristallisiert und mittels Röntgenstrukturanalyse die Struktur mit einer Auflösung von 1,7 Å aufgeklärt. Auf Grund dieser Daten konnte gezeigt werden, dass die bei SDRs typische katalytische Triade ebenso existiert. Das konservierte Tyr152 agiert als Säure-Base-Katalysator für den Protonentransfer, während Lys156 den Cofaktor bindet und den pK_a-Wert des Tyr152 senkt. Ser139 ist für die Substratbindung zuständig. Der Versuchsaufbau hat außerdem belegt, dass Mercaptoethanol einen kompetitiven Inhibitor von *KpBDDH* darstellt und sich in die Substratbindetasche legt. Die Analyse der Bindung von Mercaptoethanol zeigt, dass es wahrscheinlicher ist, dass sich das in R-Konfiguration befindende C3-Atom von meso-BDL in der Substratbindetasche wiederfindet als die S-Konfiguration von S,S-BDL. Die Struktur deutet demnach an, dass die Carbonylfunktion von Gly183 und das NH-Motiv von Gln140 sowie Asn146 Wasserstoffbrückenbindungen zu ebendieser C3-Position des meso-BDL ausbauen können. Des Weiteren wurde bei der Mutante Gln140Ile keine Aktivität festgestellt. Zusätzlich veranschaulicht ein

Sequenzvergleich zwischen meso- und S,S-BDDHs, dass Gln140 und Asn146 Positionen sind, die sich unterscheiden. Dies legt den Schluss nahe, dass ebendiese Positionen nicht nur für die Aktivität, sondern auch für die Stereospezifität von BDLs ausschlaggebend sind (OTAGIRI et al. 2001b; OTAGIRI et al. 2010).

Die einzigen bislang kristallisierten BDDHs sind die meso-BDL-umsetzende BDDH aus *Klebsiella pneumoniae* und die S,S-BDL-konvertierende BDDH aus *Corynebacterium glutamicum*. Die Strukturen konnten mit einer Auflösung von 1,7 Å sowie 2,0 Å aufgeklärt werden (PDB-ID: 1GEG, 3A28).

BDL ist, wie bereits erwähnt, von großem Interesse für die Bereitstellung von Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen. In dieser Arbeit wurde bereits eine zellfreie Reaktionskaskade basierend auf dem Butanoat-Stoffwechselweg beschrieben (siehe Unterkapitel 4.2). Ebenso wurde in Kapitel 2 ein zellfreies Kaskadensystem dargestellt, das als Hauptintermediat Pyruvat besitzt. Deshalb erscheint es möglich, eine dieser beiden Varianten zum BDL hin weiterzuentwickeln. Dabei ist gerade die Stereospezifität von besonderem Interesse, denn die Produktion von enantiomerenreinen Stoffen besitzt eine besondere Wertigkeit.

Die Basis, um herauszufinden, welche BDDH welches BDL-Enantiomer produziert, ist die Enzymstruktur. Jedoch war es bislang nicht möglich, eine Struktur in Kombination mit dem natürlichen Substrat bzw. Produkt aufzulösen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Versuch gestartet, die meso-BDL-konvertierende BDDH aus *Serratia marcescens* (*SmBDDH*) in Gegenwart des Substrats Acetoin zu kristallisieren. *SmBDDH* wurde gewählt, da das Enzym eine im Vergleich zu anderen BDDHs hohe spezifische Aktivität besitzt und deshalb von Interesse für zellfreie Enzymreaktionen ist. Des Weiteren wurde der Versuch unternommen, ebenso eine R,R-BDL-umsetzende BDDH aus *Bacillus cereus* (MDR-Familie, *BcBDDH*). Die Kristallisationsfähigkeit ist entscheidend für eine Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse und da weder die Strukturen von *SmBDDH* noch *BcBDDH* aufgeklärt sind, sollte damit ein erster Schritt in diese Richtung getan werden.

4.3.2 Ergebnisse

4.3.2.1 Charakterisierung der Butandiol-Dehydrogenasen

Da bereits detaillierte Charakterisierungen der *SmBDDH* veröffentlicht wurden, wurde in dieser Arbeit auf eine umfangreiche Analyse verzichtet. Ein Vergleich der Aktivitäten zeigt, dass für die hier verwendete *SmBDDH* mit einer Aktivität von $288.8 \pm 96.2 \text{ U mg}^{-1}$ vergleichbare Werte gemessen wurden (ZHANG et al. 2014). Die *BcBDDH* wurde dagegen detailliert charakterisiert. Die *BcBDDH* hat mit $13,7 \text{ U mg}^{-1}$ eine deutlich niedrige Aktivität im Vergleich zur *SmBDDH*. Jedoch besitzt die *BcBDDH* einen sehr niedrigen K_m -Wert von 0,022 mM. Das pH-Optimum liegt bei pH 7,5 und das Temperaturoptimum bei 40 °C. In Abb. 4.19 sind das Temperatur- und das pH-Wert-Verhalten dargestellt.

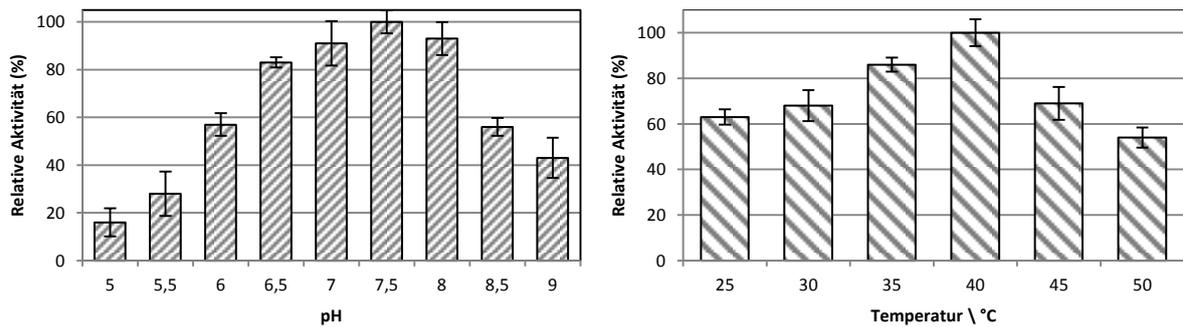


Abb. 4.19: Bestimmung der pH-Wert- und Temperaturabhängigkeit von BcBDDH. Acetoin wurde mit einer Konzentration von 5 mM und NADH mit 0,2 mM eingesetzt. Das pH-Wert-Optimum wurde mit MOPS-Puffer, pH 5–7, und Tris-Puffer, pH 7,5–9 ermittelt und das Temperaturoptimum wurde bei 100 mM Tris pH 7,5 festgestellt.

Des Weiteren wurde ermittelt, welche Metallionen einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms haben könnten (siehe Tab. 4.6). So konnte belegt werden, dass MnCl_2 einen leicht aktivierenden Effekt auf BcBDDH hat, wohingegen ZnCl_2 das Enzym inhibiert.

Tab. 4.6: Einfluss unterschiedlicher Metallionen auf die Aktivität von BcBDDH. Die Metallsalze wurden mit jeweils 5 mM Endkonzentration eingesetzt

Metallion	Relative Aktivität / %	± Relativer Fehler / %
Kontrolle	100	4,2
CaCl	90,9	3,9
ZnCl ₂	12,7	39,7
MgSO ₄	75,7	13,3
NaCl	102,3	2,0
MnCl ₂	110,2	17,3
MgCl ₂	94,1	4,3

4.3.2.2 Kristallisation von SmBDDH und BcBDDH

Um die optimalen Bedingungen für die Kristallisation von SmBDDH und BcBDDH herauszufinden, wurden verschiedene kommerziell erwerbbar Kristallisationscreenings angewandt. Diese ermöglichen es, ein breites Spektrum an Bedingungen simultan und im Hochdurchsatz zu testen. Alle angewandten Screeningansätze waren ähnlich aufgebaut. Es wurde ein pH-Bereich von pH 4–10 abgedeckt. Zusätzlich kamen Fällmitteln wie z. B. hochmolekulares Polyethylenglycol (AGHAIE et al. 2008) und Salze in unterschiedlichen Konzentrationen zum Einsatz. In Anhang 2-4 sind die exakten Konzentrationen und Inhaltsstoffe der jeweiligen Screenings aufgeführt.

Für die Kristallisation der SmBDDH wurde eine Lösung von 20 mg mL⁻¹ hergestellt und nach Anleitung auf ihr Kristallisationsverhalten hin untersucht. Nach einer Inkubationszeit von ca. 24 h–48 h bei 25 °C wurden erste Kristalle sichtbar, die in allen Screenings in unterschiedlicher Größe gefunden werden konnten. Als Hauptkomponente, die anscheinend einen Einfluss auf die Kristallisation hatte, konnte Natriumformiat identifiziert werden. War dieses Salz der Pufferlösung beigegeben, konnte häufig eine Kristallbildung beobachtet werden. Die auffälligsten Kristalle bezüglich

Größe und Wachstumsgeschwindigkeit wurden im Screeningansatz PEG/Ion B9 mit der Zusammensetzung 0,2 M Natriumformiat und 20 % w/v PEG3.350 gefunden. Auf dieser Grundlage wurden neue Kristallisationsansätze mit abgeänderten Varianten dieses Ergebnisses durchgeführt. Eine Kristallisation der *SmBDDH* im Ansatz PEGRx G8 legte nahe, dass offenbar auch ein hoher pH-Wert einen Einfluss hat, da Kristalle bei einem pH von 8,5 gefunden wurden. Es wurden daraufhin verschiedene Ansätze angefertigt, in denen die Konzentrationen der jeweiligen Komponenten sowie der pH-Wert variiert wurden. In Tab. 4.7 ist ein Beispiel für einen solchen Ansatz dargestellt. Dort wurden die Natriumformiat- sowie die PEG3.350-Konzentrationen in Kombination mit einem pH-Bereich von 7–9,5 variiert. Es wurden verschiedene Platten mit jeweils unterschiedlichen Bedingungen angesetzt. In Tab. 4.7 sind zwei Felder markiert, die besonders viele Kristalle hervorgebracht haben.

Tab. 4.7: Aufbau einer Hanging-Drop-24-Well-Kristallisationsplatte zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen von SmBDDH. Angegeben sind die Konzentrationen der jeweiligen Komponenten. Das Gesamtvolumen des Kristallisationspuffers in einer Kavität betrug 1 mL. In grün sind diejenigen Bedingungen markiert, in denen mehrere Kristalle gefunden wurden

	1	2	3	4	5	6
A	0,05 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 7,0 10% w/v PEG 3350	0,1 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 7,5 10% w/v PEG 3350	0,15 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 8,0 10% w/v PEG 3350	0,2 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 8,5 10% w/v PEG 3350	0,25 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 9,0 10% w/v PEG 3350	0,3 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 9,5 10% w/v PEG 3350
B	0,05 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 7,0 15% w/v PEG 3350	0,1 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 7,5 15% w/v PEG 3350	0,15 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 8,0 15% w/v PEG 3350	0,2 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 8,5 15% w/v PEG 3350	0,25 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 9,0 15% w/v PEG 3350	0,3 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 9,5 15% w/v PEG 3350
C	0,05 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 7,0 20% w/v PEG 3350	0,1 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 7,5 20% w/v PEG 3350	0,15 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 8,0 20% w/v PEG 3350	0,2 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 8,5 20% w/v PEG 3350	0,25 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 9,0 20% w/v PEG 3350	0,3 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 9,5 20% w/v PEG 3350
D	0,05 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 7,0 25% w/v PEG 3350	0,1 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 7,5 25% w/v PEG 3350	0,15 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 8,0 25% w/v PEG 3350	0,2 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 8,5 25% w/v PEG 3350	0,25 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 9,0 25% w/v PEG 3350	0,3 M NaCOOH 0,1 M TRIS pH 9,5 25% w/v PEG 3350

Für die Kristallisation der *BcBDDH* wurde ebenso eine Lösung mit 20 mg mL⁻¹ Protein hergestellt. Wie auch bei der *SmBDDH* wurden die zur Verfügung stehenden Kristallisationskits nach Herstellerangaben verwendet, um nach den optimalen Bedingungen zur Kristallisation zu suchen. Es stellte sich heraus, dass die Kristallisation der *BcBDDH* im Vergleich zur *SmBDDH* deutlich seltener stattfand. Aus den untersuchten 384 unterschiedlichen Bedingungen brachten lediglich zwei Kristalle hervor; zum einen JCSG-plus Position 2-9 (1,6 M Magnesiumsulfat, 0,1 M MES pH 6,5) und zum anderen JCSG-plus Position 2-20 (2,1 mM Äpfelsäure pH 7,0). Eine weitere Analyse nach dem oben genannten Muster brachte keine weiteren Kristalle hervor. Selbst eine Reproduktion der Kristallisation war nicht möglich. Abb. 4.20 enthält die unterschiedlichen Kristalle von *SmBDDH* und *BcBDDH*. *SmBDDH*-Kristalle stellen sich deutlich kompakter und häufiger in der Anzahl dar, wohingegen *BcBDDH*-Kristalle sehr dünne, spitze Formen annehmen. In der Abbildung rechts ist zusätzlich noch eine Nylonschleife ersichtlich, die verwendet wurde, um die Kristalle aus der Lösung herauszunehmen und für die Röntgenstrukturanalyse vorzubereiten.

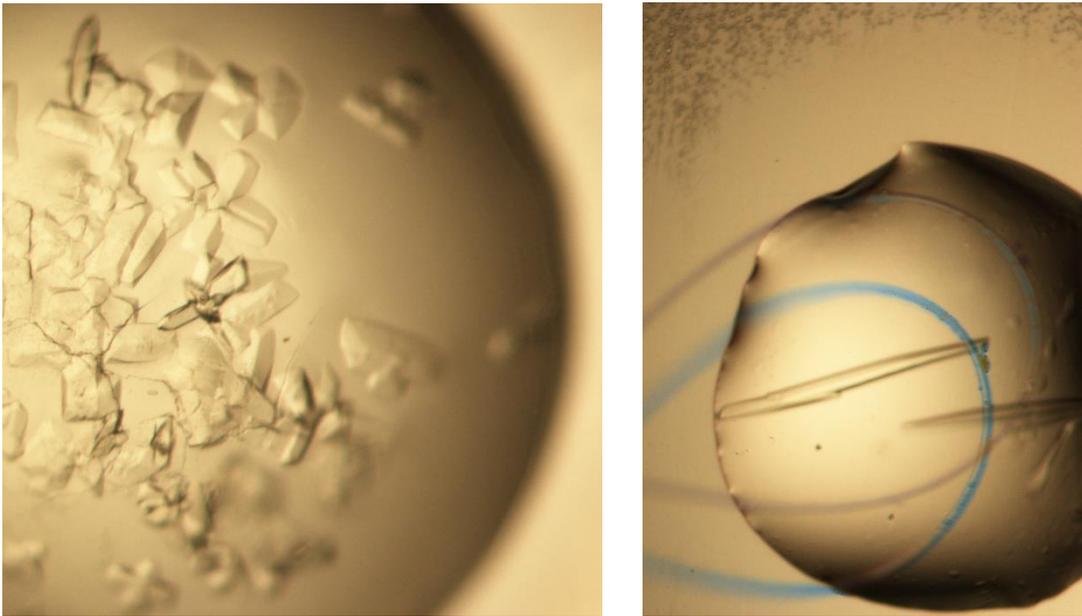


Abb. 4.20 Beispiel für BDDH-Proteinkristalle (aufgenommen unter einem Stereomikroskop):
Links: SmBDDH-Proteinkristalle; die Bedingungen für die Kristallisation in diesem Fall waren:
0,2 M NaCOOH, 0,1 M TRIS pH 8,5, 25 % w/v PEG 3350.
Rechts: BcBDDH-Proteinkristalle; die Bedingungen waren: 1,6 M Magnesiumsulfat, 0,1 M MES pH
6,5. Zusätzlich ist eine Nylonschleife (blau) zu sehen. Diese wurde zur Verdeutlichung der
Aufnahme des Kristalls und zur Präparation für die Röntgenstrukturanalyse verwendet.

Es war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, eine Strukturaufklärung der beiden Enzyme durchzuführen. Die Kristalle wurden zur Strukturaufklärung vorbereitet und an die Arbeitsgruppe von Prof. Guddat an der *University of Queensland* Brisbane, Australien übergeben.

5. Diskussion

Ein Wechsel in der Produktion von Chemikalien ist nötig, um die geschaffenen Abhängigkeiten an fossilen Rohstoffen zu durchbrechen. Der Schritt weg von erdölbasierten hin zu nachwachsenden Rohstoffen bedarf vieler verschiedener Bemühungen. Das Prinzip der Bioraffinerie schafft dabei die Möglichkeit, viele einzelne Prozesse zu vereinheitlichen, um eine effektivere Gesamtbilanz zu erreichen. Einzelne Substrate und (Zwischen-)Produkte sowie die jeweiligen Synthesewege müssen kombiniert werden und gegenseitig aufeinander aufbauen, damit das größtmögliche ökonomische und ökologische Potential erreicht werden kann. Dabei müssen sowohl die Ressourcen als auch die Reaktionen optimal genutzt und verknüpft werden (VENKATA MOHAN et al. 2016) (XU et al. 2020).

Alvarado et. al belegen zum Beispiel, wie viele Möglichkeiten in Biomasse als Ausgangsmaterial liegen und mit welchen Prozessen diese bearbeitet werden kann (ESCAMILLA-ALVARADO et al. 2017). Die in dieser Arbeit bearbeiteten Projekte sollen dazu dienen, weitere Ansatzpunkte für die Produktion von Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen zu liefern, wobei die Reaktionsbedingungen und eine Optimierung dieser besonders im Fokus stehen. Zellfreie, enzymatische Reaktionen zeigen besonders viel Optimierungspotential in Bezug auf das Verhältnis der einzelnen Enzyme zueinander (GMELCH et al. 2019). Gerade die Optimierung der Kaskade aus Unterkapitel 4.2 zeigt deutlich, wie das Verhältnis zwischen den einzelnen Enzymen einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute liefert.

Außerdem wurde in dieser Arbeit offensichtlich, dass die einzelnen Zwischenprodukte in einer zellfreien Enzymkaskade einen großen Einfluss auf den Gesamterfolg haben können (SPERL & SIEBER 2018). In dieser Arbeit konnte ferner gezeigt werden, dass Glycerinaldehyd (siehe Unterkapitel 4.1) dahingehend eine entscheidende Funktion zukommt, da anscheinend Nebenreaktionen auftreten und die Gesamtausbeute somit beeinträchtigt wird.

Enzyme und ihre Eigenschaften sind der Schlüssel für die erfolgreiche Implementierung von zellfreien Enzymkaskaden in größeren Maßstäben oder in Bioraffinerien. Je mehr Informationen über ein Enzym und seinen Reaktionsmechanismus vorliegen, desto effektiver kann dieses zum Einsatz kommen. Dabei ist auch die Struktur des Proteins von großer Bedeutung. Mit Kristallstrukturanalysen der Enzyme können die Eigenschaften besser ermittelt und Rückschlüsse auf beispielsweise Stabilität und Substratpromiskuität gezogen werden (MAURER 2018).

In den folgenden Unterkapiteln werden die jeweiligen Ergebnisse diskutiert und theoretische Lösungsansätze präsentiert.

5.1 In vitro metabolisches Engineering einer minimierten, enzymatischen Reaktionskaskade zur Alkoholproduktion

Die verbesserten Varianten von ALDH sowie die Aktivierung und verbesserte Bereitstellung von aktiver DHAD konnten die Stabilität und Effektivität der Enzymkaskade signifikant beeinflussen. Mit der neu entwickelten Methode zur Bestimmung der Aldehydkonzentrationen ließen sich zusätzlich große Einblicke in die Wirkungsweise der Kaskade gewinnen. Gleichwohl legen diese Analysen ebenso nahe, dass es nicht möglich ist, die Konzentration von Glycerinaldehyd effektiv zu observieren. Der Verlauf der GA-Konzentration zeigt, dass ein großer Teil des entstandenen Aldehyds

zu Beginn und bis zu 6 h während der Reaktion nicht zu detektieren ist. Dies wird durch die zusätzlichen Experimente zur Untersuchung der Reaktivität von GA unterstützt und deutet darauf hin, dass die Reaktivität dieser funktionellen Gruppe hoch ist und dadurch auch die Gesamtaktivität leidet. Obwohl die Ausbeute durch die Verdoppelung der Enzymaktivität innerhalb der Reaktionskaskade um 22 % gesteigert werden konnte, gelang dies nur in einem sehr geringen Maße für die Reaktionsrate (9 % Steigerung). All diese Ergebnisse offenbaren, dass die Kaskade strukturelle Defizite besitzt, die durch erste Runden des Enzyme Engineerings und Prozessoptimierung nur leicht vermindert werden konnten.

Alternativer Reaktionsweg

Bei genauer Betrachtung stellen neben der Reaktivität der Aldehyde die geringe Aktivität von ALDH gegenüber Glycerinaldehyd bzw. der sehr hohe K_m -Wert gegenüber NADH und die geringe Aktivität von DHAD gegenüber Glycerat die Hauptprobleme der Reaktionskaskade dar. Die katalytischen Parameter von ALDH konnten verbessert (STEFFLER et al. 2013) und die Produktion und Beladung von DHAD erhöht werden, jedoch sind die Werte immer noch vergleichsweise niedrig, weshalb eine alternative Route in Betracht gezogen werden könnte. Auf Basis von Entwicklungen der Arbeitsgruppe von Prof. Clapes in Barcelona konnte eine Mutante einer Aldolase erzeugt werden, die die Kondensation von Dihydroxyaceton und Glykolaldehyd zu Xylulose katalysiert. Dieses Enzym inspirierte eine theoretische Reaktionskaskade, die diese Aldolkondensation zur Basis hat. Die Wissenschaftler um Prof. Clapes haben eine Variante der D-Fructose-6-Phosphate-Aldolase (FSA) entwickelt, die diese Reaktion mit hoher Selektivität und Reaktivität ($9,7 \text{ U mg}^{-1}$) katalysiert (SZEKRENYI et al. 2014). Die entstehende Xylulose muss anschließend isomerisiert werden und kann als Xylose von den bereits etablierten Enzymen GDH, DHAD und KDGA umgesetzt werden. Demnach muss eine Isomerase gefunden werden, die GA zu DHA und Xylulose zu Xylose isomerisiert. Die restlichen Enzyme der Kaskade wurden bereits auf ihre Reaktivität gegenüber Xylose (MILBURN et al. 2006), Xylonat (KIM & LEE 2006) und 2-Keto-3-Desoxyxylonat (WOLTERINK-VAN LOO et al. 2007) hin untersucht. Dieser Reaktionsverlauf ist in Abb. 5.1 dargestellt.

Generell kann davon ausgegangen werden, dass beide Reaktionen nicht favorisiert werden, da das Reaktionsgleichgewicht jeweils auf der Eduktseite der jeweiligen Reaktion liegt. Für die Isomerisierung von GA zu DHA können ein ΔG^0 von $6,11 \text{ kJ mol}^{-1}$ sowie $3,72 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die Isomerisierung von Xylulose zu Xylose berechnet werden (JANKOWSKI et al. 2008), was bedeutet, dass die Eduktseite der Reaktion bevorzugt wird. Um die Reaktion dennoch zu ermöglichen, ist die Oxidation von Xylose zu Xylonat eminent. Durch diese Reaktion kann das gesamte Gleichgewicht der Reaktion in Richtung der Produktseite verschoben werden, denn sobald eine geringe Menge an Produkt der Isomerisierung aus dem Gleichgewicht entzogen werden kann, lässt sich die gesamte Reaktion zur Produktseite hin verlagern. Der große Nachteil bei der Entwicklung dieser Reaktionskaskade besteht darin, dass es sehr aufwendig ist, die Aktivität der Isomerase zu bestimmen. Die Reaktion von Xylulose zu Xylose könnte mittels eines gekoppelten Assays möglich sein, jedoch ist die bedeutsamere Reaktion von GA zu DHA auf diesem Weg nicht zu analysieren, da es nicht gelang, eine selektive Nachweisreaktion für DHA zu etablieren. Eine Vereinfachung der Reaktion, um unterschiedliche Enzyme einfach und schnell zu testen, war bis dato ebenso nicht möglich. Nur durch eine effektive Methode zur Bestimmung der jeweiligen Enzymaktivitäten kann auch die Kaskade effektiv gestaltet werden. Trotz dieser Hindernisse wäre eine Umsetzung dieser Alternative zur herkömmlichen Reaktionskaskade möglich. Denn GDH, DHAD und KDGA sind nachweislich aktiv auf Xylose und die dazugehörigen Derivate (CARSTEN et al. 2015; KIM & LEE 2006; LAMBLE et al. 2005; MILBURN et al. 2006; WOLTERINK-VAN LOO et al. 2007). Xyloseisomerasen stehen kostengünstig in großen Mengen zur Verfügung. Das größte Problem besteht daher in der Etablierung der Isomerisierung von GA zu DHA.

5.2 Neutralisierung von Silagepresssaft bei gleichzeitiger kontinuierlicher Produktion von Acetoin aus Milchsäure mittels einer immobilisierten, enzymatischen Kaskadenreaktion

Es konnte gezeigt werden, dass eine selektive Konversion von Milchsäure aus Silagepresssaft zu Acetoin mittels einer immobilisierten, enzymatischen Reaktionskaskade möglich ist. Einhergehend mit der Produktion von Acetoin wird der SPS neutralisiert, um dessen Verwendungsspektrum zu erhöhen. Die Reaktion ist dreistufig und wird von vier Enzymen katalysiert. Um eine Denaturierung durch die Prozessbedingungen zu vermeiden und die Handhabung zu erleichtern, wurden alle Enzyme in einem Ca-Alginatpolymer immobilisiert. Mit der Konversion von bis zu 91 % der titrierten Milchsäure zu Acetoin und Laufzeiten von bis zu 6 h konnte belegt werden, dass die Reaktionskaskade funktioniert und somit das Anwendungsspektrum von SPS gesteigert werden kann. Um die gesamte Leistungsfähigkeit der Kaskade zu erhöhen, sollte untersucht werden, wie sich die einzelnen Enzyme gegenüber der Verwendung von SPS als Substratquelle verbessern lassen. Weitergehende Experimente könnten es ermöglichen, den bisherigen Prozess stabiler und effektiver zu gestalten. In den hier gezeigten Ergebnissen konnten erste Schritte hin zu einer möglichen Verwendung von SPS als nachwachsende Ressource für biotechnologische Prozesse gemacht werden. So konnte die Entsäuerung des Presssaffes mittels einer enzymatischen Reaktionskaskade demonstriert und gleichzeitig Acetoin als wertgebendes Produkt hergestellt werden. Die Immobilisierung hat zudem

verdeutlicht, dass die Enzymaktivität stabilisiert werden konnte und somit ein funktionierender Prozess ermöglicht wurde. Eine Erklärung für die verminderte Produktionsrate unter Verwendung von SPS als Substratquelle bieten die mit SPS eingefärbten Alginatkügelchen, die eine Verstopfung der Poren der Alginatkügelchen nahelegen. Wenn es möglich ist, diese Auswirkungen des SPS zu minimieren oder zu eliminieren, kann eine deutliche Optimierung des Prozesses erzielt werden. Hinzu kommen die vielen Chancen der Enzymoptimierung, die zusätzlich einen Teil zur Verbesserung beitragen könnten. Eine effektive und hoch selektive Extraktion von Acetoin ermöglicht eine Weiterverarbeitung (SUN et al. 2012; XIU & ZENG 2008). Diese zellfreie, enzymatische Reaktionskaskade stellt eine Möglichkeit dar, die wertvolle Ressource SPS nutzbar zu machen, und könnte eine zentrale Rolle in einer Mehrproduktbioraffinerie spielen.

Durch den neutralisierten pH-Wert kann SPS fermentativ eingesetzt werden. Für eine erfolgreiche Implementierung dieses Prozesses in eine grüne Bioraffinerie müssen allerdings die Produktionsraten und Ausbeuten weiter erhöht werden. Sobald dies geschehen ist, könnte dieses System dabei helfen, die komplette Nutzung von Grassilage als natürliche Ressource zu ermöglichen.

5.3 Charakterisierung und Kristallisation von Butandiol-Dehydrogenasen

Die Röntgenstrukturanalyse ist ein mächtiges Werkzeug in dem Versuch, das Verhalten von Enzymen zu erklären. Hiermit lassen sich strukturelle Eigenschaften entschlüsseln und Zusammenhänge zwischen katalytisch aktiven Aminosäuren und Substrat bzw. Produkt herstellen. Die Grundlage für diese Analyse bildet die Kristallisation des Proteins. Ohne einen strukturell einheitlichen Einkristall ist eine Strukturaufklärung durch diese Methode nicht möglich. Jedoch sind die Bedingungen der methodengemäßen Kristallisation von Protein zu Protein unterschiedlich und nur schwer vorherzusagen. Es ist eine zeitaufwendige und arbeitsintensive Probenvorbereitung nötig und häufig können nur sehr wenige erfolgreiche Treffer erzielt werden. Es gibt verschiedene Versuche, das Kristallisationsverhalten vorherzusagen und anhand von anderen Parametern wie der dynamischen Lichtstreuung zu vereinfachen (GEORGE & WILSON 1994; RUPP & WANG 2004). Deutlich vereinfacht wurde die Suche nach den idealen Bedingungen durch technische Neuerungen wie den hier verwendeten Pipettierroboter und die kommerziell erwerbbaaren Kristallisationskits. Diese Neuerungen basieren jedoch lediglich darauf, dass mehr Bedingungsvariationen schneller und einfacher getestet werden können. Eine verbesserte Vorhersage kann dadurch indes nicht getroffen werden. Das Beispiel von *BcBDDH* lässt erkennen, dass es allerdings – trotz der hohen Anzahl an gleichzeitigen Experimenten – noch immer nicht möglich war, optimale und nachhaltige Ergebnisse zu generieren. Die hier verwendeten Kits sind anscheinend nicht dazu geeignet gewesen, die optimalen Kristallisationsbedingungen zu bestimmen. Offensichtlich stellen die gefundenen *BcBDDH*-Kristalle lediglich Zufallsprodukte dar und weitere hier nicht identifizierbare Faktoren spielen eine essenzielle Rolle bei der Kristallbildung. Ob sie dennoch ausreichen, um die Struktur von *BcBDDH* aufzuklären, muss sich noch zeigen. Wie auch die gefundenen Kristalle der *SmBDDH* wurden alle Kristallpräparationen in die Obhut von Prof. Luke Guddat an die *University of Queensland*, Brisbane, Australien zur Strukturaufklärung weitergegeben. Dort werden sie vorbereitet und an das *Australian*

Synchrotron in Melbourne geschickt, wo die Differenzialspektren aufgenommen werden sollen. Die Strukturaufklärung soll dann von den Mitarbeitern Prof. Guddats durchgeführt werden.

Literaturverzeichnis

- Adam, Waldemar; Lazarus, Michael; Saha-Möller, Chantu R. und Schreier, Peter (1998): Quantitative transformation of racemic 2-hydroxy acids into (R)-2-hydroxy acids by enantioselective oxidation with glycolate oxidase and subsequent reduction of 2-keto acids with d-lactate dehydrogenase. In: *Tetrahedron: Asymmetry*, Vol. 9, 2, S. 351-355.
- Adrio, Jose und Demain, Arnold (2014): Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. In: *Biomolecules*, Vol. 4, 1, S. 117-139.
- Aehle, Wolfgang (2006): *Enzymes in industry: products and applications*. John Wiley & Sons.
- Aghaie, Asadollah; Lechaplais, Christophe; Sirven, Peggy; Tricot, Sabine; Besnard-Gonnet, Marielle; Muselet, Delphine; de Berardinis, Véronique et al. (2008): New Insights into the Alternative d-Glucarate Degradation Pathway. In: *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, 23, S. 15638-15646.
- Alam, Firoz; Mobin, Saleh und Chowdhury, Harun (2015): Third Generation Biofuel from Algae. In: *Procedia Engineering*, Vol. 105, S. 763-768.
- Alam, S.; Capit, F.; Weigand, W. A. und Hong, J. (1990): Kinetics of 2,3-butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: effect of initial substrate concentration and aeration. In: *J Chem Technol Biotechnol*, Vol. 47, S. 1-10.
- Andruleit, Harald; Bahr, A; Babies, HG; Franke, D; Meßner, Jürgen; Pierau, R; Schauer, Met et al. (2016): Energiestudie 2013. Reserven, Ressourcen und Verfügbarkeit von Energierohstoffen. In: *Fachbereich B*, Vol. 1, S. 1-10.
- Angelastro, Antonio; Dawson, William M.; Luk, Louis Y. P. und Allemann, Rudolf K. (2017): A Versatile Disulfide-Driven Recycling System for NADP⁺ with High Cofactor Turnover Number. In: *ACS Catalysis*, Vol. 7, 2, S. 1025-1029.
- Arnold, Frances H. und Volkov, Alexander A. (1999): Directed evolution of biocatalysts. In: *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 3, 1, S. 54-59.
- Atsumi, S.; Wu, T. Y.; Machado, I. M.; Huang, W. C.; Chen, P. Y.; Pellegrini, M. und Liao, J. C. (2010): Evolution, genomic analysis, and reconstruction of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. In: *Mol Syst Biol*, Vol. 6, S. 449.
- Auld, D. S. und Bergman, T. (2008): Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. In: *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 65, 24, S. 3961.
- Baerns, Manfred; Behr, Arno; Brehm, Axel; Gmehling, Jürgen; Hofmann, Hanns und Onken, Ulfert (2013): *Technische chemie*. John Wiley & Sons.
- Baker, Patrick J.; Britton, K. Linda; Fisher, Martin; Esclapez, Julia; Pire, Carmen; Bonete, Maria Jose; Ferrer, Juanet et al. (2009): Active site dynamics in the zinc-dependent medium chain alcohol dehydrogenase superfamily. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol., S. 1-10.
- Becker, T; Breithaupt, D; Doelle, HW; Fiechter, A; Griensven, M und Kasper, C (2007): *Biotechnology, Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, Germany.
- Beer, Barbara; Pick, André und Sieber, Volker (2017): In vitro metabolic engineering for the production of α -ketoglutarate. In: *Metabolic Engineering*, Vol. 40, S. 5-13.
- Bernfeld, Peter und Wan, J (1963): Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into lattices of synthetic polymers. In: *Science*, Vol. 142, 3593, S. 678-679.
- Bertani, G. (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol*, Vol. 62, 3, S. 293-300.
- Billhardt, Uta-Maria; Stein, Philip und Whitesides, George M (1989): Enzymatic methods for the preparation of acetyl-CoA and analogs. In: *Bioorganic Chemistry*, Vol. 17, 1, S. 1-12.
- Binay, Barış; Alagöz, Dilek; Yildirim, Deniz; Çelik, Ayhan und Tükel, S Seyhan (2016): Highly stable and reusable immobilized formate dehydrogenases: Promising biocatalysts for in situ regeneration of NADH. In: *Beilstein journal of organic chemistry*, Vol. 12, 1, S. 271-277.
- Blomqvist, K.; Nikkola, M.; Lehtovaara, P.; Suihko, M. L.; Airaksinen, U.; Straby, K. B.; Knowles, J. K. et al. (1993): Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. In: *J Bacteriol*, Vol. 175, 5, S. 1392-404.
- Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C. und Robins, K. (2012): Engineering the third wave of biocatalysis. In: *Nature*, Vol. 485, 7397, S. 185-194.
- Bornscheuer, Uwe T. und Pohl, Martina (2001): Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. In: *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 5, 2, S. 137-143.
- Boyer, M. E.; Stapleton, J. A.; Kuchenreuther, J. M.; Wang, C. W. und Swartz, J. R. (2008): Cell-free synthesis and maturation of [FeFe] hydrogenases. In: *Biotechnol Bioeng*, Vol. 99, 1, S. 59-67.
- Bozell, Joseph J. (2008): Feedstocks for the Future – Biorefinery Production of Chemicals from Renewable Carbon. In: *CLEAN – Soil, Air, Water*, Vol. 36, 8, S. 641-647.
- Brena, Beatriz; González-Pombo, Paula und Batista-Viera, Francisco (2013): Immobilization of enzymes: a literature survey. In: *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition*, Vol., S. 15-31.

- Breuer, Michael; Ditrich, Klaus; Habicher, Tilo; Hauer, Bernhard; Keßeler, Maria; Stürmer, Rainer und Zelinski, Thomas (2004): Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates. In: *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 43, 7, S. 788-824.
- Brynildsen, Mark P. und Liao, James C. (2009): An integrated network approach identifies the isobutanol response network of *Escherichia coli*. In: *Molecular Systems Biology*, Vol. 5, S. 277-277.
- Büchel, Karl Heinz; Moretto, Hans-Heinrich und Woditsch, Peter (2005): Front Matter. In: (Hrsg.) *Industrielle Anorganische Chemie*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: S. i-xxv.
- Buchner, Eduard und Rapp, Rudolf (1897): Alkoholische gährung ohne hefezellen. In: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, Vol. 30, 3, S. 2668-2678.
- Cao, L.; Langen, Lv und Sheldon, R. A. (2003): Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? In: *Curr Opin Biotechnol*, Vol. 14, 4, S. 387-94.
- Carlson, Erik D; Gan, Rui; Hodgman, C Eric und Jewett, Michael C (2012): Cell-free protein synthesis: applications come of age. In: *Biotechnology advances*, Vol. 30, 5, S. 1185-1194.
- Carlsson, R (1994): Sustainable primary production—Green crop fractionation: Effects of species, growth conditions, and physiological development. In: *Handbook of Plant and Crop Physiology*. Marcel Dekker, New York, Vol., S. 941-963.
- Carsten, Jörg M.; Schmidt, Anja und Sieber, Volker (2015): Characterization of recombinantly expressed dihydroxy-acid dehydratase from *Sulfobus solfataricus*—A key enzyme for the conversion of carbohydrates into chemicals. In: *Journal of Biotechnology*, Vol. 211, S. 31-41.
- Cedrone, Frédéric; Ménez, André und Quéméneur, Eric (2000): Tailoring new enzyme functions by rational redesign. In: *Current opinion in structural biology*, Vol. 10, 4, S. 405-410.
- Celińska, E. und Grajek, W. (2009): Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. In: *Biotechnology Advances*, Vol. 27, 6, S. 715-725.
- Cerrone, F.; Davis, R.; Kenny, S. T.; Woods, T.; O'Donovan, A.; Gupta, V. K.; Tuohy, M. et al. (2015): Use of a mannitol rich ensiled grass press juice (EGPJ) as a sole carbon source for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production through high cell density cultivation. In: *Bioresource Technology*, Vol. 191, S. 45-52.
- Chang, M. C. und Keasling, J. D. (2006): Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. In: *Nat Chem Biol*, Vol. 2, 12, S. 674-81.
- Chaudhuri, Swades K. und Lovley, Derek R. (2003): Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. In: *Nat Biotech*, Vol. 21, 10, S. 1229-1232.
- Chen, Guo; Wu, Zhichao und Ma, Yunhui (2015): A novel method for preparation of MNP@CS-tethered coenzyme for coupled oxidoreductase system. In: *Journal of Biotechnology*, Vol. 196, S. 52-57.
- Chen, Kuo-Cheng und Huang, Chang-Tze (1988): Effects of the growth of *Trichosporon cutaneum* in calcium alginate gel beads upon bead structure and oxygen transfer characteristics. In: *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 10, 5, S. 284-292.
- Chenault, H Keith und Whitesides, George M (1987): Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. In: *Appl Biochem Biotechnol*, Vol. 14, 2, S. 147-197.
- Chernyavskaya, O. G.; Shishkanova, N. V.; Il'chenko, A. P. und Finogenova, T. V. (2000): Synthesis of α -ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 53, 2, S. 152-158.
- Cherubini, Francesco (2010): The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. In: *Energy Conversion and Management*, Vol. 51, 7, S. 1412-1421.
- Cherubini, Francesco; Jungmeier, Gerfried; Wellisch, Maria; Willke, Thomas; Skiadas, Ioannis; Van Ree, Rene und de Jong, Ed (2009): Toward a common classification approach for biorefinery systems. In: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, Vol. 3, 5, S. 534-546.
- Christakopoulos, Paul und Topakas, Evangelos (2012): Editorial Note: Advances in Enzymology and Enzyme Engineering. In: *Computational and Structural Biotechnology Journal*, Vol. 2, S. e201209001.
- Commission, European (2006): *Biofuels in the European Union – a Vision for 2030 and Beyond*.
- Copeland, Robert A. (2002): A Brief History of Enzymology. In: (Hrsg.) *Enzymes*. John Wiley & Sons, Inc.: S. 1-10.
- Cukalovic, Ana und Stevens, Christian V. (2008): Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: a marriage of renewable resources and chemical technology. In: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, Vol. 2, 6, S. 505-529.
- Datta, Sumitra; Christena, L. Rene und Rajaram, Yamuna Rani Sriramulu (2013): Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. In: *3 Biotech*, Vol. 3, 1, S. 1-9.
- de Jong, Ed; van Rea, René; van Tuil, Robert und Elbersen, Wolter (2006): Biorefineries for the Chemical Industry—A Dutch point of view. In: *Biorefineries-Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*, Vol., S. 85-111.
- Demain, A. L. (2000): Small bugs, big business: the economic power of the microbe. In: *Biotechnol Adv*, Vol. 18, 6, S. 499-514.
- Deutscher, Murray P (1990): *Guide to protein purification*. Gulf Professional Publishing.

- Doornbosch, Richard und Steenblik, Ronald (2008): Biofuels: is the cure worse than the disease? In: *Revista Virtual REDESMA*, Vol. 2, S. 63.
- Dulieu, C.; Moll, M.; Boudrant, J. und Poncelet, D. (2000): Improved performances and control of beer fermentation using encapsulated alpha-acetolactate decarboxylase and modeling. In: *Biotechnology Progress*, Vol. 16, 6, S. 958-65.
- Dumont, T.; Barth, D.; Corbier, C.; Branlant, G. und Perrut, M. (1992): Enzymatic reaction kinetic: Comparison in an organic solvent and in supercritical carbon dioxide. In: *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 40, 2, S. 329-333.
- Ecker, J; Schaffenberger, M; Koschuh, W; Mandl, M; Böchzelt, HG; Schnitzer, H; Harasek, Met al. (2012): Green biorefinery upper Austria–pilot plant operation. In: *Separation and purification technology*, Vol. 96, S. 237-247.
- Eklund, H. und Ramaswamy, S. (2008): Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Three-dimensional structures of MDR alcohol dehydrogenases. In: *Cell Mol Life Sci*, Vol. 65, 24, S. 3907-17.
- Eklund, Hans; Horjales, Eduardo; Joernvall, Hans; Braenden, Carl-Ivar und Jeffery, Jonathan (1985): Molecular aspects of functional differences between alcohol and sorbitol dehydrogenases. In: *Biochemistry*, Vol. 24, 27, S. 8005-8012.
- Elander, R. P. (2003): Industrial production of β -lactam antibiotics. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 61, 5, S. 385-392.
- Emmler, M.; Jungebloud, A.; Göcke, Y.; Cordes, C.; Horn, H. und Hempel, D. C. (2006): Apparent Delay of Product Secretion by Product Adsorption in *Aspergillus niger*. In: *Engineering in Life Sciences*, Vol. 6, 5, S. 488-491.
- Endo, Tetsuo und Koizumi, Satoshi (2001): Microbial Conversion with Cofactor Regeneration using Genetically Engineered Bacteria. In: *Advanced Synthesis & Catalysis*, Vol. 343, 6-7, S. 521-526.
- Escamilla-Alvarado, Carlos; Pérez-Pimienta, José A; Ponce-Noyola, Teresa und Poggi-Varaldo, Héctor M (2017): An overview of the enzyme potential in bioenergy-producing biorefineries. In: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, Vol. 92, 5, S. 906-924.
- European-Commission (2013): Regulation (EU) No 1306/2013 of the European Parliament and of the Council of 17 December 2013 on the Financing Management and Monitoring of the Common Agricultural Policy and Repealing Council Regulations (EEC) No. 352/78, (EC) No. 165/94, (EC) No. 2799/98, (EC) No. 814/2000, (EC) No. 1290/2005 and (EC) No. 485/2008, 59 pp. . In, Vol., S.
- Faber, Kurt; Fessner, Wolf-Dieter und Turner, Nicholas J. (2015): Engineering Biocatalysts for Synthesis Including Cascade Processes. In: *Advanced Synthesis & Catalysis*, Vol. 357, 8, S. 1565-1566.
- Fágáin, Ciarán Ó (1995): Understanding and increasing protein stability. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, Vol. 1252, 1, S. 1-14.
- Fargione, Joseph; Hill, Jason; Tilman, David; Polasky, Stephen und Hawthorne, Peter (2008): Land Clearing and the Biofuel Carbon Debt. In: *Science*, Vol. 319, 5867, S. 1235-1238.
- Findrik, Zvezdana und Vasić-Rački, Đurđa (2009): Bae, Overview on reactions with multi-enzyme systems. In: *Chemical and biochemical engineering quarterly*, Vol. 23, 4, S. 545-553.
- Finnegan, M.; Linley, E.; Denyer, S. P.; McDonnell, G.; Simons, C. und Maillard, J. Y. (2010): Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. In: *J Antimicrob Chemother*, Vol. 65, 10, S. 2108-15.
- Flickinger, Michael C; Lacy, William B; Glenna, Leland; Biscotti, Dina und Welsh, Rick (2009): *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. Wiley, Hoboken, NJ.
- Fulmer, Ellis I.; Christensen, L. M. und Kendali, A. R. (1933): Production of 2,3-Butylene Glycol by Fermentation. In: *Industrial & Engineering Chemistry*, Vol. 25, 7, S. 798-800.
- Gallati, H (1979): Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien sowie Optimierung der Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 2, 2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6))(ABTS). In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol. 17, 1, S. 1-8.
- Gao, J.; Xu, H.; Li, Q. J.; Feng, X. H. und Li, S. (2010): Optimization of medium for one-step fermentation of inulin extract from Jerusalem artichoke tubers using *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 to produce R, R-2,3-butanediol. In: *Bioresour Technol*, Vol. 101, S.
- García-Junceda, Eduardo; Lavandera, Iván; Rother, Dörte und Schrittwieser, Joerg H. (2015): (Chemo)enzymatic cascades— Nature's synthetic strategy transferred to the laboratory. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 114, S. 1-6.
- Gavrilescu, Maria und Chisti, Yusuf (2005): Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. In: *Biotechnology Advances*, Vol. 23, 7, S. 471-499.
- Gemeiner, P (1992): *Materials for enzyme engineering*. Ellis Horwood, New York, NY: 13-119.
- George, A. und Wilson, W. W. (1994): Predicting protein crystallization from a dilute solution property. In: *Acta Crystallographica Section D*, Vol. 50, 4, S. 361-365.
- Gianfreda, Liliana und Scarfi, Maria Rosaria (1991): Enzyme stabilization: state of the art. In: *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 100, 2, S. 97-128.
- Gmelch, Tobias J.; Sperl, Josef M. und Sieber, Volker (2019): Optimization of a reduced enzymatic reaction cascade for the production of L-alanine. In: *Scientific Reports*, Vol. 9, 1, S. 11754.

- Grazú, Valeria; Abian, Olga; Mateo, Cesar; Batista-Viera, Franciso; Fernández-Lafuente, Roberto und Guisán, José Manuel (2005): Stabilization of enzymes by multipoint immobilization of thiolated proteins on new epoxy-thiol supports. In: *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 90, 5, S. 597-605.
- Grimm, V; Braun, M; Teichert, O und Zweck, A (2011): Biomasse–Rohstoff der Zukunft für die chemische Industrie. In: *Zukünftige Technologien*, Vol., 90, S.
- Gupta, M. N. und Mattiasson, B. (2006): Unique Applications of Immobilized Proteins in Bioanalytical Systems. In: (Hrsg.) *Methods of Biochemical Analysis*. John Wiley & Sons, Inc.: S. 1-34.
- Gusakov, Alexander V. (2013): Cellulases and hemicellulases in the 21st century race for cellulosic ethanol. In: *Biofuels*, Vol. 4, 6, S. 567-569.
- Guterl, Jan-Karl; Garbe, Daniel; Carsten, Jörg; Steffler, Fabian; Sommer, Bettina; Reiß, Steven; Philipp, Anja et al. (2012): Cell-Free Metabolic Engineering: Production of Chemicals by Minimized Reaction Cascades. In: *ChemSusChem*, Vol. 5, 11, S. 2165-2172.
- Guterl, Jan-Karl und Sieber, Volker (2013): Biosynthesis “debugged”: Novel bioproduction strategies. In: *Engineering in Life Sciences*, Vol. 13, 1, S. 4-18.
- H. Clark, James; E. I. Deswarte, Fabien und J. Farmer, Thomas (2009): The integration of green chemistry into future biorefineries. In: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, Vol. 3, 1, S. 72-90.
- Haider, Toshiba und Husain, Qayyum (2007): Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. In: *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 41, 1, S. 72-80.
- Hamilton, S. R.; Bobrowicz, P.; Bobrowicz, B.; Davidson, R. C.; Li, H.; Mitchell, T.; Nett, J. H. et al. (2003): Production of complex human glycoproteins in yeast. In: *Science*, Vol. 301, 5637, S. 1244-6.
- Hatti-Kaul, Rajni; Törnqvist, Ulrika; Gustafsson, Linda und Börjesson, Pål (2007): Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective. In: *Trends in Biotechnology*, Vol. 25, 3, S. 119-124.
- Hodgman, C. Eric und Jewett, Michael C. (2012): Cell-free synthetic biology: Thinking outside the cell. In: *Metabolic Engineering*, Vol. 14, 3, S. 261-269.
- Honda, Susumu; Akao, Eiko; Suzuki, Shigeo; Okuda, Masahiro; Kakehi, Kazuaki und Nakamura, Jun (1989): High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. In: *Analytical Biochemistry*, Vol. 180, 2, S. 351-357.
- Huang, H. -J.; Liu, L. -M.; Li, Y.; Du, G. -C. und Chen, J. (2006): Redirecting Carbon Flux in *Torulopsis glabrata* from Pyruvate to α -Ketoglutaric Acid by Changing Metabolic Co-factors. In: *Biotechnology Letters*, Vol. 28, 2, S. 95-98.
- Huang, Hua-Jiang; Ramaswamy, Shri; Tschirner, UW und Ramarao, BV (2008): A review of separation technologies in current and future biorefineries. In: *Separation and Purification Technology*, Vol. 62, 1, S. 1-21.
- Icha P., Kuhs G. (2017): Entwicklung der spezifischen Kohlendioxid-Emissionen des deutschen Strommix in den Jahren 1990 - 2016. In: *Umweltbundesamt*, Vol., S.
- Iyer, Padma V. und Ananthanarayan, Laxmi (2008): Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. In: *Process Biochemistry*, Vol. 43, 10, S. 1019-1032.
- Jandt, U.; You, C.; Zhang, Y. H.-P. und Zeng, A.-P. (2013): Compartmentalization and Metabolic Channeling for Multienzymatic Biosynthesis: Practical Strategies and Modeling Approaches. In: An-Ping Zeng (Hrsg.) *Fundamentals and Application of New Bioproduction Systems*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, S. 41-65.
- Jankowski, Matthew D.; Henry, Christopher S.; Broadbelt, Linda J. und Hatzimanikatis, Vassily (2008): Group Contribution Method for Thermodynamic Analysis of Complex Metabolic Networks. In: *Biophysical Journal*, Vol. 95, 3, S. 1487-1499.
- Jaturapaktrarak, Chalisa; Napathorn, Suchada; Chanprateep; Cheng, Maria; Okano, Kenji; Ohtake, Hisao und Honda, Kohsuke (2014): In vitro conversion of glycerol to lactate with thermophilic enzymes. In: *Bioresources and Bioprocessing*, Vol. 1, 1, S. 1-8.
- Ji, Xiao-Jun; Huang, He; Du, Jun; Zhu, Jian-Guo; Ren, Lu-Jing; Hu, Nan und Li, Shuang (2009): Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. In: *Bioresource Technology*, Vol. 100, 13, S. 3410-3414.
- Ji, Xiao-Jun; Huang, He und Ouyang, Ping-Kai (2011): Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. In: *Biotechnology Advances*, Vol. 29, 3, S. 351-364.
- Ji, Xiao-Jun; Huang, He; Zhu, Jian-Guo; Ren, Lu-Jing; Nie, Zhi-Kui; Du, Jun und Li, Shuang (2010): Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2, 3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 85, 6, S. 1751-1758.
- Jia, Kaizhi; Zhang, Yanping und Li, Yin (2010): Systematic engineering of microorganisms to improve alcohol tolerance. In: *Engineering in Life Sciences*, Vol. 10, 5, S. 422-429.

- Jones, J Bryan und DeSantis, Grace (1999): Toward understanding and tailoring the specificity of synthetically useful enzymes. In: *Accounts of chemical research*, Vol. 32, 2, S. 99-107.
- Jörnvall, H. (2008): Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : MDR and SDR gene and protein superfamilies. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, Vol. 65, 24, S. 3873-3878.
- Jörnvall, H.; Persson, M. und Jeffery, J. (1981): Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 78, 7, S. 4226-4230.
- Jörnvall, Hans; Persson, Bengt; Krook, Maria; Atrian, Silvia; Gonzalez-Duarte, Roser; Jeffery, Jonathan und Ghosh, Debashis (1995): Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). In: *Biochemistry*, Vol. 34, 18, S. 6003-6013.
- Jung, Hyun M.; Koh, Jeong H.; Kim, Mahn-Joo und Park, Jaiwook (2000): Concerted Catalytic Reactions for Conversion of Ketones or Enol Acetates to Chiral Acetates. In: *Organic Letters*, Vol. 2, 3, S. 409-411.
- Kameda, Atsushi; Shiba, Toshikazu; Kawazoe, Yumi; Satoh, Yasuharu; Ihara, Yoshiharu; Munekata, Masanobu; Ishige, Kazuya et al. (2001): A novel ATP regeneration system using polyphosphate-AMP phosphotransferase and polyphosphate kinase. In: *J Biosci Bioeng*, Vol. 91, 6, S. 557-563.
- Kamm, B. und Kamm, M. (2004): Principles of biorefineries. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 64, 2, S. 137-145.
- Kamm, Birgit (2007): Produktion von Plattformchemikalien und Synthesegas aus Biomasse. In: *Angewandte Chemie*, Vol. 119, 27, S. 5146-5149.
- Kamm, Birgit; Gruber, Patrick R. und Kamm, Michael (2007): Biorefineries—Industrial Processes and Products. In: (Hrsg.) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: S.
- Kamm, Birgit; Kamm, Michael; Gruber, Patrick R. und Kromus, Stefan (2008): Biorefinery Systems – An Overview. In: (Hrsg.) Biorefineries-Industrial Processes and Products. Wiley-VCH Verlag GmbH: S. 1-40.
- Kamm, Birgit; Kamm, Michael und Soyes, K (1997): Die Grüne Bioraffinerie—Ein Ökologisches Technologiekonzept für regional nachhaltige Produktions- und Wertschöpfungsprozesse. *Erweiterte Tagungsmaterialien des 1. Symposium 'Grüne Bioraffinerie'* Brandenburgisches Umweltforschungszentrum Neuruppin, 8-9-10.
- Kang, S. W.; Park, Y. S.; Lee, J. S.; Hong, S. I. und Kim, S. W. (2004): Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. In: *Bioresource Technology*, Vol. 91, 2, S. 153-156.
- Katchalski-Katzir, E. (1993): Immobilized enzymes—learning from past successes and failures. In: *Trends Biotechnol*, Vol. 11, 11, S. 471-8.
- Kay, Jennifer E. und Jewett, Michael C. (2015): Lysate of engineered *Escherichia coli* supports high-level conversion of glucose to 2,3-butanediol. In: *Metabolic Engineering*, Vol. 32, S. 133-142.
- Kim, Mahn-Joo; Park, Jaiwook und Choi, Yoon Kyung (2008): Asymmetric transformations by coupled enzyme and metal catalysis: dynamic kinetic resolution. In: *Multi-Step Enzyme Catalysis*, Vol., S.
- Kim, Seonghun und Lee, Sun Bok (2006): Catalytic Promiscuity in Dihydroxy-Acid Dehydratase from the Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. In: *Journal of Biochemistry*, Vol. 139, 3, S. 591-596.
- Klein-Marcuschamer, D.; Ajikumar, P. K. und Stephanopoulos, G. (2007): Engineering microbial cell factories for biosynthesis of isoprenoid molecules: beyond lycopene. In: *Trends Biotechnol*, Vol. 25, 9, S. 417-24.
- Klibanov, Alexander M. (2001): Improving enzymes by using them in organic solvents. In: *Nature*, Vol. 409, 6817, S. 241-246.
- Kochergin, Vadim und Kearney, Mike (2006): Existing biorefinery operations that benefit from fractal-based process intensification. *Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Springer.
- Kornberg, Arthur (2009): Chapter 1 Why Purify Enzymes? In: Richard R. Burgess and Murray P. Deutscher (Hrsg.) *Methods in Enzymology*. Academic Press: S. 3-6.
- Koutinas, Apostolis A; Wang, Rouhang; Campbell, Grant M und Webb, Colin (2008): A Whole Crop Biorefinery System: A Closed System for the Manufacture of Non-food Products from Cereals. In: *Biorefineries-Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*, Vol., S. 165-191.
- Koutinas, Apostolis A.; Yopez, Bernardo; Kopsahelis, Nikolaos; Freire, Denise M. G.; Castro, Aline Machado de; Papanikolaou, Seraphim und Kookos, Ioannis K. (2016): Techno-economic evaluation of complete bioprocess for 2,3-butanediol production from renewable resources. In: *Bioresource Technology*, Vol., S.
- Kromus, S; Wachter, B; Koschuh, W; Mandl, M; Krotscheck, C und Narodoslawsky, M (2004): The green biorefinery Austria-development of an integrated system for green biomass utilization. In: *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, Vol. 18, 1, S. 8-12.
- Kroutil, Wolfgang (2014): Cascades involving alcohol dehydrogenases and transaminases. In: *Presentation SysBioCat*, Vol., S.
- Kubicek, Christian P.; Karaffa, Levente und Flickinger, Michael C. (2009): Citric Acid Processes. In: (Hrsg.) *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. John Wiley & Sons, Inc.: S.
- Kumar, Rajeev; Tabatabaei, Meisam; Karimi, Keikhosro und Sárvári Horváth, Ilona (2016): Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol-A review. In: *Biofuel Research Journal*, Vol. 3, 1, S. 347-356.
- Kwok, Roberta (2010): Five Hard Truths for Synthetic Biology. In: *Nature News*, Vol. 463, S.

- Ladenstein, R.; Winberg, J. O. und Benach, J. (2008): Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Structure-function relationships in short-chain alcohol dehydrogenases. In: *Cell Mol Life Sci*, Vol. 65, 24, S. 3918-35.
- Lamble, Henry J.; Theodossis, Alex; Milburn, Christine C.; Taylor, Garry L.; Bull, Steven D.; Hough, David W. und Danson, Michael J. (2005): Promiscuity in the part-phosphorylative Entner–Doudoroff pathway of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. In: *FEBS Letters*, Vol. 579, 30, S. 6865-6869.
- Lee, Linda G. und Whitesides, George M. (1986): Preparation of optically active 1,2-diols and .alpha.-hydroxy ketones using glycerol dehydrogenase as catalyst. Limits to enzyme-catalyzed synthesis due to noncompetitive and mixed inhibition by product. In: *The Journal of Organic Chemistry*, Vol. 51, 1, S. 25-36.
- Li, Dan; Dai, Jian-Ying und Xiu, Zhi-Long (2010): A novel strategy for integrated utilization of Jerusalem artichoke stalk and tuber for production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. In: *Bioresource Technology*, Vol. 101, 21, S. 8342-8347.
- Liu, Yongfeng; Zhang, Shuling; Yong, Yang-Chun; Ji, Zhixia; Ma, Xin; Xu, Zhenghong und Chen, Shouwen (2011): Efficient production of acetoin by the newly isolated *Bacillus licheniformis* strain MEL09. In: *Process Biochemistry*, Vol. 46, 1, S. 390-394.
- Logan, B. E. (2004): Extracting hydrogen and electricity from renewable resources. In: *Environ Sci Technol*, Vol. 38, 9, S. 160a-167a.
- Logan, Bruce E. und Regan, John M. (2006): Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. In: *Trends in Microbiology*, Vol. 14, 12, S. 512-518.
- Lopalco, A.; Dalwadi, G.; Niu, S.; Schowen, R. L.; Douglas, J. und Stella, V. J. (2016): Mechanism of Decarboxylation of Pyruvic Acid in the Presence of Hydrogen Peroxide. In: *J Pharm Sci*, Vol. 105, 2, S. 705-713.
- Lopez-Gallego, Fernando und Schmidt-Dannert, Claudia (2010): Multi-enzymatic synthesis. In: *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 14, 2, S. 174-183.
- Luckarift, Heather R; Spain, Jim C; Naik, Rajesh R und Stone, Morley O (2004): Enzyme immobilization in a biomimetic silica suport. AIR FORCE RESEARCH LAB TYNDALL AFB FL MATERIALS AND MANUFACTURING DIRECTORATE/AIRBASE TECHNOLOGIES DIV.
- Lv, Pengmei; Yuan, Zhenhong; Wu, Chuangzhi; Ma, Longlong; Chen, Yong und Tsubaki, Noritatsu (2007): Bio-syngas production from biomass catalytic gasification. In: *Energy Conversion and Management*, Vol. 48, 4, S. 1132-1139.
- Lynd, Lee R.; Laser, Mark S.; Bransby, David; Dale, Bruce E.; Davison, Brian; Hamilton, Richard; Himmel, Michael et al. (2008): How biotech can transform biofuels. In: *Nat Biotech*, Vol. 26, 2, S. 169-172.
- Ma, C.; Wang, A.; Qin, J.; Li, L.; Ai, X.; Jiang, T.; Tang, H. et al. (2009): Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 82, S.
- Maddox, Ian S. (1996): Microbial Production of 2,3-Butanediol. In: (Hrsg.) *Biotechnology*. S.
- Maeda, Toshinari; Sanchez-Torres, Viviana und Wood, Thomas K. (2008): Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. In: *Microbial Biotechnology*, Vol. 1, 1, S. 30-39.
- Maity, Sunil K (2015): Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 43, S. 1427-1445.
- Mandl, M. G. (2010): Status of green biorefining in Europe. In: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, Vol. 4, 3, S. 268-274.
- Markets, Research and (2017): *Global Succinic Acid Market Insights, Opportunity Analysis, Market Shares and Forecast 2017 - 2023*. In, Vol., S.
- Marlow, Victoria A.; Rea, Dean; Najmudin, Shabir; Wills, Martin und Fülöp, Vilmos (2013): Structure and Mechanism of Acetolactate Decarboxylase. In: *ACS Chemical Biology*, Vol., S.
- Marshall, Shannon A.; Lazar, Greg A.; Chirino, Arthur J. und Desjarlais, John R. (2003): Rational design and engineering of therapeutic proteins. In: *Drug Discovery Today*, Vol. 8, 5, S. 212-221.
- Martín del Campo, Julia S.; Rollin, Joseph; Myung, Suwan; Chun, You; Chandrayan, Sanjeev; Patiño, Rodrigo; Adams, Michael W. W. et al. (2013): High-Yield Production of Dihydrogen from Xylose by Using a Synthetic Enzyme Cascade in a Cell-Free System. In: *Angewandte Chemie*, Vol. 125, 17, S. 4685-4688.
- Mata, Teresa M; Martins, Antonio A und Caetano, Nidia S (2010): Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. In: *Renewable and sustainable energy reviews*, Vol. 14, 1, S. 217-232.
- Maurer, Dirk (2018): *Structure Function Relationships in Pyrimidine Degrading and Biocatalytic Enzymes, and Their Implications for Cancer Therapy and Green Chemistry*. Doctoral thesis, comprehensive summary, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- Maynard, J. und Georgiou, G. (2000): Antibody engineering. In: *Annu Rev Biomed Eng*, Vol. 2, S. 339-76.
- Milburn, Christine C.; Lamble, Henry J.; Theodossis, Alex; Bull, Steven D.; Hough, David W.; Danson, Michael J. und Taylor, Garry L. (2006): The Structural Basis of Substrate Promiscuity in Glucose Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. In: *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281, 21, S. 14796-14804.

- Moes, J.; Griot, M.; Keller, J.; Heinzle, E.; Dunn, I. J. und Bourne, J. R. (1985): A microbial culture with oxygen-sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. In: *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 27, 4, S. 482-489.
- Mohamad, Nur Royhaila; Marzuki, Nur Haziqah Che; Buang, Nor Aziah; Huyop, Fahrul und Wahab, Roswanira Abdul (2015): An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. In: *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Vol. 29, 2, S. 205-220.
- Mosbach, K und BRODELIUS, P (1987): Immobilized enzymes and cells. B. II: Immobilization technique for cells/organelles. In: *Methods Enzymol*, Vol. 135, S. 171-472.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods Enzymol*, Vol. 155, S. 335-50.
- Myung, Suwan; Rollin, Joseph; You, Chun; Sun, Fangfang; Chandrayan, Sanjeev; Adams, Michael W. W. und Zhang, Y. H. Percival (2014): In vitro metabolic engineering of hydrogen production at theoretical yield from sucrose. In: *Metabolic Engineering*, Vol. 24, 0, S. 70-77.
- Nagorski, R. W. und Richard, John P. (1996): Mechanistic Imperatives for Enzymatic Catalysis of Aldose–Ketose Isomerization: Isomerization of Glyceraldehyde in Weakly Alkaline Aqueous Solution Occurs with Intramolecular Transfer of a Hydride Ion. In: *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 118, 31, S. 7432-7433.
- Nagorski, R. W. und Richard, John P. (2001): Mechanistic Imperatives for Aldose–Ketose Isomerization in Water: Specific, General Base- and Metal Ion-Catalyzed Isomerization of Glyceraldehyde with Proton and Hydride Transfer. In: *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 123, 5, S. 794-802.
- Nakashimada, Y.; Marwoto, B.; Kashiwamura, T.; Kakizono, T. und Nishio, N. (2000): Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. In: *J Biosci Bioeng*, Vol. 90, 6, S. 661-4.
- Nawaz, Muhammad Asif; Rehman, Haneef Ur; Bibi, Zainab; Aman, Afsheen und Qader, Shah Ali Ul (2015): Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix. In: *Biochemistry and Biophysics Reports*, Vol. 4, S. 250-256.
- Nichols, Nancy N.; Dien, Bruce S.; López, Maria J. und Moreno, Joaquín (2010): Use of *Coniochaeta ligniaria* to Detoxify Fermentation Inhibitors Present in Cellulosic Sugar Streams. In: (Hrsg.) *Biocatalysis and Biomolecular Engineering*. John Wiley & Sons, Inc.: S. 253-263.
- Niehaus, F.; Bertoldo, C.; Kähler, M. und Antranikian, G. (1999a): Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 51, S.
- Niehaus, F.; Bertoldo, C.; Kähler, M. und Antranikian, G. (1999b): Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 51, 6, S. 711-729.
- Nilegaonkar, S.; Bhosale, S. B.; Kshirsagar, D. C. und Kapadi, A. H. (1992): Production of 2,3-butanediol from glucose by *Bacillus licheniformis*. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 8, 4, S. 378-381.
- Nordling, E.; Jornvall, H. und Persson, B. (2002): Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modeling. In: *Eur J Biochem*, Vol. 269, 17, S. 4267-76.
- Nowak, Claudia; Beer, Barbara; Pick, André; Roth, Teresa; Lommes, Petra und Sieber, Volker (2015): A water-forming NADH oxidase from *Lactobacillus pentosus* suitable for the regeneration of synthetic biomimetic cofactors. In: *Frontiers in Microbiology*, Vol. 6, 957, S.
- O'driscoll, KF (1976): [12] Techniques of enzyme entrapment in gels. In: *Methods Enzymol*, Vol. 44, S. 169-183.
- OECD (2011): *Future Prospects for Industrial Biotechnology*. OECD Publishing.
- Oppermann, Udo; Filling, Charlotta; Hult, Malin; Shafqat, Naeem; Wu, Xiaoqiu; Lindh, Monica; Shafqat, Jawedet al. (2003): Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. In: *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 143-144, S. 247-253.
- Otagiri, Masato; Kurisu, Genji; Swaminathan, S.; Ui, Sadaharu; Yoneda, Satoshi; Ohkuma, Moriya; Kudo, Toshiaki et al. (2001a): Crystallization and preliminary X-ray studies of meso-2,3-butanediol dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae* IAM1063. In: *Acta Crystallographica Section D*, Vol. 57, 6, S. 857-859.
- Otagiri, Masato; Kurisu, Genji; Ui, Sadaharu; Takusagawa, Yusuke; Ohkuma, Moriya; Kudo, Toshiaki und Kusunoki, Masami (2001b): Crystal Structure of meso-2, 3-Butanediol Dehydrogenase in a Complex with NAD⁺ and Inhibitor Mercaptoethanol at 1.7 Å Resolution for Understanding of Chiral Substrate Recognition Mechanisms. In: *The Journal of Biochemistry*, Vol. 129, 2, S. 205-208.
- Otagiri, Masato; Ui, Sadaharu; Takusagawa, Yusuke; Ohtsuki, Takashi; Kurisu, Genji und Kusunoki, Masami (2010): Structural basis for chiral substrate recognition by two 2,3-butanediol dehydrogenases. In: *FEBS Letters*, Vol. 584, 1, S. 219-223.
- Öztürk, Banu (2001): Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports. İzmir Institute of Technology.
- Pereira, Sueli Essado; Fernandes, Kátia Flávia und Ulhoa, Cirano José (2017): Immobilization of *Cryptococcus flavus* α -amylase on glass tubes and its application in starch hydrolysis. In: *Starch - Stärke*, Vol. 69, 3-4, S. 1600189-n/a.

- Persson, Bengt; Kallberg, Yvonne; Oppermann, Udo und Jörnvall, Hans (2003): Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). In: *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 143–144, S. 271-278.
- Persson, Bengt; Zigler, J. Samuel und Jörnvall, Hans (1994): A Super-Family of Medium-Chain Dehydrogenases/Reductases (MDR). In: *Eur J Biochem*, Vol. 226, 1, S. 15-22.
- Pick, André; Schmid, Jochen und Sieber, Volker (2015): Characterization of uronate dehydrogenases catalysing the initial step in an oxidative pathway. In: *Microbial Biotechnology*, Vol. 8, 4, S. 633-643.
- Rafter, Gale W. und Colowick, Sidney P. (1957): [127] Enzymatic preparation of DPNH and TPNH. In: *Methods Enzymol*, Vol. 3, S. 887-890.
- Rehm, H-J (2013): *Industrielle mikrobiologie*. Springer-Verlag.
- Resnick, Sol M. und Zehnder, Alexander J. B. (2000): In Vitro ATP Regeneration from Polyphosphate and AMP by Polyphosphate:AMP Phosphotransferase and Adenylate Kinase from *Acinetobacter johnsonii* 210A. In: *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, 5, S. 2045-2051.
- Robertson, George H; Wong, Dominic WS; Lee, Charles C; Wagschal, Kurt; Smith, Michael R und Orts, William J (2006): Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54, 2, S. 353-365.
- Rollin, Joseph A.; Tam, Tsz Kin und Zhang, Y. H. Percival (2013): New biotechnology paradigm: cell-free biosystems for biomanufacturing. In: *Green Chemistry*, Vol. 15, 7, S. 1708-1719.
- Rühmann, Broder; Schmid, Jochen und Sieber, Volker (2014): Fast carbohydrate analysis via liquid chromatography coupled with ultra violet and electrospray ionization ion trap detection in 96-well format. In: *Journal of Chromatography A*, Vol. 1350, 0, S. 44-50.
- Rupp, Bernhard und Wang, Junwen (2004): Predictive models for protein crystallization. In: *Methods*, Vol. 34, 3, S. 390-407.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B. et al. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science*, Vol. 239, 4839, S. 487-91.
- Sauer, M.; Porro, D.; Mattanovich, D. und Branduardi, P. (2008): Microbial production of organic acids: expanding the markets. In: *Trends Biotechnol*, Vol. 26, 2, S. 100-8.
- Schmid, Rolf D. (1979): *Stabilized soluble enzymes*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Schwarz, Dominik; Dörrstein, Jörg; Kugler, Sabine; Schieder, Doris; Zollfrank, Cordt und Sieber, Volker (2016): Integrated biorefinery concept for grass silage using a combination of adapted pulping methods for advanced saccharification and extraction of lignin. In: *Bioresource Technology*, Vol. 216, S. 462-470.
- Scism, Robert A. und Bachmann, Brian O. (2010): Five-Component Cascade Synthesis of Nucleotide Analogues in an Engineered Self-Immobilized Enzyme Aggregate. In: *ChemBioChem*, Vol. 11, 1, S. 67-70.
- Sheldon, Roger A (1994): Consider the environmental quotient. In: *CHEMTECH*; (United States), Vol. 24, 3, S.
- Short, Walter; Packey, Daniel J und Holt, Thomas (1995): *A manual for the economic evaluation of energy efficiency and renewable energy technologies*. National Renewable Energy Lab., Golden, CO (United States).
- Sieker, Tim; Neuner, Andreas; Dimitrova, Darina; Tippkötter, Nils; Muffler, Kai; Bart, Hans-Jörg; Heinzle, Elmarek al. (2011): Ethanol production from grass silage by simultaneous pretreatment, saccharification and fermentation: First steps in the process development. In: *Engineering in Life Sciences*, Vol. 11, 4, S. 436-442.
- Sims, Ralph E. H.; Mabee, Warren; Saddler, Jack N. und Taylor, Michael (2010): An overview of second generation biofuel technologies. In: *Bioresource Technology*, Vol. 101, 6, S. 1570-1580.
- Somerville, Chris; Youngs, Heather; Taylor, Caroline; Davis, Sarah C. und Long, Stephen P. (2010): Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels. In: *Science*, Vol. 329, 5993, S. 790-792.
- Sommer, Bettina; von Moeller, Holger; Haack, Martina; Qoura, Farah; Langner, Clemens; Bourenkov, Gleb; Garbe, Daniele et al. (2015): Detailed Structure–Function Correlations of *Bacillus subtilis* Acetolactate Synthase. In: *ChemBioChem*, Vol. 16, 1, S. 110-118.
- Song, Hyohak und Lee, Sang Yup (2006): Production of succinic acid by bacterial fermentation. In: *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 39, 3, S. 352-361.
- Sperl, Josef M. und Sieber, Volker (2018): Multienzyme Cascade Reactions—Status and Recent Advances. In: *ACS Catalysis*, Vol. 8, 3, S. 2385-2396.
- Steffler, Fabian; Guterl, Jan-Karl und Sieber, Volker (2013): Improvement of thermostable aldehyde dehydrogenase by directed evolution for application in Synthetic Cascade Biomanufacturing. In: *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 53, 5, S. 307-314.
- Steffler, Fabian und Sieber, Volker (2013): Refolding of a Thermostable Glyceraldehyde Dehydrogenase for Application in Synthetic Cascade Biomanufacturing. In: *PLoS ONE*, Vol. 8, 7, S. e70592.
- Stoll, Vincent S und Blanchard, John S (2009): Buffers: Principles and Practice I. In: *Guide to Protein Purification*, Vol. 463, S. 43.
- Stottmeister, U.; Aurich, A.; Wilde, H.; Andersch, J.; Schmidt, S. und Sicker, D. (2005): White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses. In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 32, 11, S. 651-664.
- Straathof, Adrie JJ und Adlercreutz, Patrick (2000): *Applied biocatalysis*. CRC Press.

- Studier, F. William (2005): Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. In: *Protein Expression and Purification*, Vol. 41, 1, S. 207-234.
- Šulek, Franja; Fernández, Daniel Pérez; Knez, Željko; Habulin, Maja und Sheldon, Roger A (2011): Immobilization of horseradish peroxidase as crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). In: *Process Biochemistry*, Vol. 46, 3, S. 765-769.
- Sun, Jianan; Rao, Ben; Zhang, Liaoyuan; Shen, Yaling und Wei, Dongzhi (2012): Extraction of acetoin from fermentation broth using an acetone/phosphate aqueous two-phase system. In: *Chemical Engineering Communications*, Vol. 199, 11, S. 1492-1503.
- Szekrenyi, Anna; Soler, Anna; Garrabou, Xavier; Guérard-Hélaine, Christine; Parella, Teodor; Joglar, Jesús; Lemaire, Marielle et al. (2014): Engineering the Donor Selectivity of D-Fructose-6-Phosphate Aldolase for Biocatalytic Asymmetric Cross-Aldol Additions of Glycolaldehyde. In: *Chemistry – A European Journal*, Vol. 20, 39, S. 12572-12583.
- Tanaka, Atsuo und Tosa, Tetsuya (1992): *Industrial application of immobilized biocatalysts*. CRC Press.
- Thang, Vu Hong und Novalin, Senad (2008): Green Biorefinery: Separation of lactic acid from grass silage juice by chromatography using neutral polymeric resin. In: *Bioresource Technology*, Vol. 99, 10, S. 4368-4379.
- Tiwari, Manish Kumar; Singh, Raushan Kumar; Singh, Ranjitha; Jeya, Marimuthu; Zhao, Huimin und Lee, Jung-Kul (2012): Role of Conserved Glycine in Zinc-dependent Medium Chain Dehydrogenase/Reductase Superfamily In: *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 287, 23, S. 19429-19439.
- Tosa, T.; Mori, T.; Fuse, N. und Chibata, I. (1966): Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase. In: *Enzymologia*, Vol. 31, 4, S. 214-24.
- Toteva, Maria M.; Silvaggi, Nicholas R.; Allen, Karen N. und Richard, John P. (2011): Binding Energy and Catalysis by d-Xylose Isomerase: Kinetic, Product, and X-ray Crystallographic Analysis of Enzyme-Catalyzed Isomerization of (R)-Glyceraldehyde. In: *Biochemistry*, Vol. 50, 46, S. 10170-10181.
- Tran, Daniel N. und Balkus, Kenneth J. (2011): Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. In: *ACS Catalysis*, Vol. 1, 8, S. 956-968.
- Trevan, Michael D (1980): *Immobilized enzymes: An introduction and applications in biotechnology*. John Wiley & Sons Inc.
- Türk, Oliver (2014): *Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe*. In: *Grundlagen-Werkstoffe-Anwendungen*, Wiesbaden, Vol., S.
- van Dam, Jan E. G.; de Klerk-Engels, Barbara; Struik, Paul C. und Rabbinge, Rudy (2005): Securing renewable resource supplies for changing market demands in a bio-based economy. In: *Industrial Crops and Products*, Vol. 21, 1, S. 129-144.
- van den Burg, Bertus (2003): Extremophiles as a source for novel enzymes. In: *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 6, 3, S. 213-218.
- van der Oost, J; Ahmed, H; Ettema, T; Tjaden, B; Geerling, A und Siebers, Bettina (2005): The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: a re-evaluation. In: *Biochem. J*, Vol. 390, S. 529-540.
- Vandamme, Erick J (1984): *Biotechnology of industrial antibiotics*. M. Dekker.
- Venkata Mohan, S.; Nikhil, G. N.; Chiranjeevi, P.; Nagendranatha Reddy, C.; Rohit, M. V.; Kumar, A. Naresh und Sarkar, Omprakash (2016): Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. In: *Bioresource Technology*, Vol. 215, S. 2-12.
- Verseck, S; Karau, A und Weber, M (2007): Fermentative Herstellung von alpha-Ketoglutarsäure. In: *Evonik Degussa GmbH. Patent DE*, Vol. 10, 2007, S. 051.
- von Lampe, Martin; Co-operation, Organisation for Economic und Development (2008): *Biofuel support policies: An economic assessment*. OECD.
- Wang, Xiaodong; Saba, Tony; Yiu, Humphrey H. P.; Howe, Russell F.; Anderson, James A. und Shi, Jiafu (2017): Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways. In: *Chem*, Vol. 2, 5, S. 621-654.
- Wang, Y. und Zhang, Y. H. (2009): Cell-free protein synthesis energized by slowly-metabolized maltodextrin. In: *BMC Biotechnol*, Vol. 9, S. 58.
- Wegman, Margreth A; Janssen, Michiel H. A.; van Rantwijk, Fred und Sheldon, Roger A (2001): Towards Biocatalytic Synthesis of β -Lactam Antibiotics. In: *Advanced Synthesis & Catalysis*, Vol. 343, 6-7, S. 559-576.
- Weissenburger, H. W. O. und van der Hoeven, M. G. (1970): An efficient nonenzymatic conversion of benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid. In: *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, Vol. 89, 10, S. 1081-1084.
- Werpy, Todd; Petersen, Gene; Aden, A; Bozell, J; Holladay, J; White, J; Manheim, Amy et al. (2004): *Top value added chemicals from biomass. Volume 1-Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas*. Department of Energy Washington DC.
- Weusthuis, Ruud A.; Aarts, Jac M. M. J. G. und Sanders, Johan P. M. (2011): From biofuel to bioproduct: is bioethanol a suitable fermentation feedstock for synthesis of bulk chemicals? In: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, Vol. 5, 5, S. 486-494.

- Wichmann, Rolf; Wandrey, Christian; Bückmann, Andreas F. und Kula, Maria-Regina (2000): Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. In: *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 67, 6, S. 791-804.
- Wiegeshoff, Frank und Marahiel, Mohamed A. (2007): Characterization of a mutation in the acetolactate synthase of *Bacillus subtilis* that causes a cold-sensitive phenotype. In: *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 272, 1, S. 30-34.
- Wolterink-van Loo, Suzanne; van Eerde, André; Siemerink, M; Akerboom, Jasper; Dijkstra, B und van der Oost, John (2007): Biochemical and structural exploration of the catalytic capacity of *Sulfolobus* KDG aldolases. In: *Biochem. J*, Vol. 403, S. 421-430.
- Woodward, Jonathan; Orr, Mark; Cordray, Kimberley und Greenbaum, Elias (2000): Enzymatic production of biohydrogen. In: *Nature*, Vol. 405, S. 1014.
- Wyman, Charles E.; Dale, Bruce E.; Elander, Richard T.; Holtzapple, Mark; Ladisch, Michael R. und Lee, Y. Y. (2005): Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. In: *Bioresource Technology*, Vol. 96, 18, S. 2026-2032.
- Xiao, Z. J.; Liu, P. H.; Qin, J. Y. und Xu, P. (2007): Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 74, S.
- Xiao, Z. und Xu, P. (2007): Acetoin metabolism in bacteria. In: *Crit. Rev. Microbiol.*, Vol. 33, S.
- Xiu, Shuangning und Shahbazi, Abolghasem (2015): Development of Green Biorefinery for Biomass Utilization: A Review. In: *Trends in Renewable Energy*, Vol. 1, 1, S. 4-15.
- Xiu, Z. L. und Zeng, A. P. (2008): Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 78, 6, S. 917-26.
- Xu, Jikun; Dai, Lin; Gui, Yang; Yuan, Lan; Ma, Jianfeng und Zhang, Chuntao (2020): Towards a waste-free biorefinery: A cascade valorization of bamboo for efficient fractionation, enzymatic hydrolysis and lithium-sulfur cathode. In: *Industrial Crops and Products*, Vol. 149, S. 112364.
- Xue, Rui und Woodley, John M. (2012): Process technology for multi-enzymatic reaction systems. In: *Bioresource Technology*, Vol. 115, S. 183-195.
- Yang, Bin und Wyman, Charles E. (2008): Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. In: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, Vol. 2, 1, S. 26-40.
- Ye, Xiaoting; Honda, Kohsuke; Sakai, Takaaki; Okano, Kenji; Omasa, Takeshi; Hirota, Ryuichi; Kuroda, Akio et al. (2012): Synthetic metabolic engineering—a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway. In: *Microbial Cell Factories*, Vol. 11, 1, S. 120.
- Ye, Xinhao; Wang, Yiran; Hopkins, Robert C.; Adams, Michael W. W.; Evans, Barbara R.; Mielenz, Jonathan R. und Zhang, Y.-H. Percival (2009): Spontaneous High-Yield Production of Hydrogen from Cellulosic Materials and Water Catalyzed by Enzyme Cocktails. In: *ChemSusChem*, Vol. 2, 2, S. 149-152.
- Yilmaz, Elif; Can, Keziban; Sezgin, Mehmet und Yilmaz, Mustafa (2011): Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester. In: *Bioresource Technology*, Vol. 102, 2, S. 499-506.
- Zeikus, J. G.; Jain, M. K. und Elankovan, P. (1999): Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 51, 5, S. 545-552.
- Zeng, An-Ping; Biebl, Hanno und Deckwer, Wolf-Dieter (1990): 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes* in continuous culture: role of oxygen supply. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 33, 3, S. 264-268.
- Zhang, L.; Yang, Y.; Sun, J.; Shen, Y.; Wei, D.; Zhu, J. und Chu, J. (2010): Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30. In: *Bioresour Technol*, Vol. 101, S.
- Zhang, Liaoyuan; Xu, Quanming; Peng, Xiaoqian; Xu, Boheng; Wu, Yuehao; Yang, Yulong; Sun, Shujing et al. (2014): Cloning, expression and characterization of glycerol dehydrogenase involved in 2,3-butanediol formation in *Serratia marcescens* H30. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Vol., S. 1-9.
- Zhang, Y. H. (2015): Production of biofuels and biochemicals by in vitro synthetic biosystems: Opportunities and challenges. In: *Biotechnol Adv*, Vol. 33, 7, S. 1467-83.
- Zhang, Y. H. P. (2010a): Production of biocommodities and bioelectricity by cell-free synthetic enzymatic pathway biotransformations: challenges and opportunities. In: *Biotechnol Bioeng*, Vol. 105, S.
- Zhang, Y. H. Percival (2009): A sweet out-of-the-box solution to the hydrogen economy: is the sugar-powered car science fiction? In: *Energy & Environmental Science*, Vol. 2, 3, S. 272-282.
- Zhang, Y. H. Percival (2010b): Production of biocommodities and bioelectricity by cell-free synthetic enzymatic pathway biotransformations: Challenges and opportunities. In: *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 105, 4, S. 663-677.
- Zhang, Y. H. Percival; Evans, Barbara R.; Mielenz, Jonathan R.; Hopkins, Robert C. und Adams, Michael W. W. (2007): High-Yield Hydrogen Production from Starch and Water by a Synthetic Enzymatic Pathway. In: *PLOS ONE*, Vol. 2, 5, S. e456.
- Zhang, Yi-Heng P. (2011): Hydrogen Production from Carbohydrates: A Mini-Review.
- Zhao, Huimin und van der Donk, Wilfred A. (2003): Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. In: *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 14, 6, S. 583-589.

- Zhong, J. J. (2001): Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. In: *Adv Biochem Eng Biotechnol*, Vol. 72, S. 1-26.
- Zhu, J. Y. und Pan, X. J. (2010): Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. In: *Bioresource Technology*, Vol. 101, 13, S. 4992-5002.
- Zhu, J. Y.; Wang, G. S.; Pan, X. J. und Gleisner, R. (2009): Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification. In: *Chemical Engineering Science*, Vol. 64, 3, S. 474-485.
- Zhu, Zhiguang; Kin Tam, Tsz; Sun, Fangfang; You, Chun und Percival Zhang, Y. H. (2014): A high-energy-density sugar biobattery based on a synthetic enzymatic pathway. In: *Nature Communications*, Vol. 5, S. 3026.
- Zündorf, Ilse (2009): Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Von Cornel Mülhardt. In: *Pharmazie in unserer Zeit*, Vol. 38, 1, S. 96-97.

Anhang

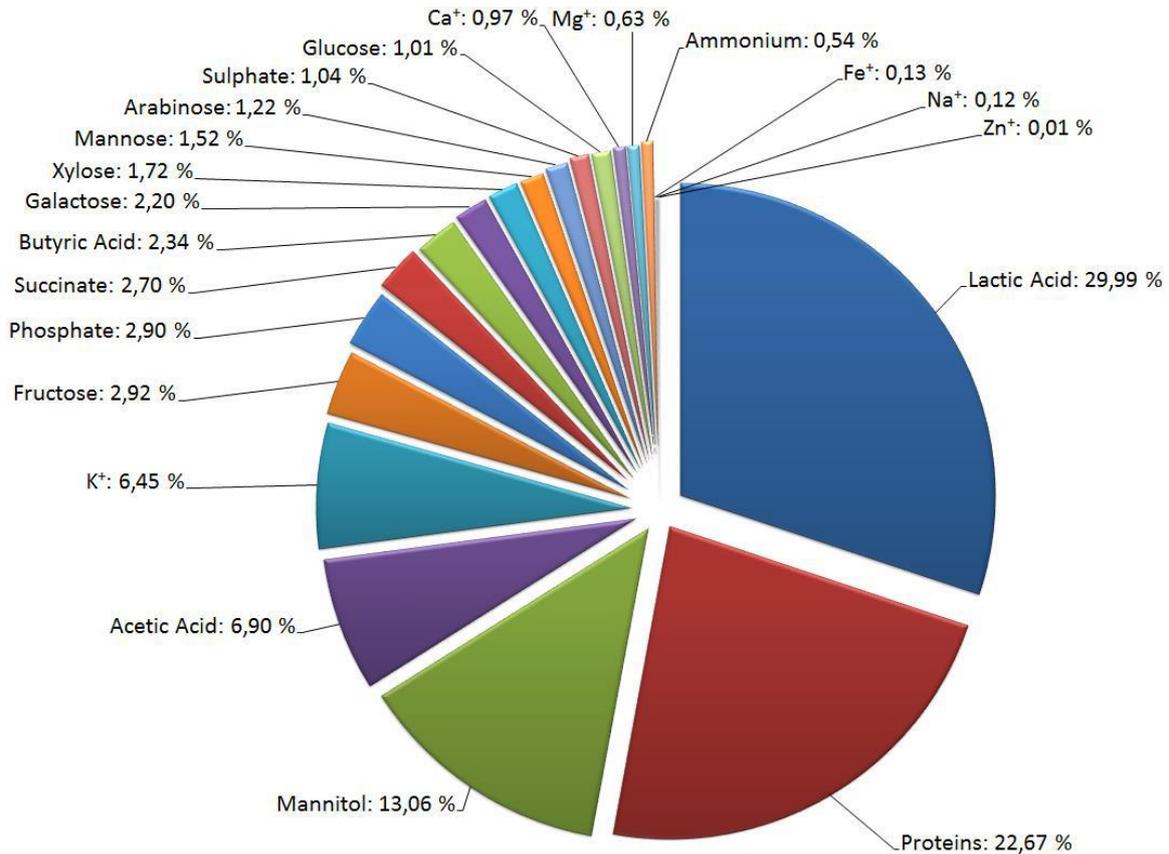
Anhang 1: Rohdaten zu Abbildung 4.3; Zeitlicher Verlauf aller detektierten Komponenten bei der Synthese von Ethanol aus Glukose mittels einer enzymatischen Reaktionskaskade. Glukose **Glc**; Glukonat **GluA**; Keto-Deoxyglukonat **KDG**; Glycerinaldehyd **GA**; Pyruvat **Pyr**; Glycerat **GlyA**; Acetaldehyd **AA**; Ethanol **EtOH**

t [h]	Glc [mM]		GluA [mM]		KDG [mM]		GA [mM]		Pyr [mM]		GlyA [mM]		AA [mM]		EtOH [mM]		NADH [mM]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
0	22,20	2,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16	0,03
0,5	15,98	0,59	2,38	0,02	0,48	-	-	-	-	-	0,91	0,12	-	-	1,28	0,04	3,22	0,15
1	14,52	0,50	2,54	0,05	0,49	0,04	-	-	-	-	1,28	0,02	-	-	2,76	0,15	3,55	0,13
1,5	14,10	0,82	2,46	0,03	0,46	0,01	-	-	-	-	1,74	0,20	-	-	4,27	0,03	3,54	0,08
2	13,12	0,14	2,35	0,02	0,45	0,01	-	-	-	-	1,75	0,10	-	-	5,76	0,04	3,57	0,25
3	11,86	0,19	2,41	0,04	0,48	0,02	-	-	-	-	2,01	0,11	-	-	8,35	0,05	3,02	0,10
4	10,95	0,43	2,40	0,02	0,47	0,01	-	-	-	-	1,93	0,01	-	-	10,82	0,27	2,67	0,16
6	8,46	0,14	2,55	0,09	0,49	0,02	0,26	0,44	-	-	1,94	0,10	-	-	15,70	0,19	2,45	0,10
8	6,13	0,26	2,79	0,03	0,64	0,10	0,83	0,05	-	-	2,00	0,02	-	-	20,72	0,19	n.d.	n.d.
10	3,29	0,08	3,15	0,04	0,69	0,00	0,93	0,02	-	-	1,98	0,02	-	-	25,65	0,21	1,55	0,01
21	-	-	-	-	0,67	0,01	-	-	0,03	0,04	-	-	0,89	0,06	34,94	0,28	0,83	0,02

Anhang 2: Rohdaten zu Abbildung 4.9; Zeitlicher Verlauf aller detektierten Komponenten bei der Synthese von Ethanol aus Laktose mittels einer enzymatischen Reaktionskaskade. Laktose **Lac**; Glukose **Glc**; Galaktose **Gal**; Glukonat **GluA**; Galaktonat **GalA**; Keto-Deoxyglukonat **KDG**; Keto-Deoxygalaktonat **KDGal**; Glycerinaldehyd **GA**; Pyruvat **Pyr**; Glycerat **GlyA**; Acetaldehyd **AA**; Ethanol **EtOH**

T [h]	Lac [mM]		Glc [mM]		Gal [mM]		GluA [mM]		GalA [mM]		KDGal [mM]		KDG [mM]		GA [mM]		Pyr [mM]		GlyA [mM]		AA [mM]		EtOH [mM]		
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
0,0	24,48	2,87	4,35	0,40	1,29	0,08	0,55	0,04	1,42	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,01
0,5	18,35	0,79	7,35	0,29	2,19	0,12	1,43	0,28	2,02	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,02
1,0	12,09	0,24	23,53	3,89	18,31	0,62	1,80	0,10	2,17	0,10	0,00	0,00	0,02	0,03	6,72	8,22	0,00	0,00	0,62	0,09	0,03	0,05	1,94	0,04	
1,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,62	0,10	2,72	1,11	0,06	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,88	0,28	0,00	0,00	3,47	0,09	
2,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,58	0,02	3,04	0,30	0,18	0,04	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,91	0,31	0,03	0,05	4,79	0,18	
4,0	0,00	0,00	15,11	5,04	11,46	1,19	1,24	1,10	4,88	4,88	3,32	1,18	0,01	0,02	5,69	4,50	0,00	0,00	0,05	0,56	1,11	0,01	10,10	0,60	
6,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,37	0,26	5,80	1,31	0,49	0,27	0,04	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,96	0,56	0,14	0,01	14,93	1,46	
8,0	0,00	0,00	20,98	5,40	17,03	1,46	1,60	1,50	6,36	1,85	0,80	0,55	0,07	0,12	10,16	6,35	0,00	0,00	0,82	0,49	0,24	0,09	20,35	2,39	
10,0	0,00	0,00	10,82	1,38	6,78	0,35	1,64	0,58	7,23	1,26	1,79	0,13	0,23	0,23	7,12	5,99	0,00	0,00	0,62	0,61	0,56	0,32	24,62	3,00	
12,00	0,00	0,00	9,68	4,88	6,26	0,76	2,72	0,02	8,83	6,03	1,18	0,35	0,44	0,44	7,69	9,98	0,02	0,03	0,73	0,78	2,21	0,67	28,19	2,85	
14,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,74	0,81	8,02	1,70	1,13	1,48	0,57	0,64	0,00	0,00	0,03	0,05	0,44	0,50	0,98	0,96	30,36	0,00	
16,00	0,00	0,00	7,63	9,09	5,42	0,14	2,79	0,75	7,41	1,28	0,44	0,39	0,76	0,76	9,02	8,08	0,04	0,06	0,15	0,26	0,75	1,18	32,13	2,30	
18,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,76	0,21	7,14	1,41	0,09	0,75	0,87	0,76	0,00	0,00	0,04	0,06	0,00	0,00	0,43	0,37	32,78	2,33	
20,00	0,00	0,00	7,84	11,86	5,72	0,91	2,32	0,96	7,26	1,27	0,02	0,82	0,05	0,87	3,84	7,56	0,07	0,07	0,10	0,18	0,88	0,46	32,94	2,23	
22,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,82	0,22	6,57	0,84	0,95	1,15	0,34	0,22	0,00	0,00	0,17	0,29	0,00	0,00	0,12	0,48	32,99	2,23	
24,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,37	0,36	5,26	0,30	0,54	0,98	1,18	0,99	0,00	0,00	0,19	0,26	0,00	0,00	0,35	0,51	32,76	2,38	

Anhang 3: Zusammensetzung Silagepresssaft; Massenbilanz der Komponenten von zentrifugiertem SPJ in Gewichtsprozent [%] der berechneten Trockenstoffkonzentration (122,2 g L⁻¹), die sich aus Messungen mit einer Trockenwaage ergeben hat. Die Gesamtausbeute betrug 99,6% (Schönenwald; 2015; Masterarbeit Lehrstuhl Chemie biogener Rohstoffe; Straubing Center of Science)



Anhang 4 Zusammensetzung von JCSG plusTM Kristallisationskit von Molecular Dimensions; Suffolk; UK

Tube #	Conc. [M]	Salt	Conc. [M]	Buffer	pH	Conc. % w/v		Precipitant
1-1	0,2	Lithium sulfate	0,1	Sodium acetate	4,5	50	% w/v	PEG 400
1-2		None	0,1	Sodium citrate	5,5	20	% w/v	PEG 3000
1-3	0,2	Ammonium citrate dibasic		None	-	20	% w/v	PEG 3350
1-4	0,02	Calcium chloride dihydrate	0,1	Sodium acetate	4,6	30	% v/v	MPD
1-5	0,2	Magnesium formate dihydrate		None	-	20	% w/v	PEG 3350
1-6	0,2	Lithium sulfate	0,1	Phosphate/citrate	4,2	20	% w/v	PEG 1000
1-7		None	0,1	CHES	9,5	20	% w/v	PEG 8000
1-8	0,2	Ammonium formate		None	-	20	% w/v	PEG 3350

1-9	0,2	Ammonium chloride		None	-	20	% w/v	PEG 3350
1-10	0,2	Potassium formate		None	-	20	% w/v	PEG 3350
1-11	0,2	Ammonium phosphate monobasic	0,1	Tris	8,5	50	% v/v	MPD
1-12	0,2	Potassium nitrate		None	-	20	% w/v	PEG 3350
1-13	0,8	Ammonium sulfate	0,1	Citrate	4,0			None
1-14	0,2	Sodium thiocyanate		None	-	20	% w/v	PEG 3350
1-15		None	0,1	BICINE	9,0	20	% w/v	PEG 6000
1-16		None	0,1	HEPES	7,5	10	% w/v	PEG 8000
						8	% v/v	Ethylene glycol
1-17		None	0,1	Sodium cacodylate	6,5	40	% v/v	MPD
						5	% w/v	PEG 8000
1-18		None	0,1	Phosphate/citrate	4,2	40	% v/v	Ethanol
						5	% w/v	PEG 1000
1-19		None	0,1	Sodium acetate	4,6	8	% w/v	PEG 4000
1-20	0,2	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	Tris	7,0	10	% w/v	PEG 8000
1-21		None	0,1	Citrate	5,0	20	% w/v	PEG 6000
1-22	0,2	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	Sodium cacodylate	6,5	50	% v/v	PEG 200
1-23	1,6	Sodium citrate tribasic dihydrate		None	6,5			None
1-24	0,2	Potassium citrate tribasic monohydrate		None	-	20	% w/v	PEG 3350
1-25	0,2	Sodium chloride	0,1	Phosphate/citrate	4,2	20	% w/v	PEG 8000
1-26	1,0	Lithium chloride	0,1	Citrate	4,0	20	% w/v	PEG 6000
1-27	0,2	Ammonium nitrate		None	-	20	% w/v	PEG 3350
1-28		None	0,1	HEPES	7,0	10	% w/v	PEG 6000
1-29	0,8	Sodium phosphate monobasic monohydrate	0,1	Sodium HEPES	7,5			None
	0,8	Potassium phosphate monobasic						
1-30		None	0,1	Phosphate/citrate	4,2	40	% v/v	PEG 300
1-31	0,2	Zinc acetate dihydrate	0,1	Sodium acetate	4,5	10	% w/v	PEG 3000
1-32		None	0,1	Tris	8,5	20	% v/v	Ethanol
1-33		None	0,1	Sodium/potassium phosphate	6,2	25	% v/v	1,2-Propanediol
						10	%v/v	Glycerol

1-34		None	0,1	BICINE	9,0	10	% w/v	PEG 20,000
						2	% v/v	1,4-Dioxane
1-35	2,0	Ammonium sulfate	0,1	Sodium acetate	4,6			None
1-36		None		None	-	10	% w/v	PEG 1000
						10	% w/v	PEG 8000
1-37		None		None	-	24	% w/v	PEG 1500
						20	% v/v	Glycerol
1-38	0,2	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	Sodium HEPES	7,5	30	% v/v	PEG 400
1-39	0,2	Sodium chloride	0,1	Sodium/potassium phosphate	6,2	50	% v/v	PEG 200
1-40	0,2	Lithium sulfate	0,1	Sodium acetate	4,5	30	% w/v	PEG 8000
1-41		None	0,1	HEPES	7,5	70	% v/v	MPD
1-42	0,2	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	Tris	8,5	20	% w/v	PEG 8000
1-43	0,2	Lithium sulfate	0,1	Tris	8,5	40	% v/v	PEG 400
1-44		None	0,1	Tris	8,0	40	% v/v	MPD
1-45	0,17	Ammonium sulfate		None	-	25,5	% w/v	PEG 4000
						15	% v/v	Glycerol
1-46	0,2	Calcium acetate hydrate	0,1	Sodium cacodylate	6,5	40	% v/v	PEG 300
1-47	0,14	Calcium chloride dihydrate	0,07	Sodium acetate	4,6	14	% v/v	2-Propanol
						30	% v/v	Glycerol
1-48	0,04	Potassium phosphate monobasic		None	-	16	% w/v	PEG 8000
						20	% v/v	Glycerol
2-1	1,0	Sodium citrate tribasic dihydrate	0,1	Sodium cacodylate	6,5			None
2-2	2,0	Ammonium sulfate	0,1	Sodium cacodylate	6,5			None
	0,2	Sodium chloride						
2-3	0,2	Sodium chloride	0,1	HEPES	7,5	10	% v/v	2-Propanol
2-4	1,26	Ammonium sulfate	0,1	Tris	8,5			None
	0,2	Lithium sulfate						
2-5		None	0,1	CAPS	10,5	40	% v/v	MPD
2-6	0,2	Zinc acetate dihydrate	0,1	Imidazole	8,0	20	% w/v	PEG 3000
2-7	0,2	Zinc acetate dihydrate	0,1	Sodium cacodylate	6,5	10	% v/v	2-Propanol
2-8	1,0	Ammonium phosphate dibasic	0,1	Sodium acetate	4,5			None

2-9	1,6	Magnesium sulfate heptahydrate	0,1	MES	6,5			None
2-10		None	0,1	BICINE	9,0	10	% w/v	PEG 6000
2-11	0,16	Calcium acetate hydrate	0,08	Sodium cacodylate	6,5	14,4	% w/v	PEG 8000
						20	% v/v	Glycerol
2-12		None	0,1	Imidazole	8,0	10	% w/v	PEG 8000
2-13	0,05	Cesium chloride	0,1	MES	6,5	30	% v/v	Jeffamine® M-600
2-14	3,2	Ammonium sulfate	0,1	Citrate	5,0			None
2-15		None	0,1	Tris	8,0	20	% v/v	MPD
2-16		None	0,1	HEPES	7,5	20	% v/v	Jeffamine® M-600
2-17	0,2	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	Tris	8,5	50	% v/v	Ethylene glycol
2-18		None	0,1	BICINE	9,0	10	% v/v	MPD
2-19	0,8	Succinic acid		None	7,0			None
2-20	2,1	DL-Malic acid		None	7,0			None
2-21	2,4	Sodium malonate dibasic monohydrate		None	7,0			None
2-22	1,1	Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1	HEPES	7,0	0,5	% v/v	Jeffamine® ED-2003
2-23	1,0	Succinic acid	0,1	HEPES	7,0	1	% w/v	PEG 2000 MME
2-24		None	0,1	HEPES	7,0	30	% v/v	Jeffamine® M-600
2-25		None	0,1	HEPES	7,0	30	% v/v	Jeffamine® ED-2003
2-26	0,02	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	HEPES	7,5	22	% w/v	Poly(acrylic acid sodium salt) 5100
2-27	0,01	Cobalt(II) chloride hexahydrate	0,1	Tris	8,5	20	% w/v	Polyvinylpyrrolidone
2-28	0,2	TMAO	0,1	Tris	8,5	20	% w/v	PEG 2000 MME
2-29	0,005	Cobalt(II) chloride hexahydrate	0,1	HEPES	7,5	12	% w/v	PEG 3350
	0,005	Cadmium chloride hemi(pentahydrate)						
	0,005	Magnesium chloride hexahydrate						
	0,005	Nickel(II) chloride hexahydrate						
2-30	0,2	Sodium malonate dibasic monohydrate		None	-	20	% w/v	PEG 3350
2-31	0,1	Succinic acid		None	-	15	% w/v	PEG 3350
2-32	0,15	DL-Malic acid		None	-	20	% w/v	PEG 3350
2-33	0,1	Potassium thiocyanate		None	-	30	% w/v	PEG 2000 MME
2-34	0,15	Potassium bromide		None	-	30	% w/v	PEG 2000 MME

2-35	2,0	Ammonium sulfate	0,1	Bis-Tris	5,5				None
2-36	3,0	Sodium chloride	0,1	Bis-Tris	5,5				None
2-37	0,3	Magnesium formate dihydrate	0,1	Bis-Tris	5,5				None
2-38	1,0	Ammonium sulfate	0,1	Bis-Tris	5,5	1	% w/v		PEG 3350
2-39		None	0,1	Bis-Tris	5,5	25	% w/v		PEG 3350
2-40	0,2	Calcium chloride dihydrate	0,1	Bis-Tris	5,5	45	% v/v		MPD
2-41	0,2	Ammonium acetate	0,1	Bis-Tris	5,5	45	% v/v		MPD
2-42	0,1	Ammonium acetate	0,1	Bis-Tris	5,5	17	% w/v		PEG 10,000
2-43	0,2	Ammonium sulfate	0,1	Bis-Tris	5,5	25	% w/v		PEG 3350
2-44	0,2	Sodium chloride	0,1	Bis-Tris	5,5	25	% w/v		PEG 3350
2-45	0,2	Lithium sulfate	0,1	Bis-Tris	5,5	25	% w/v		PEG 3350
2-46	0,2	Ammonium acetate	0,1	Bis-Tris	5,5	25	% w/v		PEG 3350
2-47	0,2	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	Bis-Tris	5,5	25	% w/v		PEG 3350
2-48	0,2	Ammonium acetate	0,1	HEPES	7,5	45	% v/v		MPD

Anhang 5: Zusammensetzung von PEG/Ion Kristallisationskit von Hampton Research; Aliso Viejo, CA, USA

Reagent #	[Salt]	[Salt] units	Salt	pH	[Buffer] [M]	Buffer	pH	[Ppt]	[Ppt] units	Precipitant	Average pH
1	0,2	M	Sodium fluoride					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,3
2	0,2	M	Potassium fluoride					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,2
3	0,2	M	Ammonium fluoride					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,2
4	0,2	M	Lithium chloride					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,8
5	0,2	M	Magnesium chloride hexahydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,9
6	0,2	M	Sodium chloride					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,9
7	0,2	M	Calcium chloride dihydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,1
8	0,2	M	Potassium chloride					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,9
9	0,2	M	Ammonium chloride					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,2

10	0,2	M	Sodium iodide					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,9
11	0,2	M	Potassium iodide					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,0
12	0,2	M	Ammonium iodide					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,9
13	0,2	M	Sodium thiocyanate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,8
14	0,2	M	Potassium thiocyanate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,9
15	0,2	M	Lithium nitrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,0
16	0,2	M	Magnesium nitrate hexahydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,8
17	0,2	M	Sodium nitrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,8
18	0,2	M	Potassium nitrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,7
19	0,2	M	Ammonium nitrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,3
20	0,2	M	Magnesium formate dihydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,0
21	0,2	M	Sodium formate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,2
22	0,2	M	Potassium formate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,2
23	0,2	M	Ammonium formate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,6
24	0,2	M	Lithium acetate dihydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,9
25	0,2	M	Magnesium acetate tetrahydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,5
26	0,2	M	Zinc acetate dihydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,3
27	0,2	M	Sodium acetate trihydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	8,0
28	0,2	M	Calcium acetate hydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,5

29	0,2	M	Potassium acetate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,8
30	0,2	M	Ammonium acetate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,1
31	0,2	M	Lithium sulfate monohydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,7
32	0,2	M	Magnesium sulfate heptahydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,9
33	0,2	M	Sodium sulfate decahydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,7
34	0,2	M	Potassium sulfate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,7
35	0,2	M	Ammonium sulfate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,1
36	0,2	M	Sodium tartrate dibasic dihydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,2
37	0,2	M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,4
38	0,2	M	Ammonium tartrate dibasic					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,5
39	0,2	M	Sodium phosphate monobasic monohydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	4,7
40	0,2	M	Sodium phosphate dibasic dihydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	9,2
41	0,2	M	Potassium phosphate monobasic					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	4,9
42	0,2	M	Potassium phosphate dibasic					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	9,2
43	0,2	M	Ammonium phosphate monobasic					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	4,7
44	0,2	M	Ammonium phosphate dibasic					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	8,0
45	0,2	M	Lithium citrate tribasic tetrahydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	8,3
46	0,2	M	Sodium citrate tribasic dihydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	8,2

47	0,2	M	Potassium citrate tribasic monohydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	8,2
48	0,2	M	Ammonium citrate dibasic					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,1
49	0,1	M	Sodium malonate	4.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	4,6
50	0,2	M	Sodium malonate	4.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	4,6
51	0,1	M	Sodium malonate	5.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,6
52	0,2	M	Sodium malonate	5.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,6
53	0,1	M	Sodium malonate	6.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,4
54	0,2	M	Sodium malonate	6.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,5
55	0,1	M	Sodium malonate	7.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,4
56	0,2	M	Sodium malonate	7.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,4
57	4	% v/v	Tacsimate	4.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	4,4
58	8	% v/v	Tacsimate	4.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	4,5
59	4	% v/v	Tacsimate	5.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,4
60	8	% v/v	Tacsimate	5.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,4
61	4	% v/v	Tacsimate	6.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,3
62	8	% v/v	Tacsimate	6.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,3
63	4	% v/v	Tacsimate	7.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,2
64	8	% v/v	Tacsimate	7.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,2
65	4	% v/v	Tacsimate	8.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,7

66	8	% v/v	Tacsimate	8.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,8
67	0,1	M	Succinic acid	7.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,2
68	0,2	M	Succinic acid	7.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,3
69	0,1	M	Ammonium citrate tribasic	7.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,1
70	0,2	M	Ammonium citrate tribasic	7.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,1
71	0,1	M	DL-Malic acid	7.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,1
72	0,2	M	DL-Malic acid	7.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,1
73	0,1	M	Sodium acetate trihydrate	7.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,8
74	0,2	M	Sodium acetate trihydrate	7.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,9
75	0,1	M	Sodium formate	7.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,8
76	0,2	M	Sodium formate	7.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,9
77	0,1	M	Ammonium tartrate dibasic	7.0				12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,8
78	0,2	M	Ammonium tartrate dibasic	7.0				20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,8
79	2	% v/v	Tacsimate	4.0	0,1	Sodium acetate trihydrate	4.6	16	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	4,8
80	2	% v/v	Tacsimate	5.0	0,1	Sodium citrate tribasic dihydrate	5.6	16	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,9
81	2	% v/v	Tacsimate	6.0	0,1	BIS-TRIS	6.5	20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,6
82	2	% v/v	Tacsimate	7.0	0,1	HEPES	7.5	20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,4
83	2	% v/v	Tacsimate	8.0	0,1	Tris	8.5	16	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	8,6
84					0,07	Citric acid,	3.4	16	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	3,8

Anhang 6 Zusammensetzung von PEGRX 1 Kristallisationskit von Hampton Research; Aliso Viejo, CA, USA

Nr.	[Buffer]	Buffer	pH	[Polymer]	Polymer	Average
#	[M]			% v/v		pH
1	0,1	Citric acid	3,5	34	Polyethylene glycol 200	4,5
2	0,1	Sodium citrate tribasic dihydrate	5,5	38	Polyethylene glycol 200	6,7
3	0,1	HEPES	7,5	42	Polyethylene glycol 200	7,5
4	0,1	Sodium acetate trihydrate	4,5	30	Polyethylene glycol 300	5,3
5	0,1	BIS-TRIS	6,5	25	Polyethylene glycol 300	6,5
6	0,1	BICINE	8,5	20	Polyethylene glycol 300	8,6
7	0,1	Sodium acetate trihydrate	4,0	15	Polyethylene glycol 400	4,5
8	0,1	MES monohydrate	6,0	22	Polyethylene glycol 400	6,0
9	0,1	Tris	8,0	30	Polyethylene glycol 400	8,1
10	0,1	Sodium citrate tribasic dihydrate	5,0	30	Polyethylene glycol monomethyl ether 550	6,0
11	0,1	Imidazole	7,0	25	Polyethylene glycol monomethyl ether 550	6,8
12	0,1	BIS-TRIS propane	9,0	20	Polyethylene glycol monomethyl ether 550	9,0
13	0,1	Sodium acetate trihydrate	4,0	10	Jeffamine® M-600® pH 7.0	4,1
14	0,1	MES monohydrate	6,0	20	Jeffamine® M-600® pH 7.0	5,7
15	0,1	Tris	8,0	30	Jeffamine® M-600® pH 7.0	7,6
16	0,1	Citric acid	3,5	14	Polyethylene glycol 1,000	4,1
17	0,1	Sodium citrate tribasic dihydrate	5,5	22	Polyethylene glycol 1,000	6,2
18	0,1	HEPES	7,5	30	Polyethylene glycol 1,000	7,6
19	0,1	Sodium acetate trihydrate	4,5	30	Polyethylene glycol 1,500	5,2
20	0,1	BIS-TRIS	6,5	20	Polyethylene glycol 1,500	6,5
21	0,1	BICINE	8,5	15	Polyethylene glycol 1,500	8,6
22	0,1	Sodium acetate trihydrate	4,0	10	Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	4,4

23	0,1	MES monohydrate	6,0	20	Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	6,0
24	0,1	Tris	8,0	30	Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	8,1
25	0,1	Sodium citrate tribasic dihydrate	5,0	30	Jeffamine® ED-2001 pH 7.0	5,7
26	0,1	Imidazole	7,0	20	Jeffamine® ED-2001 pH 7.0	6,7
27	0,1	BIS-TRIS propane	9,0	10	Jeffamine® ED-2001 pH 7.0	8,7
28	0,1	Citric acid	3,5	25	Polyethylene glycol 3,350	4,3
29	0,1	Sodium citrate tribasic dihydrate	5,5	18	Polyethylene glycol 3,350	6,2
30	0,1	HEPES	7,5	12	Polyethylene glycol 3,350	7,4
31	0,1	Sodium acetate trihydrate	4,0	10	Polyethylene glycol 4,000	4,3
32	0,1	MES monohydrate	6,0	14	Polyethylene glycol 4,000	6,0
33	0,1	Tris	8,0	28	Polyethylene glycol 4,000	8,1
34	0,1	Sodium acetate trihydrate	4,5	30	Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000	5,2
35	0,1	BIS-TRIS	6,5	20	Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000	6,5
36	0,1	BICINE	8,5	8	Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000	8,6
37	0,1	Sodium citrate tribasic dihydrate	5,0	10	Polyethylene glycol 6,000	5,6
38	0,1	Imidazole	7,0	20	Polyethylene glycol 6,000	6,9
39	0,1	BIS-TRIS propane	9,0	30	Polyethylene glycol 6,000	9,1
40	0,1	Citric acid	3,5	28	Polyethylene glycol 8,000	4,4
41	0,1	Sodium citrate tribasic dihydrate	5,5	16	Polyethylene glycol 8,000	6,1
42	0,1	HEPES	7,5	4	Polyethylene glycol 8,000	7,4
43	0,1	Sodium acetate trihydrate	4,5	10	Polyethylene glycol 10,000	4,7
44	0,1	BIS-TRIS	6,5	16	Polyethylene glycol 10,000	6,5
45	0,1	BICINE	8,5	20	Polyethylene glycol 10,000	8,7
46	0,1	Sodium citrate tribasic dihydrate	5,0	18	Polyethylene glycol 20,000	5,7
47	0,1	Imidazole	7,0	12	Polyethylene glycol 20,000	6,9

48	0,1	BIS-TRIS propane	9,0	8	Polyethylene glycol 20,000	9,0
----	-----	------------------	-----	---	----------------------------	-----

Abkürzungsverzeichnis

5-4-KDG	5-Keto-4-Deoxyglucarat
6-APA	6-Aminopenicillansäure
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
aKG	α -Ketogluterat
ALDC	Acetolactat-Decarboxylase
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ALS	Acetolactat-Syntase
AS	Aminosäure
BDDH	Butandiol-Dehydrogenase
BDL	2,3-Butandiol
CoA	Coenzym A
DHAD	Dihydroxysäure-Dehydratase
DKR	Dynamic Kinetic Resolution
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimidehydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDH	Formiatdehydrogenase
FID	Flammenionisationsdetektor
FSA	D-Fructose-6-Phosphate Aldolase
GA	Glycerinaldehyd
GC	Gaschromatographie
GDH	Glukosedehydrogenase
GluA	Glukonat
GlucD	Glukaratdehydratase
GlyA	Glycerat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
KARI	Ketolsäure-Reductoisomerase
Kcat	Wechselzahl
KDC	Ketosäure-Decarboxylase
KDG	2-Keto-3-Deoxyglukonat
KDGA	KDG-Aldolase
KdgD	Ketodeoxyglukaratdehydratase
KdsaldH	Kgsa-Dehydrogenase
KGSA	α -Ketogluterat Semialdehyd
KIV	2-Ketoisovalerat
Km	Michaeliskonstante
LDH	Laktatdehydrogenase
LOX	Laktat-Oxidase
MDR	medium-chain Reduktasen/ Alkoholdehydrogenasen
MS	Massenspektrometrie
NAD(P)+/NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NOX	NADH-Oxidase

NTP	Nukleosidtriphosphate
PDC	Pyruvat-Decarboxylase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMP	1-Phenyl-3-Methyl-5-Pyrazolon
PPase	anorganischer Pyrophosphatase
SDR	short-chain Reduktasen/ Alkohldehydrogenasen
SPS	Silagepresssaft
TDP	Thiamindiphosphat
UDH	Uratdehydrogenase

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Theoretische Stoffströme in einer Bioraffinerie (TÜRK 2014)	9
Abb. 1.2:	Denkbare chemische Grundstoffe und biogene Energieträger einer möglichen Lignocellulose-Bioraffinerie. FT: Fischer-Tropsch-Synthese; BtL: „Biomass to Liquid“ (TÜRK 2014).....	10
Abb. 1.3:	Möglicher Aufbau einer Grünen Bioraffinerie der Phase III zur Gewinnung von Grund und Feinchemikalien sowie biogener Energieträger (TÜRK 2014).....	11
Abb. 1.4:	Einteilung von Biotransformationen basierend auf der Komplexität und Produktpreisen (ZHANG 2010b).	13
Abb. 1.5:	Darstellung der unterschiedlichen Methoden zur Enzymimmobilisierung (E: Enzym)	16
Abb. 1.6:	Mögliche Aufbaumöglichkeiten von Multienzymreaktionen. 1. Lineare Reaktion; 2. Linear-parallele Reaktion; 3. Lineare Reaktion mit Recyclingsystem; Parallele Reaktionen mit integriertem Recyclingsystem (KROUTIL 2014)	20
Abb. 1.7:	Das PAP-PPK ATP Regenerationssystem ausgehend von AMP, gekoppelt mit der Synthese von Acetyl-CoA. Die verwendeten Enzyme sind AMP-Phosphotransferase (KOUTINAS et al. 2016); Polyphosphatkinase (SIEKER et al. 2011) und anorganische Pyrophosphatase (PPase) (KAMEDA et al. 2001).....	24
Abb. 1.8:	Schema einer (R)-selektiven Auflösung eines Racemischen Substratgemisches mit Hilfe eines Recyclingsystems zur kompletten Umsetzung (KIM et al. 2008).	24
Abb. 1.9:	Beispiel Reaktion für eine reduktive Acylierung und eine DKR eines Ketons (JUNG et al. 2000)	24
Abb. 1.10:	Transformation von Racemischen Hydroxysäuren in (R)-Hydroxysäuren mittels Glycolatoxidase und enantioselektiver D-Lactatdehydrogenase. NAD ⁺ wird durch Formiatedehydrogenase recycelt und H ₂ O ₂ wird durch Katalase entfernt (ADAM et al. 1998).....	25
Abb. 1.11:	Enzymatische, oxidative Reaktionskaskade zur Produktion von α -Ketoglutarat aus D-Glucuronat. Verwendete Enzyme sind Uronatdehydrogenase (UDH); Glukaratdehydratase (GlucD); Ketodeoxyglukaratdehydratase (KdgD) und Kgsa-Dehydrogenase (KgsaldH). Als NAD ⁺ Regenerationssystem wurde NADH-Oxidase (NOX) eingesetzt (BEER et al. 2017).	26
Abb. 1.12	Zellfrei Stoffwechselreaktion zur Produktion von molekularem Sauerstoff und CO ₂ aus Glukan (ZHANG et al. 2007). PPP, Pentosephosphatweg; G1P, Glukose-1-phosphat; G6P, Glucose-6-phosphat; 6PG, 6-Phosphoglukonat; Ru5P, Ribulose-5-phosphat; P _i anorganisches Phosphat. Die eingesetzten Enzyme sind: GNP Glukanphosphorylase; PGM , Phosphoglukomutase; G6PDH , G-6-P-Dehydrogenase; 6PGDH , 6-Phosphoglukonatdehydrogenase, R5PI Phosphoriboseisomerase; Ru5PE , Ribulose 5-phosphatepimerase; TAL , Transaldolase; TKL , Transketolase, TIM , Triosephosphatisomerase; ALD , Aldolase, FBP , Phosphoglukoseisomerase; PGI , Fructose-1, 6-bisphosphatase; und H2ase , Hydrogenase (MYUNG et al. 2014)	28
Abb. 4.1:	Vier-stufige enzymatische Reaktionskaskade ausgehend von D-Glukose zum Schlüssel-intermediat Pyruvat. Dabei sind die involvierten Enzyme GDH : Glukosedehydrogenase; DHAD : Dihydroxysäure-Dehydratase; KDGA : KDG-Aldolase; ALDH : Aldehyd-Dehydrogenase (GUTERL et al. 2012). Diese Synthese kann in zwei Teile unterteilt werden, dem Hauptweg, KDG zu Pyruvat und dem Nebenweg, KDG zu Glycerinaldehyd, Glycerat und weiter zu Pyruvat. Diese Unterteilung ermöglicht eine exaktere Analyse. Vom Pyruvat ausgehend kann dann entweder mit zwei oder vier weiteren Enzymen Ethanol bzw. Isobutanol hergestellt werden (siehe Abb. 3.2) GluA: Glukonat; KDG: 2-Keto-3-Deoxyglukonat; GlyA: Glycerat.	51
Abb. 4.2:	Reaktionskaskade ausgehend von Pyruvat zur Bildung von Ethanol bzw. Isobutanol. Für die Ethanol synthese werden Pyruvat-Decarboxylase (PDC) und Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und für die Synthese von Isobutanol Acetolactat-Syntase (ALS), Ketolsäure-Reductoisomerase (KARI), Dihydroxysäure-Dehydratase (DHAD ; die spezielle Formatierung in der Abbildung ist ohne Bedeutung), Ketosäure-Decarboxylase (KDC) und Alkohol-Dehydrogenase (ADH) benötigt (CARSTEN et al. 2015).	51
Abb. 4.3:	Zeitlicher Verlauf aller detektierten Komponenten bei der Synthese von Ethanol aus Glukose mittels einer enzymatischen Reaktionskaskade. Dargestellt sind Glukose und Ethanol (a) und alle weiteren	

Intermediate sowie NADH (b). Zur besseren Verständlichkeit wurde die Ethanol-Synthese in Haupt und Nebenweg aufgeteilt.	54
Abb. 4.4: Darstellung des Verhältnisses der KDG und Glukonat Konzentration über Zeit. Es stellt sich ein Fließgleichgewicht ein und kann über 10 Stunden konstant beobachtet werden.	55
Abb. 4.5: Vergleich unterschiedlicher Glukosebestimmungsmethoden; gekoppelter, enzymatischer Glukose-Assay (◆) und 1-Phenyl-3-Methyl-5-Pyrazolon (PMP) Methode (▲).....	57
Abb. 4.6: Gesamtbilanz aller gemessenen Reaktanten.	59
Abb. 4.7: Darstellung der gemessenen (gem.) Glycerinaldehydkonzentration und der theoretisch bestimmten (kalk.) Menge	60
Abb. 4.8: Darstellung der Glycerinaldehydbindung an die Proteine der Reaktionskaskade. ■ und ◆ sind die Ergebnisse ▲ die Kontrolle ohne den Einsatz von Protein.	61
Abb. 4.9: Zeitlicher Verlauf der Reaktion von Laktose zu Ethanol; Dargestellt sind Laktose, Glukose Galaktose und Ethanol (a) und alle weiteren Intermediate sowie NADH (b).	63
Abb. 4.10: Schematische Darstellung der entwickelten Reaktionskaskade; Milchsäure wird von Lactatoxidase (LOX) zu Pyruvat und H ₂ O ₂ oxidiert; Katalase (Cat) reduziert H ₂ O ₂ zu H ₂ O. Acetolactat-Syntase (ALS) synthetisiert aus Pyruvat Acetolactat. Acetolactat wird von Acetolactat Decarboxylase (ALDC) zu Acetoin decarboxyliert.	66
Abb. 4.11: Darstellung des pH- und Temperaturoptimums für Acetolactat Decarboxylase (ALDC) aus B. licheniformis. Acetolactat wurde mit einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. Das pH-Optimum wurde mit MOPS Puffer, pH 5-7, und Tris-Puffer, pH 7,5-9 ermittelt und das Temperaturoptimum wurde bei 100 mM MOPS pH 6,5 festgestellt.....	67
Abb. 4.12: Graphische Darstellung der Flussbestimmung mit unterschiedlichen Konzentrationen an ALS und ALDC und konstanter Konzentration an LOX. Zusätzlich ist die Reaktionsrate in mM min ⁻¹ dargestellt.	69
Abb. 4.13: Produktion von Acetoin aus Milchsäure mittels einer dreistufigen enzymatischen Reaktionskaskade. Alle Komponenten waren in Lösung und die Reaktion wurde bei 40°C und konstantem pH von 6,5 durchgeführt. Die eingesetzte Enzymaktivität betrug 30 U LOX, 17,86 U ALS, 55 U ALDC 10000 U CAT. Nach 2,08 h wurde frisches Enzym in gleicher Menge hinzugefügt.	70
Abb. 4.14: Vergleich zwischen der gelösten Enzymkaskade (■) und zweier Immobilisierungstechniken, der Quervernetzung (●) und der Alginateverkapselung (◆). Mit diesen Techniken wurde versucht einen stabileren Prozess zu etablieren. Alle Ergebnisse sind auf μmol Acetoin normalisiert.	71
Abb. 4.15: Produktion von Acetoin mittels einer immobilisierten enzymatischen Reaktionskaskade und 0,5 M Milchsäure als Titriermittel. Alle Enzyme waren in einem 4%igen Ca-Alginatpolymer eingeschlossen. Die Reaktion wurde bei 40°C und einem konstanten pH von 6,5 betrieben.....	73
Abb. 4.16: Acetoinproduktion aus Milchsäure mittels der in Ca-Alginat immobilisierten Enzymkaskade. Als Titriermittel wurde unverdünnter SPS verwendet. Alle Enzyme waren in einem 4%igen Ca-Alginatpolymer eingeschlossen und die Reaktion wurde bei 40°C bei einem konstanten pH von 6,5 betrieben.....	74
Abb. 4.17: Enzymatische Produktion von Acetoin aus Milchsäure welche ausschlich aus SPS bereitgestellt wird. Als Titriermittel wurde unverdünnter SPS verwendet. Alle Enzyme waren in einem 4%igen Ca-Alginatpolymer eingeschlossen und die Reaktion wurde bei 40°C bei einem konstanten pH von 6,5 betrieben.	75
Abb. 4.18 Unterschiedlichen Stereoisomeren von 2,3-Butandiol.	77
Abb. 4.19: Bestimmung der pH und Temperaturabhängigkeit von BcBDDH. Acetoin wurde mit einer Konzentration von 5 mM und NADH mit 0,2 mM eingesetzt. Das pH-Optimum wurde mit MOPS-Puffer, pH 5-7, und Tris-Puffer, pH 7,5-9 ermittelt und das Temperaturoptimum wurde bei 100 mM Tris pH 7,5 festgestellt	81
Abb. 4.20 Beispiel für BDDH Proteinkristalle (aufgenommen unter einem Stereomikroskop):	83
Abb. 5.1: Theoretische Reaktionskaskade auf Basis einer D-Fructose-6-Phosphate Aldolase (FSA). Diese katalysiert die Kondensation von Dihydroxyaceton und Glycolaldehyd zu Xylulose. Die eingesetzten Enzyme sind Glukosedehydrogenase (GDH); Dihydroxysäure-Dehydratase (DHAD); KDG-Aldolase (KDGA); D-Fructose-6-Phosphate Aldolase (FSA) und Isomerase	86

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Vor- und Nachteile von immobilisierten Enzymsystemen (KATCHALSKI-KATZIR 1993).....	16
Tab. 1.2:	Vor- und Nachteile einiger Immobilisationsmethoden (BRENA et al. 2013).....	18
Tab. 1.3:	Folgen von chemischen Denaturierungsagenzien (SCHMID 1979).....	21
Tab. 1.4:	Liste von Cofaktoren und deren enzymatische Regenerierungssysteme modifiziert nach (ZHAO & VAN DER DONK 2003).....	22
Tab. 2.1:	Zusammenfassung der verwendeten Klonierungsstämme	36
Tab. 2.2	Liste der verwendeten Plasmide	37
Tab. 2.3	Liste der verwendeten Oligonukleotide	37
Tab. 3.1:	Standard PCR Protokoll.....	40
Tab. 3.2:	Liste aller in dieser Arbeit hergestellter Proteine, inklusive Molekulargewicht; Extinktionkoeffizient und GenBank ID Nummer	41
Tab. 3.3:	Anleitung zur Herstellung der Gele für SDS-Page (Menge für 14 einzelne Gele angegeben)	42
Tab. 4.1:	Vergleich zwischen der gemessenen Glycerinaldehydkonzentration und der theoretisch bestimmten Menge.....	60
Tab. 4.2:	Aktivität der Enzyme GDH, DHAD und KDGA gegenüber Glukose und Galaktose sowie deren Derivate (CARSTEN et al. 2015; KIM & LEE 2006; MILBURN et al. 2006; WOLTERINK-VAN LOO et al. 2007(Lamble, 2005 #324))......	62
Tab. 4.3:	Bestimmung der Enzymkonzentration für einen optimalen Stofffluss der Reaktionskaskade. Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und die Reaktionsrate wurde mittels der Abnahme an NADH bei 340 nm bestimmt.	68
Tab. 4.4:	Mikroorganismen welche 2,3-Butandiol in signifikanter Menge bilden können (CELIŃSKA & GRAJEK 2009; Ji et al. 2011; MADDOX 1996).	78
Tab. 4.5:	Sequenzmotive welche in SDR Enzymen konserviert sind. Die Positionen beziehen sich auf die meso-2,3-Butandioldehydrogenase aus Klebsiella pneumoniae (PDB Code 1GEG) (OPPERMANN et al. 2003; OTAGIRI et al. 2001a)	79
Tab. 4.6:	Einfluss unterschiedlicher Metallionen auf die Aktivität von BcBDDH. Die Metallsalze wurden mit jeweils 5 mM Endkonzentration eingesetzt.....	81
Tab. 4.7:	Aufbau einer Hanging-Drop 24-Well-Kristallisationsplatte zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen von SmBDDH. Angegeben sind die Konzentrationen der jeweiligen Komponenten. Das Gesamtvolumen des Kristallisationspuffers in einer Kavität betrug 1 mL. In grün sind diejenigen Bedingungen markiert in denen mehrere Kristalle gefunden wurden.	82