

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Herstellung von halophilen Enzymen mit *Haloferax
volcanii* im Rührkesselreaktor**

Eva Elisabeth Strillinger

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Wolfgang Polifke, Ph.D.
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Michael Groll

Die Dissertation wurde am 19.05.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 08.07.2016 angenommen

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. Zu dieser Dissertation haben mehrere Personen in verschiedener Weise beigetragen. An dieser Stelle möchte ich mich bei ihnen herzlich bedanken.

Bei Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung, die Möglichkeit das Thema sehr selbstständig bearbeiten zu dürfen und für das entgegengebrachte Vertrauen. Beim Coreferenten Prof. Dr. rer. nat. Michael Groll und beim Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr.-Ing. Wolfgang Polifke für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Bei der International Graduate School of Science and Engineering und dem Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für die Finanzierung des Forschungsprojekts.

Bei Prof. Dr. rer. nat. Jörg Eppinger für die hervorragende Betreuung und den vielen hilfreichen Anregungen während meines Auslandsaufenthalts an der King Abdullah University of Science and Technology. Weiter bedanken ich mich bei der Arbeitsgruppe des KAUST Catalysis Center, vor allem bei Stefan Grötzinger, für die hervorragende Zusammenarbeit.

Prof. Thorsten Allers (University of Nottingham, Nottingham, England), danke ich sehr herzlich für die großartige Unterstützung, die Zusendung der *Haloferax volcanii* Stämme und die vielen hilfreichen Anregungen während der Projektbearbeitung. Martina Haack und Lars Janoschek danke ich sehr für die „unbürokratische“ Hilfe und für die Unterstützung bei verschiedenen analytischen Messungen.

Bei meinen Studenten Liya Zaygerman, Maria Turgel, Katharina Holland, Roland Schopf und vor allem bei Julia Nieporte für die Unterstützung im Rahmen von studentischen Arbeiten. Bei allen Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit. Im Besonderen bedanke ich mich bei Anja Koller für das Korrigieren meiner Dissertation, sowie bei meiner Bürokollegin Sarah Hintermayer. Bei beiden bedanke ich mich für unsere wunderbare Freundschaft, die seelische Unterstützung während der Promotion sowie für die vielen (fachlichen) Diskussionen und die vielen schönen Mittag-Essen-Stunden!

Schließlich danke ich meiner Familie und meinem Mann Christoph von ganzem Herzen für die großartige Unterstützung in jeglicher Hinsicht!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
1 Einleitung	1
2 Problemstellung und Zielsetzung	4
3 Theoretischer Hintergrund	7
3.1 <i>Deep Red Sea Brine Pools</i>	7
3.1.1 Eigenschaften und geographische Lage	7
3.1.2 Solebecken <i>Discovery, Atlantis II</i> und <i>Kebrit</i>	8
3.1.3 Neue Enzyme aus den Solebecken im Roten Meer	11
3.2 Archaeen, die dritte Domäne des Lebens	12
3.3 Übersicht der Enzyme.....	14
3.3.1 Alkoholdehydrogenasen	14
3.3.2 Dihydrodipicolinat Reduktasen	15
3.3.3 Halophile β -Galaktosidase aus <i>Haloferax alicanti</i>	17
3.4 Industrieller Nutzen extremophiler Proteine	18
3.5 Halophile und thermophile Adaption	20
3.6 Expressionssysteme für thermo-halophile Proteine im Vergleich.....	22
3.7 <i>Haloferax volcanii</i>	24
3.7.1 Herkunft und Eigenschaften	24
3.7.2 Stoffwechselweg in <i>Haloferax volcanii</i>	25
3.7.3 Genetische Modifikationen.....	28
3.7.4 Biofilmbildung von <i>Haloferax volcanii</i>	29
3.7.5 <i>Quorum Sensing</i>	30
3.8 Biokatalytische Prozesse	32

3.8.1	Kultivierung von Mikroorganismen im idealen Rührkesselreaktor	32
3.8.2	Bilanzierung eines idealen Rührkesselreaktors im Satzverfahren.....	34
3.8.3	Konstanter Medienaustausch mit Zellrückhaltung.....	37
3.8.4	Enzymcharakterisierung	40
3.8.5	Cofaktor-Regenerierung	43
4	Material und Methoden.....	47
4.1	Puffer, Medien und Lösungen	47
4.2	Mikroorganismen und gentechnische Arbeiten.....	52
4.2.1	<i>Haloferax volcanii</i> Stämme und Vektoren	52
4.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	53
4.3	Satzverfahren zur Kultivierung von <i>Haloferax volcanii</i>	59
4.3.1	Vorkulturherstellung.....	59
4.3.2	Satzkultivierung im Schüttelkolben.....	60
4.3.3	Satzverfahren im 7,5 L Rührkesselreaktor	62
4.3.4	Zellrückhaltung.....	66
4.3.5	Parallele Kultivierung im Milliliter Maßstab	67
4.4	Proteinaufreinigung und analytische Methoden	71
4.4.1	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie.....	71
4.4.2	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese.....	72
4.4.3	Lagerung der aufgereinigten Proteine	72
4.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	72
4.5	Analytische Methoden	72
4.5.1	Bestimmung der Zellkonzentration	72
4.5.2	Bestimmung der Acetat-, Laktat-, Ammonium- und Phosphatkonzentration 73	
4.5.3	Bestimmung der L-Tryptophankonzentration	74

4.5.4	Bestimmung der 1-Pentanal- und 1-Pentanol Konzentrationen	74
4.6	Enzymcharakterisierung	74
4.6.1	Enzymaktivitätstest.....	75
4.6.2	Bestimmung von Einflussgrößen.....	76
4.6.3	Bestimmung kinetischer Parameter	78
4.6.4	Evaluierung der Enzymstabilität	78
4.7	Ganzzell-Biotransformation	79
4.7.1	Vorversuche zur Untersuchung verschiedener Substrate auf <i>Haloferax volcanii</i> H1895	80
4.7.2	Biotransformation im Milliliter Maßstab	80
5	Deletion der Biofilmgene in <i>Haloferax volcanii</i> H1424.....	82
5.1	Deletion der Gene Hvo_1033 und Hvo_1034	82
5.2	Phänotypische Charakterisierung des Stammes Δ pilB3C3	83
5.2.1	Motilität	84
5.2.2	Oberflächen Adhäsionstest.....	84
5.3	Diskussion.....	86
6	Reaktionstechnische Charakterisierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1424 und H1895¹	89
6.1	Minimalmedien.....	89
6.1.1	Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1424 im Schüttelkolben.....	90
6.1.2	Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Rührkesselreaktor ...	91
6.2	Komplexmedium	94
6.2.1	Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1424 und H1895 im Schüttelkolben.....	94
6.2.2	Satzverfahren zur Kultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Rührkesselreaktor.....	95

6.3	Variation der Medienbestandteile.....	96
6.3.1	Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen.....	97
6.3.2	Erhöhung der Komplexbestandteile.....	98
6.3.3	Salzzusammensetzung im Kultivierungsmedium.....	101
6.4	Zellrückhaltung.....	103
6.5	Diskussion.....	105
7	Expression und Aufreinigung von halophilen Enzymen¹.....	111
7.1	Entwicklung eines Expressionsprotokolls.....	111
7.1.1	Einfluss von L-Tryptophan.....	112
7.1.2	Einfluss der Inkubationszeit.....	115
7.1.3	Diskussion.....	116
7.2	Alkoholdehydrogenasen aus den Pools Discovery und Atlantis II.....	117
7.2.1	Proteinausbeute im Schüttelkolben.....	118
7.2.2	Proteinausbeute im Rührkesselreaktor.....	118
7.2.3	Diskussion.....	121
7.3	Dihydrodipicolinat Reduktasen aus den Pools Discovery und Atlantis II.....	124
7.3.1	Proteinausbeuten im Rührkesselreaktor.....	124
7.3.2	Diskussion.....	127
8	Charakterisierung der Enzyme.....	129
8.1	Alkoholdehydrogenase ADH/D1.....	129
8.1.1	Substratspektrum und Cofaktorspezifität.....	129
8.1.2	Metallabhängigkeit.....	130
8.1.3	Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen.....	131
8.1.4	Bestimmung der kinetischen Parameter.....	133
8.1.5	Einfluss des Lösemittels DMSO.....	135
8.1.6	Lagerstabilität.....	138

8.1.7	Diskussion	138
8.2	Dihydrodipicolinat Reduktasen	145
8.2.1	Substratspektrum und Cofaktorspezifität	145
8.2.2	Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen	145
8.2.3	Bestimmung kinetischer Parameter	150
8.2.4	Lagerstabilität	150
8.2.5	Diskussion	151
9	Ganzzellbiokatalyse mit <i>Haloferax volcanii</i> H1895.....	156
9.1	Einfluss von 1-Pentanal, 1-Heptanal und Cinnamaldehyd	156
9.2	Parameterstudien.....	157
9.3	Diskussion.....	160
10	Zusammenfassung und Ausblick.....	163
11	Literaturverzeichnis.....	168
	Symbol- und Abkürzungsverzeichnis.....	190
	Abbildungsverzeichnis	191
	Tabellenverzeichnis	195
12	Anhang	198
12.1	Substrate	198
12.2	Plasmide.....	200
12.3	Puffer und Stocklösungen.....	201
12.4	Allgemeine Geräte und Materialien.....	202
12.5	Rührkesselreaktoren	204
12.6	Proteinaufreinigung	205
12.7	Analytische Verfahren	205

1 Einleitung

Produkte aus konventioneller chemischer Produktion werden für viele unterschiedliche Industriezweige wie den Automobilbau, die Lebensmittel-, Kunststoff- und Baustoffindustrie bereitgestellt und bestimmen daher unser tägliches Leben. Große Nachteile der chemischen Produktion sind jedoch die Abhängigkeit von fossilen Rohstoffen, die damit verbundene hohe CO₂ und Stickoxid Emission und die daraus resultierende Umweltzerstörung. Damit rückt eine bio-basierte und nachhaltige Produktion (Hatti-Kaul, Tornvall et al. 2007, Hollmann, Arends et al. 2011) nach den 12 Prinzipien von Anastas und Warner (1998) in den Fokus. Grundgedanke von Anastas und Warner ist einen Umstieg auf erneuerbare Ressourcen und biologisch abbaubare Produkte zu schaffen. Des Weiteren sollen für eine effizientere Produktion (Bio-) Katalysatoren (Enzyme) verwendet werden, um die Nebenprodukte und den Energieverbrauch zu minimieren (Anastas and Waren 1998, Arends, Sheldon et al. 2007). So können nach Bang et al. (2009) im Vergleich zur chemischen Industrie in der industrielle Biotechnologie jährlich ~33 Millionen Tonnen CO₂ vermieden werden (Bang, Follér et al. 2009). Ein weiterer Vorteil von Biokatalysatoren ist die hohe Regio- und Stereoselektivität, weshalb Enzym katalysierte Reaktionen vor allem zur Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien stetig eine zunehmende Anwendung finden (Meyer 2011). 2014 betrug in Deutschland der Umsatz in der industrielle Biotechnologie zum ersten Mal über 3 Mrd. €. Die Investitionen in die Forschung stiegen ebenfalls und betragen im gleichen Jahr 954 Mio. € in Deutschland (www.biotechnologie.de). Die von der Europäischen Kommission geförderten Ausschreibungen von verschiedenen Forschungsprojekte im Bereich der Biotechnologie unter dem Namen „Horizon 2020“ mit einem Gesamtvolumen von 80 Mrd. € unterstreichen die Bedeutung des neuen Forschungsgebiets und Industriesektors (<http://ec.europa.eu>). Ein Forschungsschwerpunkt stellt dabei die Verfügbarmachung neuer, extremophiler Enzyme dar, die, im Vergleich zu ihren mesophilen Homologen, eine Toleranz gegenüber hohen Salzkonzentrationen, extremen Temperaturen und pH Bereichen aufweisen und somit

industrielle Bedürfnisse besser erfüllen können (Sellek and Chaudhuri 1999, Eichler 2001, Rothschild and Mancinelli 2001, van den Burg 2003, Ferrer, Golyshina et al. 2007, Cavicchioli, Amils et al. 2011). Der Hauptteil an verwendeten Biokatalysatoren sind mesophilen Ursprungs und weisen hauptsächlich bei moderaten Reaktionsbedingungen eine ausreichende Stabilität und Aktivität auf (Hough and Danson 1999), sind jedoch gegenüber hohen Salzkonzentrationen, höheren Temperaturen oder extremen pH instabil. Zur Erweiterung des Biokatalysator Portfolios um extremophile Enzyme wurden extreme und abgelegene Habitate wie Salzseen, Geysire, die Atakama Wüste oder die Solebecken im Roten Meer untersucht (Eichler 2001, Lizama, Monteoliva-Sanchez et al. 2001, Gomes and Steiner 2004, Podar and Reysenbach 2006, Cao, Liao et al. 2008, Wang, Cao et al. 2013). Aufgrund der hohen Temperaturen (bis zu 68°C) und des hohen Salzgehalts (25 – 28%) bieten die Solebecken im Roten Meer eine interessante Quelle zur Entdeckung neuer thermo-halophiler Enzyme (Oren 1999a, Antunes, Ngugi et al. 2011, Wang, Cao et al. 2013). Aufgrund der hohen Stabilität thermo-halophiler Enzyme gegenüber hohen Temperaturen und Salzkonzentrationen (Zeikus, Vieille et al. 1998, Haki 2003) sind sie für industrielle Prozesse von großer Bedeutung und waren daher bisher hauptsächlich Gegenstand der Forschung (Adams, Perler et al. 1995, Rozzell 1999, Schiraldi and De Roas 2002, Gomes and Steiner 2004). In der Literatur publizierte thermo-halophile Enzyme stammen gleichermaßen von Bakterien und von Archäen und sind hauptsächlich Amylasen, Xylanase, Alkoholdehydrogenasen, Lipasen, Proteasen, Esterasen, Oxidoreduktasen oder Proteasen (Deutch 2002, Mijts and Patel 2002, Amoozegar, Malekzadeh et al. 2003, Perez-Pomares, Bautista et al. 2003, Sanchez-Porro, Mellado et al. 2003, Waino and Ingvorsen 2003, Wejse, Ingvorsen et al. 2003, Timpson, Alsafadi et al. 2012, Timpson, Liliensiek et al. 2013) (Adams, Perler et al. 1995, Hough and Danson 1999, Fujiwara 2002, van den Burg 2003, Egorova and Antranikian 2005).

Die heterologe Expression dieser extremophilen Gene wurde bisher hauptsächlich mit den (industriell) etablierten mesophilen Stämmen *Escherichia coli* (Mullakhanbhai and Larsen 1975, Bischoff and Rodwell 1996, Connaris, Chaudhuri et al. 1998, Connaris, West et al. 1998b, Cao, Liao et al. 2008) oder *Bacillus subtilis* (Kimura and Goto 1975, Jorgensen, Vorgias et al. 1997) durchgeführt. Daneben existieren zur extremophilen Genexpression noch thermo-halophile Stämme wie *Haloferax volcanii* (Holmes, Scopes et al. 1996, Jolley, Rapaport et al. 1996, Thompson, Palmer et al. 1999, Allers, Barak et al. 2010, Timpson, Alsafadi et al. 2012, Tripepi, You et al. 2012, Liliensiek, Cassidy et al. 2013) oder *Halobacterium* sp. NRC-1

(Camacho, Mateos-Diaz et al. 2010), die weniger etabliert sind, jedoch aufgrund ihrer natürlichen Habitate, ähnliche Eigenschaften aufweisen können, wie die zu exprimierenden Gene.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Extremophile Enzyme finden in verschiedenen Sparten der biotechnologischen Industrie, der Nahrungsmittelindustrie, der Synthese von Aminosäuren oder der Papierindustrie bereits Anwendung (Satosi, Seigo et al. 2001, Haki 2003). Aufgrund ihrer großen Stabilität gegenüber hohen Salzkonzentrationen und hohen Temperaturen sind thermo-halophile Enzyme für die Industrie von großer Bedeutung, da biotechnologische Prozesse nicht unter Effizienzeinbußen, den Enzymen angepasst werden müssen, sondern „maßgeschneiderte“ Enzyme verwendet werden können (Rozzell 1999). Damit könnte eine weitere Etablierung konkurrenzfähiger biotechnologischer Prozesse im Vergleich zur bereits voll etablierten chemischen Industrie einfacher möglich werden.

Zur Untersuchung thermo-halophiler Enzyme wurden im Rahmen des Kooperationsprojekts: „Discovery, Design and Computationally Guided Evolution of Novel Oxidoreductase Biocatalysts“ zwischen der Technischen Universität München (TUM) und der King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Gene aus dem Metagenom der Solebecken *Discovery*, *Atlantis II* und *Kebrut* im Roten Meer isoliert und mit Hilfe des *Profile ans Pattern Matching Algorithmus* (PPMA) zu 11 Enzymen annotiert (Grötzinger, Alam et al. 2014). Die annotierten Gensequenzen der Enzyme wurden an der KAUST im *Biological & Organometallic Catalysis Laboratory* in den Expressionsvektor pTA963 integriert und für die Expression an die TUM, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik geschickt.

Extremophile Enzyme sind durch strukturelle Besonderheiten an die extremen Habitate angepasst. Aufgrund dieser Adaption stellt die Expression thermo-halophiler Proteine in mesophilen Stämmen wie *Escherichia coli* eine Herausforderung dar, da Enzyme meist als Einschlusskörper exprimiert werden. Durch Rückfaltungsstudien kann die Enzymaktivität vereinzelt wieder hergestellt werden (Mullakhanbhai and Larsen 1975, Connaris, Chaudhuri et al. 1998), jedoch kann das Enzym auch inaktiv bleiben (Timpson, Alsafadi et al. 2012). Daneben ist es möglich, dass in diesen mesophilen Organismen keine Genexpression

beobachtet werden kann (Holmes, Scopes et al. 1996, Strillinger, Grotzinger et al. 2015). Daher sollte für die Expression im Rührkesselreaktor ein alternatives, halophiles Expressionssystem verwendet werden, das die halophilen Gene aus dem Metagenom des Roten Meeres voll funktionsfähig exprimieren kann.

Ein alternatives Expressionssystem für thermo-halophile Gene stellt der halophile Stamm *Haloferax volcanii* H1424 mit dem Expressionsplasmid pTA963 dar (Allers 2010, Allers, Barak et al. 2010). Das Plasmid pTA963 besitzt einen durch L-Tryptophan induzierbaren Promotor (*ptna*) (Large, Stamme et al. 2007). Die in das Plasmid integrierten thermo-halophilen Gene, die heterolog exprimiert werden, stehen unter der Kontrolle dieses Promotors. *Haloferax volcanii* H1424, ein optimierter Expressionsstamm, konnte bisher in verschiedenen chemisch definierten- und Komplexmedien im Schüttelkolben kultiviert werden (Timpson, Alsafadi et al. 2012, Timpson, Alsafadi et al. 2012, Karan, Capes et al. 2013). Dabei konnten mit *Haloferax volcanii* H1424 eine Endonuclease (Lestini, Laptanok et al. 2013), zwei Alkoholdehydrogenasen (Timpson, Alsafadi et al. 2012, Liliensiek, Cassidy et al. 2013) sowie eine Flagellenuntereinheit (Tripepi et al., 2012) hergestellt werden. Jedoch ist bei den *Haloferax volcanii* Stämmen eine starke Biofilmbildung zu beobachten. Damit können die Zellen mit überexprimierten intrazellulären Enzymen nicht einfach aus einem Rührkesselreaktor geerntet werden, so dass dieser Stamm so nicht zur Herstellung intrazellulärer Enzyme genutzt werden kann. Daher soll zunächst versucht werden, durch die Deletion Biofilm-bildender Gene in *Haloferax volcanii* H1424 einen Stamm zu erzeugen, der kein Wandwachstum mehr zeigt.

Zur Expression thermo-halophiler Gene in *Haloferax volcanii* ist bisher kein Expressionsprotokoll vorhanden. Daher sollen weiterhin geeignete Expressionsbedingungen unter Verwendung des Reportergens *bgaH* identifiziert werden. Das Gen *bgaH*, das für eine halophile β -Galaktosidase BGAH codiert, muss dafür ebenfalls unter der Kontrolle des Promotors *ptna* stehen. Schließlich sollen die Gene von zwei putativen Alkoholdehydrogenasen und zwei putativen Dihydrodipicolinat Reduktasen, die vom KAUST aus Metagenomproben von verschiedenen Solebecken des Roten Meers isoliert wurden, mit Hilfe von *Haloferax volcanii* im Rührkesselreaktor exprimiert, die Genprodukte isoliert und aufgereinigt werden und das Substratspektrum der gereinigten Enzyme hinsichtlich Ausbeute, Aktivität sowie

Toleranz gegenüber verschiedene Salzkonzentrationen und erhöhten Temperaturen charakterisiert werden.

Zur Erreichung des Ziels wurde die vorliegende Arbeit in folgende Teile gegliedert:

- Deletion der Biofilm-bildender Gene in *Haloferax volcanii* H1424 zur Eliminierung der Biofilmbildung
- Reaktionstechnische Charakterisierung von *Haloferax volcanii* H1895 und Etablierung eines Satzverfahrens im Rührkesselreaktor (Arbeitsvolumen 2 L)
- Entwicklung eines Expressionsprotokolls mit Hilfe der halophilen β -Galaktosidase BGAH unter Verwendung des Expressionssystem *Haloferax volcanii* H1895_pTA1228-bgaH.
- Expression der Alkoholdehydrogenasen (ADH) aus *Discovery* (ADH/D1) und *Atlantis II* (ADH/A1) und der Dihydrodipicolinat Reduktasen (DR) aus *Discovery* (DR/D1) und *Atlantis II* (DR/A1)
- Charakterisierung der Alkoholdehydrogenase ADH/D1 und der Dihydrodipicolinat DR/D1 und DR/A1

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 *Deep Red Sea Brine Pools*

Deep Red Sea Brine Pools (DSBP) ist in der englisch sprachigen Fachliteratur ein feststehender Begriff zur Bezeichnung der Solebecken oder Salzlaken im Roten Meer. Im Deutschen existiert kein Eigenname. In der vorliegenden Arbeit werden die DSBP als Solebecken im Roten Meer bezeichnet. Eine genauere Unterscheidung erfolgt dann durch die Bezeichnung der Solebecken mit dem jeweiligen Namen.

3.1.1 **Eigenschaften und geographische Lage**

Die Solebecken liegen am Grund des Roten Meers entlang des insgesamt 7000 km langen Grabenbruches zwischen der afrikanischen und der arabischen Kontinentalplatte (Pierret, Clauer et al. 2001, Antunes, Ngugi et al. 2011). Die beiden Kontinentalplatten bewegen sich stetig mit einer Geschwindigkeit von 1 cm a^{-1} voneinander weg, wodurch im Roten Meer ein Grabenbruch mit einer Länge von 1680 km und einer derzeitigen Tiefe von 1300 – 2500 m entstand (Scholten, Stoffers et al. 2000, Augustin, Devey et al. 2014). Aufgrund der plattentektonischen Bewegungen wurden Salzablagerungen (Evaporite) im Sediment freigelegt (Antunes, Ngugi et al. 2011, Stingl, Ngugi et al. 2012), die bei der letzten Austrocknung des Roten Meeres im Miozän vor etwa 5 – 10 Mio. Jahren entstanden sind. Die freigelegten Evaporite lösten sich im umgebenden Meerwasser, wodurch die erwähnten Solebecken entstanden sind (Cita 2006, Hovland, Kuznetsova et al. 2006, Stingl, Ngugi et al. 2012). Durch die höhere Dichte der Salzsole im Vergleich zum umliegenden Meerwasser ist eine Vermischung zum umgebenden Meerwasser ausgeschlossen, weshalb die Solebecken sehr stabil sind (DasSarma and Arora 2001). Die Solebecken werden in zwei Typen unterschieden. Typ I Becken sind hauptsächlich durch die plattentektonische Bewegungen und die daraus hervorgerufene Lösung der Evaporite beeinflusst. Wohingegen Typ II noch zusätzlich durch vulkanische Aktivitäten am Meeresboden beeinflusst wird (DasSarma, Kennedy et al. 2001). Aufgrund der vulkanischen Aktivität am Grund des Roten Meers ist ein schrittweiser Anstieg

der Temperatur von der Grenzfläche zwischen Sole und Meerwasser bis zum Grund des Beckens zu beobachten. Mit zunehmender Tiefe steigen auch die Salinität und die Dichte der Sole (Emery, Hunt et al. 1969). Aufgrund der Tiefe, der Salinität und der Temperatur sind die Solebecken sehr sauerstoffarm oder sogar absolut anaerob (Antunes, Ngugi et al. 2011). Die unwirklichen Lebensbedingungen schaffen ökologische Nischen für (fakultativ) anaerobe, halo- und thermophile Bakterien und Archaeen. Als Nährstoffe dienen verschiedene organische Säuren, Zucker oder Alkohole, die von anderen Mikroorganismen als Metabolite hergestellt und ins Meerwasser ausgeschieden werden (Oren 2008).

Während der schwedischen Albatross Expedition von 1947 – 1948 konnte zum ersten Mal nach Charnock (1964) ein „abnormales“ salzhaltiges Wasser am Grund des Roten Meers nachgewiesen werden, das sich vom umgebenden Meerwasser in den physikalischen und chemischen Eigenschaften unterschied (Bruneau, Jerlov et al. 1953). Durch weitere Forschungsexpeditionen wurde dann das erste Solebecken *Atlantis II* entdeckt. Aufgrund einer hohen Konzentration an Schwermetallen wie Silber, Zink, Gold oder Kupfer, die in diesem Solebecken nachgewiesen werden konnte (Betram, Krätschell et al. 2011, Stingl, Ngugi et al. 2012), wurde mit großen Interesse nach weiteren Solebecken gesucht. Bisher konnten 25 dieser Solebecken im nördlichen Teil des Roten Meer gefunden werden (Charnock 1964, Miller 1964).

3.1.2 Solebecken *Discovery*, *Atlantis II* und *Kebrit*

Im Rahmen des Forschungsprojekts wurden Proben aus den drei Solebecken *Kebrit*, *Atlantis II* und *Discovery* genommen (siehe Abbildung 3.1). Im Folgenden sollen diese drei Solebecken genauer erklärt werden.

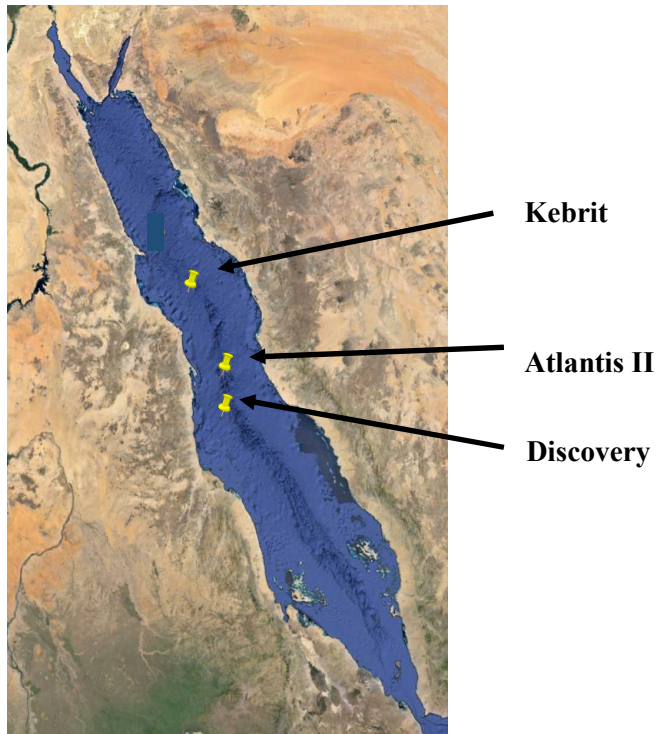


Abbildung 3.1: Rotes Meer mit den Solebecken, *Kebrit*, *Discovery* und *Atlantis II*.

Atlantis II

Atlantis II ist mit einer Fläche von 60 km^2 und einem Volumen von 20 km^3 das größte Solebecken im Roten Meer (Antunes, Ngugi et al. 2011, Stingl, Ngugi et al. 2012). Die maximale Tiefe des Solebeckens beträgt 2194 m mit einer 200 m dicken Soleschicht. Das Becken ist aus drei, in Hinblick auf physikalische und chemische Eigenschaften, unterschiedlichen Salzsichten aufgebaut. Die Temperatur steigt von 55°C an der Oberfläche des Beckens bis zur tiefsten Stelle auf 68°C . Die Salinität liegt in den Salzsichten bei $25,7 \%$ (w/v), wohingegen der pH mit zunehmender Tiefe von $6,8$ auf bis zu $5,3$ sinkt (Miller, Densmore et al. 1966, Backer and Schoell 1972, Karbe 1987). Da es sich bei *Atlantis II* um einen Typ II Solebecken handelt, sind die hohen Temperaturen am Grund des Beckens auf vulkanische Aktivität zurückzuführen (Wang, Cao et al. 2013). Stickstoff, CO_2 , Ethan und H_2S bilden den größten Anteil der gelösten Gase im Solebecken (Backer and Schoell 1972, Faber, Botz et al. 1998). Im Solebecken werden zudem 100 Mio. Tonnen Erz vermutet, davon sind

etwa 2,5 Mio. Tonnen Zink, 500.000 Tonnen Kupfer, 6000 Tonnen Silber und 50 Tonnen Gold (Rademacher 1999). Damit zählt das Solebecken zu den größten Erzvorkommen der Welt und ist von großem wirtschaftlichem Interesse (Hendricks, Reisbick et al. 1969).

In 1960ern wurde begonnen die Solebecken *Discovery* und *Atlantis II* nach lebenden Mikroorganismen zu untersuchen. In den ersten Untersuchungen konnten keine Mikroorganismen isoliert werden, weshalb die Annahme getroffen wurde, dass diese Habitate aufgrund der extremen Bedingungen einen ungeeigneten Lebensraum für Mikroorganismen darstellen (Watson and Waterbury 1969). Nach mehreren Jahren Forschungsarbeit konnte 1990 der erste charakterisierte Mikroorganismus *Flexistipes sinusarabici* aus *Atlantis II* publiziert werden (Fiala, Woese et al. 1990). In den folgenden Jahren konnten in den verschiedenen Salzsichten von *Atlantis II* weitere halophile und methanogene Mikroorganismen isoliert werden (Siam, Mustafa et al. 2012).

Discovery

Das Solebecken *Discovery* liegt in einer Tiefe von 2180 m in unmittelbarer Nähe zum Solebecken *Atlantis II* (Siam, Mustafa et al. 2012). Das Becken hat eine Breite von 2,5 km und eine Länge von 4 km. Bis 1964 wurde das Solebecken noch als Erweiterung von *Atlantis II* beschrieben. Genauere Untersuchungen ergaben jedoch, dass es sich um ein eigenes Solebecken mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften handelt. So besteht *Discovery* aus einer homogenen Salzsicht mit einer Temperatur von 45°C und einem pH von 6,2. Die Salinität liegt bei 25,5% (w/v) (Antunes, Ngugi et al. 2011, Wang, Cao et al. 2013). Die Konzentration von Mn^{2+} beträgt 64 mg L⁻¹. Die Konzentration an Fe^{2+} liegt hingegen bei 1 mg L⁻¹. Im Solebecken konnten hauptsächlich halophile Mikroorganismen wie *Halococcus* sp., *Halobacterium* sp., *Halosimplex* sp. und *Natronomonas* sp. isoliert werden.

Kebrut

Das Solebecken *Kebrut* ist mit einer Größe von 2,5 km² das kleinste Becken im Roten Meer und gehört zu den Typ I Solebecken. Es liegt etwa 400 km nördlich vom Solebecken *Atlantis II*. Das Becken weist eine Tiefe von maximal 1549 Meter mit einer 84 m dicken, leicht sauren (pH 5,5) und anaeroben Soleschicht auf. Die Salinität beträgt 26% (Bignell, Cronan et al. 1976, Pautot, Guennoc et al. 1984, Scholten, Stoffers et al. 2000). Die Temperatur am tiefsten Punkt

liegt bei 23,3°C (Backer and Schoell 1972, Hartmann, Scholten et al. 1998, Eder, Ludwig et al. 1999). Damit ist *Kebricit* nicht nur das kleinste, sondern auch eines der kältesten Solebecken. Die Gase CO₂ und H₂S sind, neben N₂, Ethan und Methan, im Solebecken hauptsächlich vorhanden (Backer and Schoell 1972). Die Benennung des Solebeckens mit dem arabischen Wort für Schwefel beruht auf den hohen Sulfid Konzentrationen (12 – 14 mg L⁻¹) im Solebecken (Michaelis, Jenisch et al. 1990). Dementsprechend wurden Hinweise auf eine biogene Sulfatreduktion entdeckt, die bei der Bildung von Sulfid involviert ist (Blum and Puchelt 1991, Faber, Botz et al. 1998). Darüber hinaus wurden verschiedene Organismen wie *Clostridia*, *Spirochäten* und *Actinobacteria* (Eder, Jahnke et al. 2001), oder Eisen oxidierende *Mariprofundus ferroxydans* isoliert (Emerson, Rentz et al. 2007).

3.1.3 Neue Enzyme aus den Solebecken im Roten Meer

Während einer gemeinsamen Forschungsexpedition zwischen der *American University of Cairo* und der *King Abdullah University of Science and Technology* (AUC-KAUST) im Oktober/November 2011 wurden aus den Solebecken *Discovery*, *Atlantis II* und *Kebricit* im Roten Meer Proben genommen. Die Probennahme erfolgte im Sediment der Solebecken, an der Grenzfläche zwischen Meerwasser und Sole, sowie in den unterschiedlichen Schichten der Solebecken. Insgesamt wurden 7030 L Wasser und sieben Sedimentproben untersucht (Grötzinger, Alam et al. 2014). Eine Sequenzierung und Annotation der Gene durch PROSITE ID erfolgte nach einer Einzelgenom Amplifizierung (Liu, Li et al. 2010). Die Daten wurden in der Datenbank INDIGO bereitgestellt (Alam, Antunes et al. 2013). Aufgrund teilweiser schlechter Qualität der Einzelgenom-Amplifizierung und einer sehr geringen Homologie (< 30%) gegenüber anderen Enzymen, stellte die richtige Zuordnung der enzymatischen Funktion zum jeweilig codierenden Gen große Herausforderungen dar. Aufgrund der geringen Homologie ist die Wahrscheinlichkeit für falsch – positive Zuordnungen (gleiches Aminosäuremotiv jedoch andere Funktion) groß. Zur Verbesserung der Verlässlichkeit wurde der sogenannte *Profile and Pattern Matching Algorithmus* entwickelt (Grötzinger, Alam et al. 2014). Dieser Algorithmus verbindet (a) die Informationen aus Gen-Ontologie Termini, die eine Verbindung zwischen Enzymfunktion und der Aminosäuresequenz (*Profile*) herstellen (Ashburner, Ball et al. 2000) und (b) die PROSITE IDs, die mit Konsensusmotiven (*Pattern*) von Aminosäuresequenzen gekoppelt sind (Sigrist, de Castro et al. 2013).

Anhand des PPM Algorithmus konnte elf annotierten Genen eine Funktion zugewiesen werden. Diese sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Aufstellung der identifizierten Gen mit Hilfe des PPM Algorithmus (Grötzinger, Alam et al. 2014)

Gen	Enzym	Solebecken
af_d	Alkoholdehydrogenase (Fe ²⁺)	<i>Discovery</i>
az_a	Alkoholdehydrogenase (Zn ²⁺)	<i>Atlantis II</i>
hd_k	2-Hydroxyacid Dehydrogenase	<i>Kebrit</i>
sp_a	Subtilisin	<i>Atlantis II</i>
pd_a	Prephenat Dehydrogenase	<i>Atlantis II</i>
dr_a1	Dihydrodipicolinat Reduktase 1	<i>Atlantis II</i>
dr_a2	Dihydrodipicolinat Reduktase 2	<i>Atlantis II</i>
dr_k	Dihydrodipicolinat Reduktase	<i>Kebrit</i>
dr_d	Dihydrodipicolinat Reduktase	<i>Discovery</i>
ca_a	Carbonanhydrase	<i>Atlantis II</i>
ca_d	Carbonanhydrase	<i>Discovery</i>

Die Benennung der Enzyme im weiteren Text setzt sich aus der Abkürzung für das Enzym (ADH für Alkoholdehydrogenase und DR für Dihydrodipicolinat Reduktase) sowie dem Solebecken (A für Atlantis, D für Discovery und K für Kebrit) zusammen.

3.2 Archaeen, die dritte Domäne des Lebens

Der für die Genexpressionen verwendete Stamm, *Haloferax volcanii*, gehört zum Reich der Archaeen. Archaeen sind niedrige einzellige Organismen und bilden neben Bakterien und Eukaryoten die dritte Domäne zellulärer Lebewesen (siehe Abbildung 3.2). Sie werden für die nächsten und modernsten Verwandten zu den ersten Lebewesen auf der Erde gehalten. Obwohl sie im Mechanismus der Transkription und der Translation sehr den Eukaryoten ähneln (Drews 2015), werden sie jedoch aufgrund ihrer zellulären Organisation und des Vorhandenseins eines Zellkernäquivalents den Prokaryoten zugeordnet. Die Abtrennung der Archaeen von den Bakterien als eigene Domäne und die Verwendung der Begrifflichkeit *Archaeae* oder *Archaeobacterium* stammt aus den 1970ern. Zuvor waren die Archaeen den Bakterien zugeordnet (Woese, Kandler et al. 1990). Woese et al. gelang es in den 1970ern Jahren durch die Untersuchung und den Vergleich der 16 sRNA verschiedener Prokaryoten die Archaeen

aufgrund großer Unterschiede in der 16 sRNA als eigene Domäne auszumachen (Woese, Kandler et al. 1990). Ähnlich zu den Bakterien spalten sich die Archaeen in viele taxonomische Gruppen auf (Drews 2015), die zum großen Teil noch nicht untersucht wurden. 0,1 – 1% aller Archaeen konnten bisher isoliert und charakterisiert werden, wohingegen etwa 1 – 10% aller Bakterien bereits bekannt sind (Burton, Cowan et al. 2002).

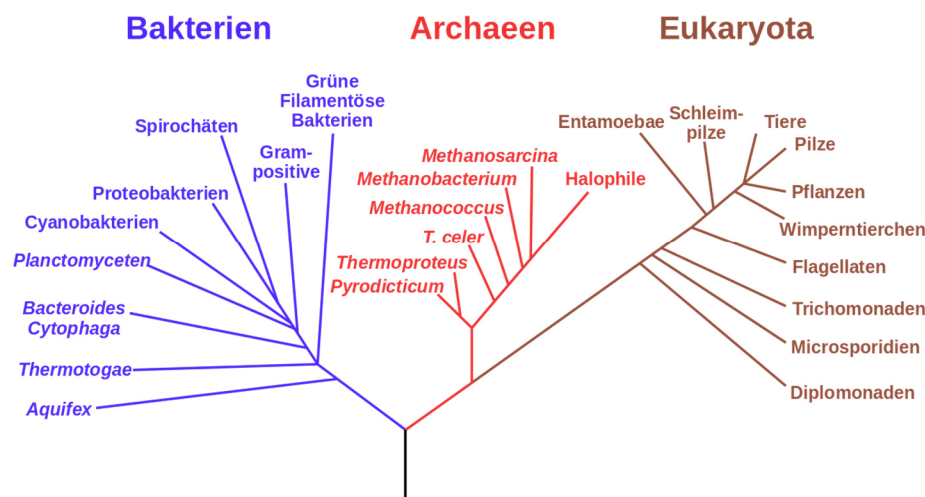


Abbildung 3.2: Phylogenetischer Stammbaum der drei Domänen, Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Robinson 2016).

Der Aufbau der Zellwand in Archaeen unterscheidet sich deutlich zur bakteriellen Zellmembran. So ist die *S-layer* (*Surface layer*, Oberflächenschicht, Zellwand der Archaeen) aus einer Spezies an (Glyco-) Proteinen aufgebaut mit einer Molekularen Masse von 40.000 – 200.000 Da (Messner and Sleytr 1992, Slytr, Messner et al. 1996). Die Membran verfügt über eine Stärke von 5 – 15 nm. Die Oberflächenschicht ist hauptsächlich durch schwach saure Proteine mit einem Isoelektrischen Punkt zwischen pH 3 und 6 aufgebaut. Daher befinden sich zu 15 mol% die Aminosäuren Glutamat und Aspartat im Protein (Slytr and Sára 1997). Die in der Oberflächenschicht verwendeten (Glyco-)Proteine sind taxonomisch nicht spezifisch. So sind Unterschiede im Aufbau bereits innerhalb von einzelnen Archaeen Stämmen zu beobachten (Sára and Sleytr 2000). Der flexible Aufbau der Oberflächenschichten in Archaeen könnte ein Grund für die Anpassungsfähigkeit an unterschiedlichste Habitate sein. Dazu

formieren die (Glyco-) Proteine zweidimensionale Kristalle, die in verschiedenen hexagonalen, quadratischen und obliquen Symmetrien vorliegen können (Slytr and Sára 1997). Die damit erreichte Stabilität kann einen weiteren Beitrag zur Fähigkeit der Archaeen sein, in extreme Habitate zu proliferieren.

3.3 Übersicht der Enzyme

Unter den 11 annotierten Enzymen aus dem Metagenom verschiedener Solebecken des Roten Meeres befinden sich auch Alkoholdehydrogenasen und Dihydrodipicolinat Reduktasen. Da diese Enzyme im Verlauf dieser Forschungsarbeit in *Haloferax volcanii* exprimiert wurden, soll im Folgenden die Eigenschaften der Enzyme genauer beschrieben werden. Darüber hinaus wurde eine halophile β -Galaktosidase in *Haloferax volcanii* exprimiert. Auch die Eigenschaften dieses Enzyms sollen kurz erläutert werden.

3.3.1 Alkoholdehydrogenasen

Alkoholdehydrogenasen sind ubiquitär in Pro- und Eukaryonten vorhanden, gehören zu den Oxidoreduktasen (E.C. 1.1.1-) und katalysieren die Oxidation von Alkoholen zum entsprechenden Aldehyd oder Keton unter der Verwendung eines Cofaktors. Eine Bildung von (chiralen) Alkoholen aus Aldehyden und Ketonen ist ebenfalls möglich.

Die bisher bekannten Alkoholdehydrogenasen werden anhand ihrer benötigten Cofaktoren in drei große Gruppen unterteilt: i) NAD oder NADP, ii) Pyrrolo-quinolin, Häm oder F₄₂₀ und iii) FAD abhängige Alkoholdehydrogenasen (Reid and Fewson 1994). Dabei werden die Alkoholdehydrogenasen mit NAD⁺ oder NADP⁺ als Cofaktor in 1) langkettige und Zn²⁺ abhängige, 2) kurzkettige und 3) Fe²⁺ abhängige Alkoholdehydrogenasen unterschieden (Jörnvall, Persson et al. 1987). Die langkettigen Alkoholdehydrogenasen (etwa 350 Aminosäurereste) können als Di- oder Tetramere auftreten und komplexieren pro Monomereinheit ein Zn²⁺ Ion. Ein Zinkion ist direkt am aktiven Zentrum lokalisiert, wodurch es an der katalytischen Umsetzung teilnimmt. Das zweite Zinkion hingegen wird zur Stabilisierung der Monomeruntereinheiten benötigt (Sun and Plapp 1992). Kurzkettigen Alkoholdehydrogenasen (etwa 250 Aminosäurereste) weisen kein komplexiertes Metallion auf (Jörnvall, Persson et al. 1981, Jeffery, Cederlund et al. 1984, Persson, Krook et al. 1991).

Alkoholdehydrogenasen verfügen über ein großes Substratspektrum. So können mit Alkoholdehydrogenasen Ketone, Aldehyde oder chirale Alkohole industriell hergestellt werden, die als Intermediate in der Nahrungsmittelindustrie oder in der pharmazeutischen Industrie benötigt werden (Hummel 1999, Machielsen, Uria et al. 2006). Des Weiteren finden sie Anwendung in der katalytischen Zersetzung von Lignin (Reid and Fewson 1994, Ander and Marzullo 1997) oder in der Herstellung von Trinkalkohol (Lamed and Zeikus 1980).

Neben den mesophilen Alkoholdehydrogenasen konnten viele thermophile Alkoholdehydrogenasen (siehe Übersichtsartikel (Radianingtyas and Wright 2003) aus Bakterien und Archaeen isoliert werden. Sie zeichnen sich durch eine hohe Halbwertszeit (> 150 h) in einem Temperaturbereich von 60 – 100°C aus (Voorhorst, Geerling et al. 1999, van der Oost, voorhorst et al. 2001). Bis auf eine Alkoholdehydrogenase verfügen alle thermophilen Alkoholdehydrogenasen über NAD(P)⁺ als Cofaktor. Davon sind etwa 50% der Gruppe langkettige, Zn²⁺ abhängige Alkoholdehydrogenasen, wohingegen die zweite Hälfte aus kurzkettigen und Fe²⁺ Alkoholdehydrogenasen gebildet wird (Radianingtyas and Wright 2003). Nur eine Alkoholdehydrogenase aus *Methanocelleus thermophilicus* ist F₄₂₀ abhängig (Klein, Berk et al. 1996, Berk and Thauer 1997). Aufgrund der gleichen Cofaktorverwendung wurde postuliert, dass der katalytische Mechanismus zur Umsetzung der Substrate gleich zum Mechanismus in den mesophilen Enzymen ist (Vieille, Hess et al. 1995, Voorhorst, Eggen et al. 1995, Rost 1999). Gestützt wird diese Hypothese zum Einen durch eine Sequenzhomologie von 40 – 85% zwischen thermophilen und mesophilen Alkoholdehydrogenasen und zum anderen durch die nahezu deckungsgleiche 3D Struktur der Enzyme (Vieille and Zeikus 1996). Damit ergibt sich, dass keine für Thermophilie spezifischen Sequenzmotive bei Alkoholdehydrogenasen existieren (Radianingtyas and Wright 2003).

3.3.2 Dihydrodipicolinat Reduktasen

Die Dihydrodipicolinat Reduktase ist in Gram-positiven und in Gram-negativen Bakterien sowie höheren Pflanzen vorhanden (Ge, Olsen et al. 2008). Das Enzym und die katalysierte Reaktion (siehe Abbildung 3.3) wurde von Farkas und Gilvarg (1965) zum ersten Mal beschrieben. Aus den Substraten S-Aspartat-Semialdehyd und Pyruvat katalysiert die Dihydrodipicolinat Synthase das instabile Intermediat Dihydrodipicolinat, das als Substrat für die Reduktion zu Tetrahydrodipicolinat mit Hilfe der Dihydrodipicolinat Reduktase unter

Verwendung des Cofaktors NAD(P)H dient (siehe Abbildung 3.3) (Farkas and Gilvarg 1965, Scapin, Reddy et al. 1997, Coulter, Gerrard et al. 1999, Paiva, Vanderwall et al. 2001).

Aufgrund der zentralen Rolle des Enzyms im Lysin-Biosyntheseweg dient es als Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Antibiotika und Pestizide (Cirillo, Weisbrod et al. 1994, Pavelka, Weisbrod et al. 1997, Zhang, Pohnert et al. 1998, Cirillo, Zheng et al. 2003, Zhang, Post-Martens et al. 2006, Dommaraju, Dogovski et al. 2011, Dogovski, Dommaraju et al. 2012). Die gezielte Inhibierung der Dihydrodipicolinat Reduktase stellt einen neuen Weg dar Antibiotika und Pestizide zu entwickeln, die auch bei multiresistenten Organismen Wirkung zeigen (Pearce, Sprissler et al. 2008). So kann eine Dihydrodipicolinat Reduktase durch Isophthansäure (K_I 0,43 μ M), Dipicolinsäure (K_I 0,53 μ M) oder 2,6-Pyridindicarboxylat (K_I 26 μ M) kompetitiv inhibiert werden (Coulter, Gerrard et al. 1999, Cirillo, Zheng et al. 2003). Eine Substrat- oder Produktinhibierung der Dihydrodipicolinat Reduktase konnte bisher nicht beobachtet werden (Coulter, Gerrard et al. 1999). Daher konzentrierten sich viele durchgeführte Untersuchungen auf die Strukturaufklärung des Enzyms in verschiedenen Organismen wie *Bacillus subtilis* (Kimura and Goto 1975), *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* (Kimura and Goto 1977), *Escherichia coli* (Reddy, Sacchettini et al. 1995, Scapin, Reddy et al. 1997, Dobson, Griffin et al. 2004) *Mycobacterium tuberculosis* (Cirillo, Weisbrod et al. 1994, Pavelka, Weisbrod et al. 1997, Cirillo, Zheng et al. 2003, Pearce, Sprissler et al. 2008) und *Staphylococcus aureus* (Dommaraju, Dogovski et al. 2011, Dogovski, Dommaraju et al. 2012). Obwohl die Sequenzhomologie der Enzyme unter den verschiedenen Stämmen sehr gering ist (<30%) weisen die Enzyme in der Tertiärstruktur große Ähnlichkeiten auf. So liegt das Enzym als Homotetramer vor, dessen Substratbindestelle am C-Terminus hochkonserviert ist. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Reaktionsmechanismus des Enzyms unabhängig vom Organismus ist (Cirillo, Weisbrod et al. 1994, Cirillo, Zheng et al. 2003). Darüber hinaus ist eine detaillierte Untersuchung der Enzyme und Regelungsmechanismen im Lysin-Biosyntheseweg für die großtechnische Produktion von L-Lysin wichtig. 100.000 Tonnen der Aminosäure werden jährlich mit *Lactobacillus plantarum* oder *Corynebacterium glutamicum* als Ergänzungsmittel zu natürlichen, L-Lysin armen Futtermitteln, wie Getreide, produziert (Georgi T, Rittmann et al. 2005, Cahyanto, Kawasaki et al. 2006).

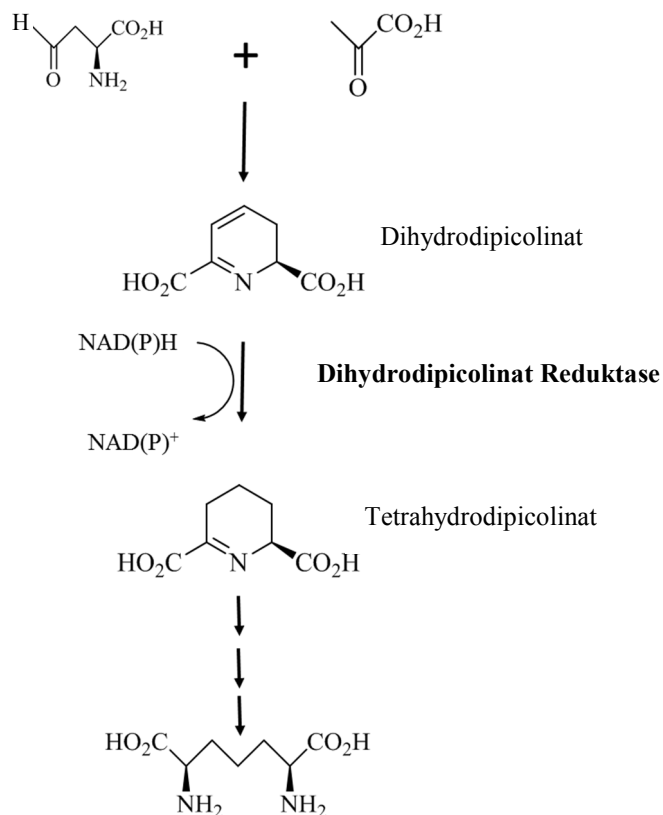


Abbildung 3.3: Reaktion von Dihydrodipicolinat zu Tetrahydrodipicolinat katalysiert durch die Dihydrodipicolinat Reduktase (Paiva, Vanderwall et al. 2001).

3.3.3 Halophile β -Galaktosidase aus *Haloferax alicanti*

Zur Erleichterung von Genexpressionsstudien in halophilen Organismen sollte, nach dem Beispiel von *lacZ* in *Escherichia coli*, ein Reporter-gen gefunden werden, das gut und reproduzierbar in verschiedenen halophilen Organismen exprimiert werden kann. Darüber hinaus sollte mit dem exprimierten Enzym einfache und quantifizierbare Tests durchgeführt werden können, die Rückschlüsse auf die Expressionsstärke zulassen (Holmes, Scopes et al. 1996, Holmes and Dyall-Smith 2000). Das Gen *lacZ* codiert innerhalb des *lac*-Operons eine β -Galaktosidase und wird als Modellsystem zur Untersuchung von Genexpressionen und Genregulationen verwendet (Jacob, Perrin et al. 1960, Santillan and Mackey 2008). Des Weiteren gibt es für *lacZ* bereits etablierte Quantifizierungsverfahren (Torreblanca, Rodriguez-Valera et al. 1986, Beale, Deep et al. 1992). Jedoch konnte das mesophile Gen *lacZ* nicht in

halophilen Organismen exprimiert werden (Holmes and Dyall-Smith 2000). Verschiedene halophile Archäen verfügen jedoch ebenfalls über β -Galaktosidasen (Torreblanca, Rodriguez-Valera et al. 1986), weshalb aus dem halophilen Organismus *Haloferax alicanteii* das Gen *bgaH* isoliert werden konnte, das eine halophile β -Galaktosidase (74 kDa) codiert (Holmes and Dyall-Smith 2000). Mit dem aufgereinigten Enzym konnte bei der Umsetzung von ortho-Nitrophenyl- β -Galaktopyronosid (ONPG) zu ortho-Nitrophenol (ONP) (bei Raumtemperatur und in 4 M NaCl Puffer) eine maximale spezifische Aktivität von 42 U mg^{-1} erreicht werden (Holmes, Scopes et al. 1996). Da die Reaktionen reproduzierbar sind und BGAH eine große Stabilität aufweist, kann es als Reportergen zur Untersuchung halophiler Genexpressionen verwendet werden (Holmes and Dyall-Smith 1990, Holmes, Kamekura et al. 2008).

3.4 Industrieller Nutzen extremophiler Proteine

Ein idealer (Bio-) Katalysator zeichnet sich durch eine hohe Stereo- und Regioselektivität, eine hohe Produktausbeute und eine lange Betriebszeit aus. Des Weiteren sollte der Biokatalysator nicht den limitierenden Faktor im Prozess darstellen (Burton, Cowan et al. 2002). Enzyme beschleunigen Reaktionen um einen Faktor von $10^6 - 10^{17}$ gegenüber unkatalysierten Reaktionen mit Wechselzahlen bis zu 600.000 s^{-1} und einem Enantiomerenüberschuss von $>99\%$. Jedoch stammt die Mehrheit der verwendeten Enzyme aus mesophilen Mikroorganismen (Eichler 2001), weshalb die Anwendung dieser Enzyme auf einen engen Reaktionsbereich ($20 - 37^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5 - 8$) limitiert ist. Um nicht den limitierenden Faktor in industriellen Prozess darzustellen, werden somit häufig Enzyme benötigt, die eine hohe Stabilität gegenüber extremeren Temperatur- ($-2 - 15^\circ\text{C}$, $60 - 110^\circ\text{C}$), und pH Bereichen ($\text{pH} < 4$, $\text{pH} > 9$) sowie Salzkonzentrationen ($2 - 5 \text{ M NaCl}$) aufweisen (Eichler 2001, Hatti-Kaul, Tornvall et al. 2007). Nach Hatti-Kaul et al., (2007) ergeben sich daher für den biotechnologische Industriesektor verschiedene Herausforderungen:

- Entwicklung neuer und verbesserter Biokatalysatoren zur Herstellung verschiedener Chemikalien

- Entwicklung effektiver Suchverfahren zur Identifizierung der Biokatalysatoren mit der gewünschten Eigenschaft und Funktion
- Günstigere und effizientere Biokatalysator Produktion durch Hochzelldichteverfahren mit entsprechenden Expressionsstämmen
- Integration der biotechnologischen Prozesse in die etablierten chemischen Prozesse

Mit der Verwendung von Enzymen aus extremophilen Mikroorganismen in industriellen Prozessen kann es möglich werden, industriellen Anforderungen noch besser gerecht zu werden. Des Weiteren existiert durch die Untersuchung von Mikroorganismen aus extremen Habitaten eine Möglichkeit neue und extremophile Biokatalysatoren zu entdecken. Im Folgenden werden Beispiele für extremophile Enzyme genannt, die in der Industrie bereits Anwendung finden und etablierte chemische Prozesse ersetzt haben.

Thermophile Enzyme haben bisher den größten Anteil an Extremozymen in industriellen Prozessen, da höhere Reaktionstemperaturen mit höheren Reaktionsraten einher gehen (Danson and Hough 1998, Hough and Danson 1999, Eichler 2001). Der größte Anteil an thermophilen Enzymen nehmen Amylasen ein, die in der Nahrungsmittelindustrie zur Herstellung von Glukose-Fruktose-Sirup, Maltodextrin oder zur Aufspaltung von Stärke benötigt werden. Die enzymatische Hydrolyse von Stärke hat die chemische Hydrolyse bereits ersetzt (Das, Singh et al. 2001, Souza and Magalhaes 2010, Sundarram, Pandurangappa et al. 2014). Weitere Anwendungsmöglichkeiten finden sich in der Textil- und Papierindustrie oder in der Herstellung von Detergenzien (Amoozegar, Malekzadeh et al. 2003, Perez-Pomares, Bautista et al. 2003, Asgher, Asad et al. 2007). So konnten Amylasen aus verschiedenen Mikroorganismen isoliert werden, die in einem Temperaturbereich von 50 – 110°C, einem pH Bereich von pH 4 – pH 7,5 und einer Salzkonzentration von 0,003 – 3 M stabil und aktiv sind (Das, Singh et al. 2001, Deutch 2002, Mijts and Patel 2002, Perez-Pomares, Bautista et al. 2003, Souza and Magalhaes 2010)

Obwohl halophile Enzyme aufgrund ihrer hohen Stabilität in salinen Medien ein großes Potential für industrielle Prozessanwendungen bieten, wurde ihr biotechnologisches Potential bisher wenig beachtet (Eichler 2001, Alquéres, Almeida et al. 2007). Außer den halophilen Amylasen, die bei einer Salzkonzentration von 3 – 4 M aktiv und stabil sind und darüber hinaus eine hohe Toleranz gegenüber organischen Lösemittel aufweisen (Onishi 1971, Kumar and

Nussinov 2004, Shafiei, Ziaee et al. 2012), wurde aus *Natronomonas pharaonis* noch eine haloalkaliphile Protease (Stan-Lotter, Doppler et al. 1999) isoliert und verschiedene

Alkoholdehydrogenasen (Cao, Liao et al. 2008, Timpson, Alsafadi et al. 2012, Timpson, Liliensiek et al. 2013). Eine weitere Anwendung halophiler Enzyme resultiert aus der Tatsache, dass halophile Enzyme oft hohe Toleranz gegenüber organischen Lösemitteln zeigen. Salz verringert die Wasseraktivität ebenso wie organische Lösemittel, weshalb halophile Enzyme im Vergleich zu mesophilen Enzymen eine große Toleranz gegenüber organischen Lösemitteln zeigen. Eine extrazelluläre Protease des Stammes *Halobacterium formamid* wird industriell in eine Zweiphasensystem aus Wasser und N-N'-Dimethyl-Formamid zur Peptidsynthese genutzt (Grant 2004, Purdy, Cresswell-Maynard et al. 2004, Karan, Capes et al. 2012).

Verschiedene Halobakterien sind jedoch in den Focus gerückt, da sie unter bestimmten Reaktionsbedingungen (Salinität 15%) Polyhydroxyalkanoat produzieren und in der Zelle akkumulieren (Fernandez, Rodriguez-Valera et al. 1996). Polyhydroxyalkanoate finden große Anwendung in der industriellen Herstellung von biologisch abbaubaren Kunststoffen (Rodriguez-Valera and Lillo 1992). Weiter wird den von halophilen Organismen produzierten retinalen Proteine wie Bacteriorhodopsin (Oren 2009) große Beachtung geschenkt. Membrangebundenes Bacteriorhodopsin kann aufgrund der hohen Stabilität und Lichtempfindlichkeit als optischer Datenspeicher oder Energiespeicher verwendet werden (Hampp and Bräuchle 1990, Hampp 2000).

3.5 Halophile und thermophile Adaption

Um den osmotischen Druck in einer hochsalinen Umgebung standhalten zu können, müssen im Zytoplasma der Zelle isosmotische Bedingungen herrschen (Oren 1999a, Oren 1999b, Oren 2008). Archaeen verfolgen dabei die Strategie Kalium Ionen und Chlorid Ionen im Zytoplasma zu akkumulieren (Madern, Ebel et al. 2000, Kennedy, Ng et al. 2001, Grant 2004). Aufgrund dieser Tatsache müssen sich die Proteine der halophilen Mikroorganismen an diese Bedingungen durch verschiedene Mechanismen adaptiert haben.

Die Tertiärstruktur von extremophilen Enzymen unterscheidet sich durch eine hohe Anzahl an polaren und geladenen Aminosäureresten auf der Oberfläche von der Tertiärstruktur mesophiler

Enzyme (Oren 1999a, Oren 1999b, Madern, Ebel et al. 2000, Mevarech, Frolow et al. 2000, Oren 2008). Durch die Akkumulation hydrophiler Aminosäurereste ist eine Löslichkeit des Enzyms in einer hoch salinen Umgebung durch die Ausbildung einer Hydratschicht mit freien Wassermolekülen oder mit hydratisierten Salzionen möglich (Reed, Lewis et al. 2013). Hingegen befinden sich Aminosäuren mit hydrophoben Rest im Inneren des Enzym, um die Stabilität des Proteins durch hydrophobe Interaktionen nicht zu gefährden (Karan, Capes et al. 2012, Reed, Lewis et al. 2013).

Thermophile Enzyme verfügen über kein spezielles Sequenzmotiv, das sich von mesophilen Homologen unterscheidet und spezifisch für thermophile Eigenschaften ist (Cambillau and Claverie 2000, Radianingtyas and Wright 2003). Vielmehr tragen verschiedene Faktoren zur Thermostabilität der codierenden Sequenzen auf genomischer Ebene sowie auf proteomischer Ebene bei. Zur Stabilisierung der codierenden DNA und mRNA Sequenz bei hohen Temperaturen verfügt ein thermophiles Enzym auf genomischer Ebene einen hohen Gehalt an Guanin und Cytosin (>60%) (Madern, Ebel et al. 2000). Durch die Möglichkeit drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Guanin und Cytosin ausbilden zu können, anstelle von zwei Bindungen zwischen Adenin und Thymin ergibt sich so eine höhere Stabilität (Kumar and Nussinov 2004, Boutz, Cascio et al. 2007). Die thermodynamische Stabilität eines Enzyms ergibt sich aus der Differenz der freien Energie zwischen dem gefalteten und ungefalteten Zustand. Daher ist eine Stabilisierung des gefalteten Zustands durch verschiedene Mechanismen nötig. Thermophile Enzyme verfügen über eine geringere Anzahl an thermisch labilen Aminosäuren wie Asparagin, Glutamin und Methionin. Des Weiteren werden Aminosäuren, die zu sterisch und thermodynamisch ungünstigen Konformationen neigen können, durch die kleinere Aminosäure Glycin substituiert. Die Anzahl an β -verzweigten Aminosäuren wie Valin oder Prolin ist erhöht, da diese Aminosäurereste zu einer Verringerung der Entropie im ungefalteten Zustand führen. Die Sekundärstruktur und Tertiärstruktur des Proteins wird durch eine höhere Anzahl an ausgebildeten Disulfidbindungen und Salzbrücken stabilisiert (Mallick, Boutz et al. 2002, Beeby, O'Connor et al. 2005, Cacciapuoti, Fuccio et al. 2012) (Karshikoff and Ladenstein 2001). Die Sekundärstruktur eines thermophilen Proteins ist reicher an α -Helices. Ein weiteres Merkmal thermophiler Enzyme ist eine kleinere Oberfläche und ein kleineres Volumen durch eine dichter gepackte Konformation (Bell, Russell et al.

2002). Extremophile Enzyme weisen weniger Loops in der Sekundärstruktur auf, um die Flexibilität einzuschränken (Daggett and Levitt 1993, Kumar and Nussinov 2004).

3.6 Expressionssysteme für thermo-halophile Proteine im Vergleich

Escherichia coli ist im Labor und in der Industrie als Expressionsstamm unterschiedlichster prokaryotischer Gene etabliert. Aufgrund der hohen genetischen Stabilität (Blattner, Plunkett III et al. 1997), einer kurzen Generationszeit von etwa 30 min (Doyle and Schoeni 1984, Raghubeer and Matches 1990, Hrenovic and Ivankovic 2009) und der etablierten molekularbiologischen Verfahren stellt dieser mesophile Organismus den bevorzugten Lösungsweg zur Genexpression dar. Jedoch weisen thermo-halophile Proteine durch die Adaption an das natürliche Habitat strukturelle Unterschiede gegenüber mesophilen Proteinen auf (siehe Kapitel 3.5) (Madern, Ebel et al. 2000). Dazu zeigt *E. coli* im Zytoplasma eine sehr geringe Salzkonzentration von maximal 170 mM NaCl (Doyle and Schoeni 1984). Aufgrund eines höheren GC-Anteils verfügen extremophile Mikroorganismen über einen anderen Codongebrauch als die mesophilen Organismen (Goodarzi, Torabi et al. 2008). Somit besteht die Gefahr, dass die Expression der thermo-halophilen Gene aus den Solebecken in *E. coli* zu inaktiven Enzymen führen könnte (Holmes, Scopes et al. 1996, Timpson, Alsafadi et al. 2012). Daher wurde in der Literatur nach alternativen Stämmen gesucht. Entscheidungsgrundlage hierfür war es, einen Stamm zu finden, der aerob in einem einfachen Medium zu hohen Zelldichten kultivierbar ist und die thermo-halophilen Proteine effizient und aktiv exprimieren kann. Für eine extremophile Genexpression sind in der Literatur hauptsächlich *Bacillus subtilis* sowie die beiden Archäen *Halobacterium* sp. NRC-1 und *Haloferax volcanii* genannt.

Im Folgenden werden *Bacillus subtilis* und *Halobacterium* sp. NRC-1 vorgestellt. Eine detaillierte Beschreibung von *Haloferax volcanii* folgt im nächsten Kapitel.

Bacillus subtilis ist ein Gram-positives, Endosporen bildendes Bakterium und ubiquitär verbreitet. Das Genom ist vollständig sequenziert und hat eine Größe von 4,2 Mb mit einem GC Gehalt von 43,5% (Kunst, Ogasaware et al. 1997). Aufgrund der unterschiedlichen natürlichen Habitate in verschiedenen Klimazonen weist das Bakterium eine hohe Toleranz gegenüber Temperatur und pH auf. So ist ein Wachstum zwischen 37 – 50°C möglich. Die Generationszeit beträgt bei 40°C 26 min. Mit *Bacillus subtilis* konnten bereits thermophile α -Amylasen mit einer optimalen Temperatur von 60 – 70°C und halophile Cellulasen heterolog

exprimiert werden (Ito 1997, Jorgensen, Vorgias et al. 1997, Asgher, Asad et al. 2007). Die bisher publizierten Wachstums- und Expressionsbedingungen für *Bacillus subtilis* wurden in *Lysogeny Broth* (LB)-Medium und bei 37°C durchgeführt. Darüber hinaus verfügt *Bacillus subtilis* über keine hohen Salzkonzentrationen im Cytoplasma. Damit bestünde mit *Bacillus subtilis* ebenfalls wie mit *E. coli* die Gefahr, dass die halophilen Gene als Einschlusskörperchen oder inaktiv exprimiert werden würden. Daher könnte die Expression korrekt gefaltete Enzyme aus den Solebecken des Roten Meers in *Bacillus subtilis* eine Herausforderung darstellen. Aus diesem Grund wurde *Bacillus subtilis* nicht als möglicher Expressionsstamm in Betracht gezogen.

Halobacterium sp. NRC-1 ist ein halophiles Archaeon, das komplett sequenziert und charakterisiert ist (DasSarma, Kennedy et al. 2001, DasSarma, Berquist et al. 2006, Coker, DasSarma et al. 2007). Das Genom hat eine Größe von 2,57 Mb mit einem GC Anteil von 68% (Ng, Kennedy et al. 2000). Wachstum ist in einem Temperaturbereich von 10 – 56°C und einem Salzbereich von 2,5 – 5,3 M NaCl möglich, wobei bei einer optimalen Wachstumstemperatur von 42°C und einer optimalen Salzkonzentration von 4,3 M NaCl eine Generationszeit von 3,5 h realisierbar ist (Robinson, Pyzyna et al. 2005). Zur Kompensierung des osmotischen Drucks akkumuliert *Halobacterium* sp. NRC-1 K⁺ und Cl⁻ Ionen im Zytoplasma (Kennedy, Ng et al. 2001). Die Satzkultivierung von *Halobacterium* sp. NRC-1 ist in Rührkesselreaktoren und im Schüttelkolben unter Verwendung eines Komplexmediums gut möglich (Enos 2007, Camacho, Mateos-Diaz et al. 2010). Zur Genexpression wurde von Karan et al. (2013) ein Expressionsvektor (pMC2) generiert (Karan, Capes et al. 2013, Karan, DasSarma et al. 2015). Das Plasmid verfügt unter anderem über eine Ampicillin Resistenz, eine Mevinolin Resistenz, das *Halobacterium* Replikase Gen pGRB und einen Promotor cspD2. Eine Genexpression, kontrolliert durch cspD2, ist durch eine Änderung der Temperatur auf 15°C induzierbar (Coker, DasSarma et al. 2007). Bisher konnte in *Halobacterium* sp. NRC-1 die halophile β -Galaktosidase von *Halorubrum lacusprofundi* erfolgreich exprimiert werden (Karan, Capes et al. 2013). Aufgrund der langen Generationszeit wurde *Halobacterium* sp. NRC-1 für die Fragestellung nicht als geeignetes Expressionssystem erachtet.

3.7 *Haloferax volcanii*

3.7.1 Herkunft und Eigenschaften

Das Archaeon *Haloferax volcanii* wurde 1940 zum ersten Mal von Benjamin Elzars Volcani aus dem Toten Meer isoliert und in seiner Dissertation beschrieben (Mullakhanbhai and Larsen 1975). Dabei handelt es sich um einen halophilen und fakultativ anaeroben Organismus, dessen Temperaturoptimum bei 45°C liegt (Holmes, Kamekura et al. 2008). Aufgrund der halophilen Eigenschaften kann *Haloferax volcanii* bei Salzkonzentrationen zwischen 1,7 – 2,5 M NaCl proliferieren (Mullakhanbhai and Larsen 1975). Die Zellen sind scheibenförmig und weisen eine Größe von 1 – 2 µm auf (siehe Abbildung 3.4).

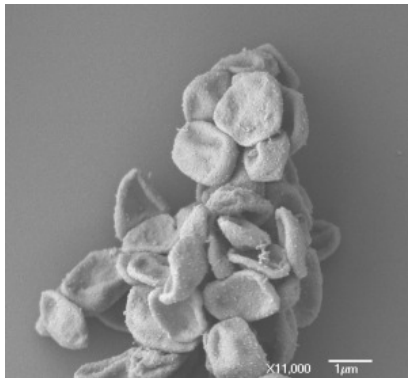


Abbildung 3.4 Zellen von *Haloferax volcanii* (Noar, Lapierre et al. 2012).

Das Genom von *Haloferax volcanii* besteht aus fünf zirkulären Elementen: dem Hauptchromosom mit einer Größe von 2.848 Mb, drei kleineren Chromosomen (pHV4 636 kb, pHV3 438 kb, pHV1 85,1 kb) und einem Plasmid (pHV2 6,5 kb) (Hartman, Norais et al. 2010). *Haloferax volcanii* besitzt ein polyploides Genom, weshalb in der exponentiellen Wachstumsphase bis zu 20 Genomkopien in der Zelle vorliegen. In der stationären Phase liegen 12 Kopien vor (Allers and Ngo 2003, Breuert, Allers et al. 2006, Stroud, Liddell et al. 2012). In den codierenden Regionen konnten insgesamt 4063 Proteine vorhergesagt werden. Des Weiteren weisen die codierenden Regionen einen GC-Gehalt von 65% auf, wobei die nicht codierenden Regionen nur einen GC Gehalt von 58% offenbaren (Hartman, Norais et al. 2010). Die Zellmembran ist aus einer Schicht aus Glycoproteinen aufgebaut, die durch zweiwertige

Kationen (Mg^{2+}) stabilisiert wird (Mullakhanbhai and Larsen 1975). Bei Transformationsprozessen kann durch EDTA ein Teil von Mg^{2+} komplexiert werden, wodurch die Zellmembran durchlässiger wird (Holmes, Kamekura et al. 2008, Allers, Barak et al. 2010). In der Zellmembran werden zudem Carotinoide eingelagert, die die Mikroorganismen rötlich färben. Die ausgebildeten Carotinoide dienen hauptsächlich als Schutz vor zu hoher UV-Strahlung (Oren 2009). Als Schutzmechanismus gegenüber dem osmotischen Druck in salzhaltiger Umgebung lagert *Haloferax volcanii* bis zu 4 M KCl im Cytoplasma ein (Ng, Kennedy et al. 2000, Kennedy, Ng et al. 2001).

3.7.2 Stoffwechselweg in *Haloferax volcanii*

Haloferax volcanii ist fakultativ anaerob, weshalb eine Kultivierung unter anaeroben und aeroben Bedingungen möglich ist. Unter anaeroben Bedingungen kann *Haloferax volcanii* Dimethylsulfoxid (DMSO), Trimethylamin-N-oxid (TMAO) oder Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen (Falb, Muller et al. 2008). Bei einem Wachstum unter aeroben Bedingungen können verschiedene Hexosen (Glukose, Fruktose, Galaktose), Pentosen (Arabinose, Xylulose) sowie Glycerin oder verschiedene organische Säuren wie Laktat, Pyruvat oder Succinat als Kohlenstoffquelle dienen (Kauri, Wallace et al. 1990). Der Abbau der Zucker zur Energiegewinnung in *Haloferax volcanii* erfolgt durch den halbphosphorylierten Entner-Doudoroff-Weg (ED-Weg, siehe Abbildung 3.5) (Falb, Muller et al. 2008, Pickl, Johnsen et al. 2012, Pickl, Johnsen et al. 2014). Glukose wird über Glukonat zu 2-Dehydro-3-Dexoyglukonat (KDG) abgebaut, anschließend durch die KDG-Kinase (Hvo-0549) zu 2-Dehydro-3-Deoxy-6-Phosphoglukonat phosphoryliert und in die beiden Produkte Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat gespalten. Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) wird in mehreren Schritten mit den Enzymen GAP-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12, Hvo_0481), Phosphoglyceratmutase (EC 5.4.2.12, Hvo_0189), Enolase (EC 4.2.1.11, Hvo_2774) und Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40, Hvo_0806) zu Pyruvat abgebaut. Neben 2 mol Pyruvat entsteht aus 1 mol Glukose im Entner-Doudoroff-Weg noch 1 mol ATP und 2 mol NAD(P)H. Ein vollständiger Abbau des Pyruvats erfolgt durch die Umwandlung zu Acetyl-CoA mit Hilfe von Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (EC 1.2.71, Hvo_1304), das im anschließenden Tricarbonsäurezyklus zu CO_2 und H_2O abgebaut wird (Falb, Muller et al. 2008).

Wird Laktat als Kohlenstoffquelle im Medium verwendet, wird durch die Oxidation mit Hilfe des Enzyms Laktat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27, Hvo_0214) Pyruvat gebildet, das wie oben beschrieben, im Tricarbonsäurezyklus metabolisiert werden kann (Falb, Muller et al. 2008). Aufgrund des schnellen Metabolismus von Laktat und Pyruvat eignen sich beide Säuren als Kohlenstoffquellen in Kultivierungsmedien (Holmes, Kamekura et al. 2008).

Glycerin wird in salinen Gewässern durch die halophile Alge *Dunaliella* zum eigenen Schutz gegen den osmotischen Druck hergestellt. Durch die Lyse der Alge ist Glycerin in salinen Gewässern in höheren Konzentrationen vorhanden und dient als Substrat für halophile Archäen (Falb, Muller et al. 2008). Damit zählt Glycerin zu den natürlichen Substraten von *Haloferax volcanii* (Oren 2008). In *Haloferax volcanii* wird Glycerin durch eine Glycerin Kinase (EC 2.7.1.30, Hvo_1541) zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat umgebaut und mit Hilfe der Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (EC 1.1.99.5) zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert (Sherwood, Cano et al. 2009).

Zum Aufbau von Kohlenstoff-Verbindungen aus C2 Körpern verfügt *Haloferax volcanii* über den Glyoxylat-Bypass mit den beiden Enzymen Isocitrat Lyase (EC 4.1.3.1, Hvo_1984) und Malat Synthase (EC 4.1.3.2). Aus zwei Molekülen Acetyl-CoA kann Succinat und NADH gewonnen werden. Bei der Verwendung von Acetat als Substrat wird Acetat in *Haloferax volcanii* mit Hilfe der Acetyl-CoA-Synthetase zu Acetyl-CoA umgebaut und mit Hilfe Glyoxylat-Bypass metabolisiert (Bräsen and Schönheit 2001).

Wird Glukose oder Laktat als Substrat verwendet kann Acetat während der exponentiellen Wachstumsphase als Nebenprodukt eines Überschussmetabolismus in *Haloferax volcanii* aus Acetyl-CoA gebildet werden (Bräsen and Schönheit 2001, Zaigler, Schuster et al. 2003, Soppa 2011). Zur Regenerierung von Coenzym A und NAD⁺ kann in der stationären Phase eine Metabolisierung des Acetats beobachtet werden (Bräsen and Schönheit 2001, Wolfe 2005).

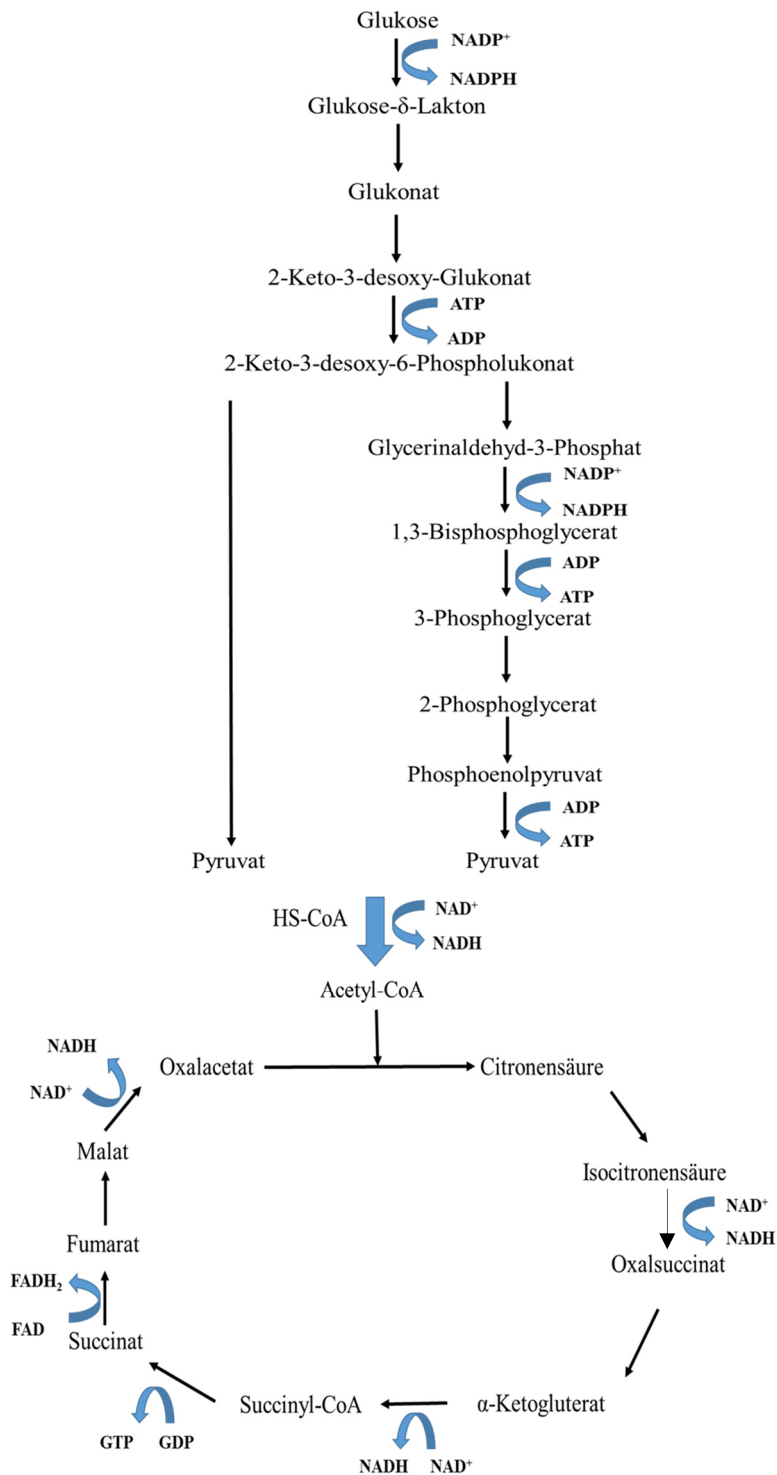


Abbildung 3.5: Stoffwechselweg halophiler Archaeen. Halbphosphorilierender Entner-Doudoroff-Weg mit einer Nettoausbeute von zwei Molekülen NADPH und einem Molekül ATP. Anschließende Metabolisierung des Pyruvats im Tricarbonsäurezyklus.

3.7.3 Genetische Modifikationen

Zur Herstellung des verbesserten Expressionsstamms *Haloferax volcanii* H1424 ($\Delta pyrE2$, $\Delta hdrB$, *Nph-pitA*, Δmrr , *cdc48d-Ct*) wurden verschiedene genetische Modifikationen im Wildtyp Stamm durchgeführt (Allers and Ngo 2003, Allers, Ngo et al. 2004, Allers 2010). Durch die Deletion des Gens *mrr* wird fremde DNA die an 5'-GATC methyliert ist, nicht mehr durch die Endonuklease Mrr verdaut (Allers 2010, Allers, Barak et al. 2010). Damit kann eine Transformation von *Haloferax volcanii* mit einem heterologen Plasmid direkt erfolgen ohne eine vorhergehende Transformation eines nicht-methylierenden (dam^-/dcm^-) *E. coli* Stammes. Die Transformationseffizienz konnte so auf $>10^7$ transformierte Zellen pro 1 μ g DNA gesteigert werden (Allers 2010).

Die Selektion rekombinanter Zellen nach der Transformation wurde durch die Deletion zweier Gene *pyrE2* und *hdrB* ermöglicht. Das Gen *pyrE2* kodiert eine Reaktion im Uracil Biosyntheseweg. Somit ist eine Eigensynthese von Uracil im Organismus nicht mehr möglich (Bitan-Banin, Ortenberg et al. 2003). Aufgrund der Deletion des Gens *hdrB* aus dem Thymidin Biosyntheseweg, ist *Haloferax volcanii* H1424 auxotroph für Thymidin.

Haloferax volcanii verfügt über ein Protein (PitA), das einen Histidin-reichen Linker aufweist. Die Aufreinigung von heterolog exprimierten, mit einem His-Anhang versehenen Proteinen würde so durch PitA kontaminiert werden. Durch den Austausch dieses Proteins durch ein Histidin armes Homolog aus dem alkaliphilen Stamm *Natronomonas pharaonis* kann die Ausbeute und die Reinheit heterolog exprimierter Enzyme bei durchgeführten Affinitätschromatographien erhöht werden (Allers 2010, Allers, Barak et al. 2010).

Das Plasmid pTA963 zur heterologen Genexpression verfügt über 8340 bp und wurde aus pTA230 abgeleitet (siehe Anhang Abbildung 12.1). Der Replikationsursprung wurde aus dem Vektor pHV2 übernommen, wodurch etwa sechs Kopien des Plasmids pTA963 in der Zelle vorliegen (Allers, Ngo et al. 2004). Da pTA963 über die beiden Gene (Selektionsmarker) *pyrE2* und *hdrB* verfügt, wird es als korrespondierendes Plasmid zu den gentechnisch veränderten *Haloferax volcanii* $\Delta pyrE2$ und $\Delta hdrB$ Stämmen bezeichnet. Darüber hinaus verfügt pTA963 über eine Ampicillin Resistenz. Zur Expression heterologer Gene wird der Tryptophanase Promotor *p.tna* benützt. Eine Genexpression kann ab einer Zugabe von >1 mM L-Tryptophan beobachtet werden (Large, Stamme et al. 2007). Am 3' Ende des Promotors wurde ein His-Tag

(CAC)₆ und ein Polylinker mit den Schnittstellen PciI, EcoRI, BamHI und NotI, zur Integration von Gensequenzen, eingefügt. Die Expressionskassette wird durch zwei Terminatoren (t.L11e und t.Syn) flankiert (Allers 2010, Allers, Barak et al. 2010).

3.7.4 Biofilmbildung von *Haloferax volcanii*

Haloferax volcanii besitzt an der Zelloberfläche Flagellen, Bindosomen und Pili ähnliche Strukturen. Flagellen sind hierbei hauptsächlich für Motilität verantwortlich (Albers and Pohlschröder 2009, Ghosh and Albers 2011, Pohlschröder, Ghosh et al. 2011). Bindosomen als weitere Zelloberflächenstruktur, umfassen zuckerbindende Proteine, die in die S-layer eingelagert sind. Des Weiteren exprimiert *Haloferax volcanii* sechs Gene, die Pili ähnliche Strukturen codieren. Sie sind für Zellinteraktion und Oberflächenadhäsion verantwortlich (Tripepi, Esquivel et al. 2013, Esquivel and Pohlschröder 2014). Der Aufbau der Pili weist hierbei Homologien zum Aufbau der bakteriellen Typ IV Pili Strukturen auf, obwohl Pili von Archäen durch eine ATPase angetrieben werden und bakterielle Typ IV Pili anhand eines Ionengradienten (Albers, Szabo et al. 2003, Albers and Pohlschröder 2009). In Abbildung 3.6 ist der Aufbau dieser verschiedenen Zelloberflächenstrukturen auf der Zelloberfläche von Archaeen dargestellt. Die Flagellen, Pili und Bindosomen werden als Präproteine mit einem Signalpeptid exprimiert und durch die Zytoplasmamembran geschleust. Die Prepilin Peptidase PibD ist für die posttranslationale Modifikation dieser Präproteine verantwortlich und trennt die hydrophobe Signalsequenz an. Die ATPase stellt die für den Einbau der Oberflächenproteine benötigte Energie zur Verfügung. Die Verankerung der Pili, Flagellen und Bindosomen erfolgte am Membranprotein (Albers, Szabo et al. 2003, Bardy, Eichler et al. 2003, Bardy, Ng et al. 2004). Die ATPasen und Membranproteinen, die zum Aufbau der verschiedenen Oberflächenstrukturen benötigt werden, werden für die jeweiligen Oberflächenstrukturen durch unterschiedliche Gensequenzen kodiert. Die ATPase und das Membranprotein, die zum Einbau der Biofilmbildenden Pili benötigt werden, werden durch die Gensequenzen Hvo_1033 (PilB3) und Hvo_1034 (PilC3) codiert (Tripepi, Imam et al. 2010, Tripepi, Esquivel et al. 2013). Esquivel et al. (2013) konnten zeigen, dass durch die Deletion der beiden Gene eine Verankerung der Pili auf der Zelloberfläche nicht mehr möglich ist. Die Prozessierung der Flagellen ist durch diese Gendeletion nicht betroffen, wodurch bei gleich bleibendem Schwimmverhalten von *Haloferax volcanii* keine Oberflächenadhäsion mehr beobachtet werden konnte (Tripepi, Esquivel et al. 2013, Esquivel and Pohlschröder 2014).

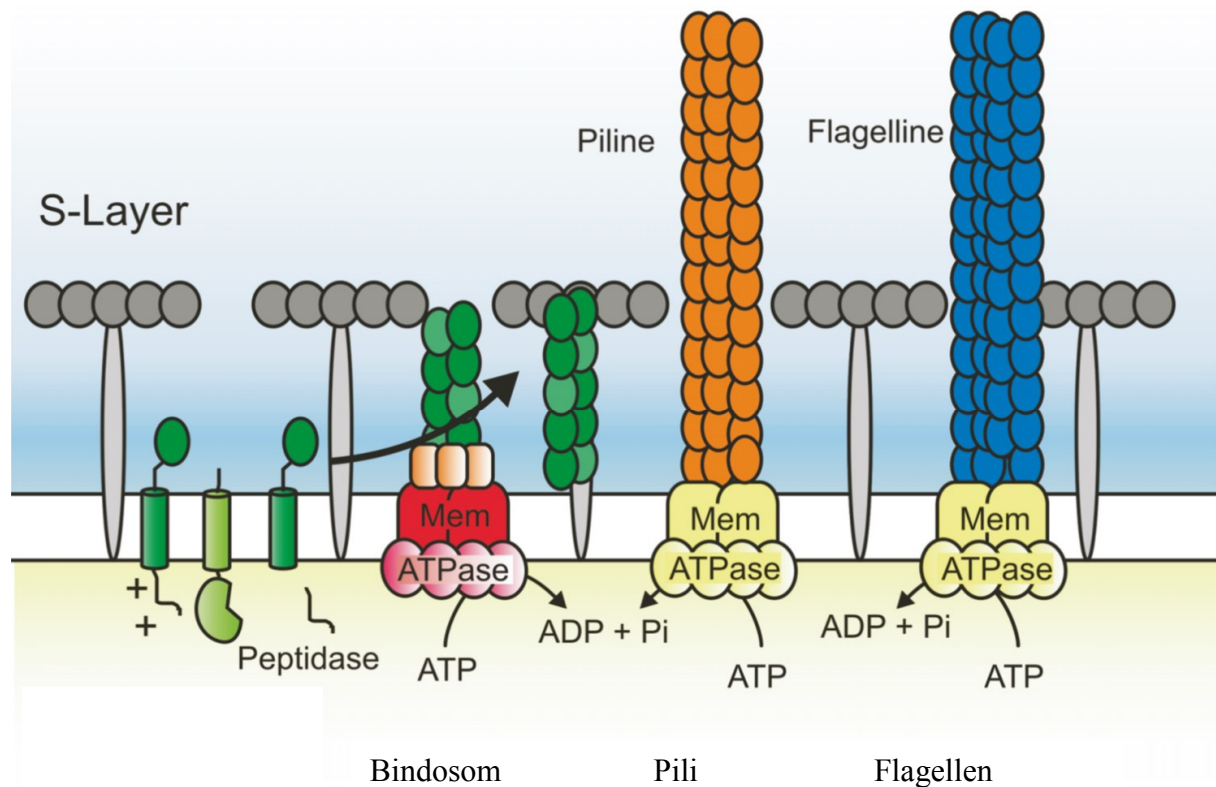


Abbildung 3.6: Aufbau der Zelloberflächenstrukturen von Archaeen nach Albers (2011). Prozessierung der Präproteine durch die Peptidase. Anschließend Verankerung der Bindosome, Pili und Flagellen mit Hilfe einer ATPase und eines Membranproteins in der S-layer der Archaeen (Albers and Pohlschröder 2009)

3.7.5 Quorum Sensing

Als *Quorum Sensing* wird bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien die zellinterne Regulation der Genexpression und weiterer physiologischer Aktivitäten als Antwort auf Schwankungen in der Zellpopulation bezeichnet (Miller and Bassler 2001, Greenberg 2003). Hierfür sekretieren die Bakterien Autoinduktoren ins Medium, die als Verständigungsmittel zur Ausbildung von Biofilmen oder Antibiotika Sekretion dienen (Miller and Bassler 2001, Waters and Bassler 2005). Mit steigender Zelldichte steigt auch die Konzentration des Autoinduktors im Medium, wodurch eine bestimmte Schwellenkonzentration überschritten wird (siehe Abbildung 3.7). Die Autoinduktoren diffundieren in die Zellen und können durch die Bildung von Promotor-Autoinduktor-Komplexen die regulative Mechanismen in der Zelle beeinflussen (Miller and Bassler 2001, Koh, Sam et al. 2013). Autoinduktoren, die von Gram-negativen

Bakterien ins Medium sekretiert werden können, sind Home-Serin-Laktone. Gram-positive Bakterien hingegen, scheiden Oligopeptide ins Medium aus (March and Bentley 2004, Waters and Bassler 2005).

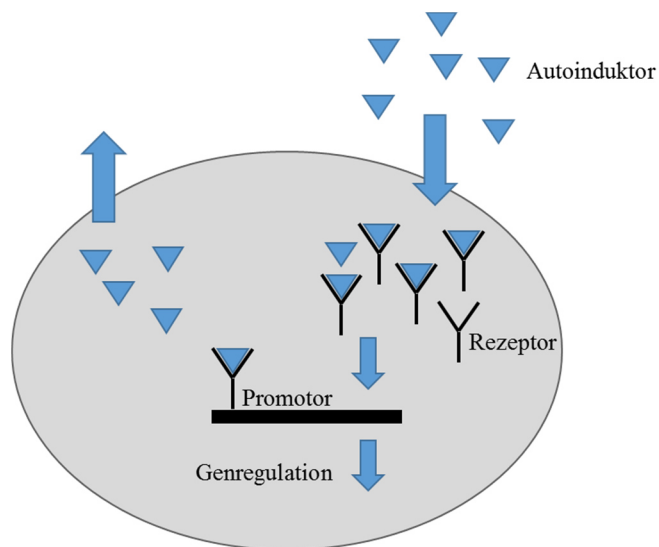


Abbildung 3.7: Mechanismus zur Genregulation nach *Quorum Sensing*: Intrazellulär werden Autoinduktor Moleküle gebildet, die aus der Zelle diffundieren und ab einer bestimmten Schwellenkonzentration in die anderen Zellen gelangen und mit dem passenden Rezeptor einen Komplex bilden können. Die Autoinduktor-Rezeptor-Komplexe können durch die Bindung an spezifische Promotoren die Genexpression regulieren. Bild nach (Koh, Sam et al. 2013).

In verschiedenen Archaeen konnte bereits *Quorum Sensing* nachgewiesen werden (Maupin-Furlow, Gil et al. 2005, Gimenez, Cerletti et al. 2015). So sekretiert *Natronococcus occultus* ab einer optischen Dichte (OD_{600}) von 2 Homo-Serin-Laktone ins Medium (Paggi, Martone et al. 2003) und exprimiert extrazelluläre Proteasen ins Medium. Für *Haloferax volcanii* wurde bisher *Quorum Sensing* nicht untersucht. Jedoch gibt es Hinweise, dass *Haloferax volcanii* ebenfalls diesen Mechanismus zur Zellkommunikation nützen könnte. *Haloferax volcanii* bildet Biofilm aus (Pohlschröder, Ghosh et al. 2011, Frols, Dyll-Smith et al. 2012, Orell, Frols et al. 2013) und kann durch die Ausbildung zytoplasmatischer Brücken auf einem festen Untergrund proliferieren (Soppa 2006, Soppa 2011). Für diese koordinierten Prozesse ist eine spezifische Zell-Zell Kommunikation nötig (Soppa 2006). Jedoch wurden bisher keine detaillierten Untersuchungen zur Detektion von Homo-Serin-Laktone oder anderen sekretierten Autoinduktoren durchgeführt.

3.8 Biokatalytische Prozesse

3.8.1 Kultivierung von Mikroorganismen im idealen Rührkesselreaktor

Zur Berechnung der Prozesse im Bioreaktor werden verschiedene Vereinfachungen getroffen:

i) die Durchmischung wird als optimal angenommen, ii) die darin enthaltenen Zellen werden als eine Komponente betrachtet und iii) es gibt keine Subpopulationen. Damit sind die berechneten Zelleigenschaften Mittelwerte, die auf das komplette System übertragen werden können (Chmiel, 2011). Eine wichtige Prozessgröße zur Beschreibung einer Kultivierung ist die Wachstumsrate (r_x). Unter nicht-limitierenden Bedingungen ist sie proportional zur Zellkonzentration c_x und ist in Gleichung 3-1 definiert:

$$r_x = \frac{dc_x}{dt} = \mu \cdot c_x \quad \text{Gleichung 3-1}$$

mit: r_x : Wachstumsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
 c_x : Biotrockenmassekonzentration, g L^{-1}
 t : Prozesszeit, h
 μ : spezifische Wachstumsrate, h^{-1}

Die spezifische Wachstumsrate kann wie folgt definiert werden:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt}$$

Die Annahme eines nicht-limitierenden Wachstums ist häufig jedoch unzulässig. In der Praxis ist es üblich, dass die Menge einer Komponente im Kultivierungsmedium (meistens die Kohlenstoffquelle) limitierend vorgegeben wird (limitierendes Substrat). Unter Annahme eines limitierenden Substrates c_s lässt sich ein formaler Zusammenhang zwischen der zellspezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ und der Konzentration des limitierenden Substrats als Sättigungsfunktion darstellen (Monod 1949):

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{c_s + K_s} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

mit μ_{\max} : maximale spezifische Wachstumsrate, h^{-1}

c_s : limitierende Substratkonzentration, g L^{-1}

K_s : Sättigungskonstante des limitierenden Substrats, g L^{-1}

Die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} kann daher theoretisch nur durch sehr hohe Substratkonzentrationen erreicht werden. Die Sättigungskonstante K_s gibt hier die Substratkonzentration an, die benötigt wird, um 50% der maximalen Wachstumsrate zu erreichen.

Analog zur Wachstumsrate werden die Substrataufnahmerate (r_s) und die Produktbildungsrate (r_p) formuliert.

$$r_s = \frac{dc_s}{dt} = q_s \cdot c_x \quad \text{Gleichung 3-3}$$

$$r_p = \frac{dc_p}{dt} = q_p \cdot c_x \quad \text{Gleichung 3-4}$$

mit: r_s : volumetrische Substrataufnahmerate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

r_p : volumetrische Produktbildungsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

q_s : spezifische Substrataufnahmerate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

q_p : spezifische Produktbildungsrate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

c_p : Produktkonzentration, g L^{-1}

Aus der differentiellen Substratkonzentration (dc_s) bei differentieller Änderung der gebildeten Biomassekonzentration (dc_x) ergibt sich nach Gleichung 3-5 der Biomasseertragskoeffizient $Y_{x/s}$.

$$Y_{x/s} = \frac{dc_x}{dc_s} = \frac{r_x}{r_s} = \frac{\mu}{q_s} \quad \text{Gleichung 3-5}$$

mit $Y_{x/s}$: Biomasseertragskoeffizient, g g^{-1}

Aus der differentiellen gebildeten Produktkonzentration bei differentieller Abnahme der Substratkonzentration kann die Produktselektivität $Y_{p/s}$ berechnet werden (Gleichung 3-6).

$$Y_{P/S} = \frac{dc_P}{dc_S} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{q_P}{q_S} \quad \text{Gleichung 3-6}$$

Aus der Wachstumsrate und dem Biomassertrag kann daher auch die Substrataufnahmerate berechnet werden. Dies ist jedoch nur zulässig, wenn das Substrat ausschließlich für Wachstum genutzt wird. Wird der Erhaltungsstoffwechsel und die Produktbildung miteinbezogen muss Gleichung 3-7 erweitert werden (Gleichung 3-8).

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} \quad \text{Gleichung 3-7}$$

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m_s + q_{s,p} \quad \text{Gleichung 3-8}$$

mit: m_s : Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel, $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$

$q_{s,p}$: Substrataufnahme zur Produktbildung, $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$

Unter Einbeziehung des Erhaltungsstoffwechsels wird das zur Verfügung gestellte Substrat nicht komplett in Biomasse umgewandelt. Ein Teil des Substrates wird zum Beispiel für die Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten, die Reparatur geschädigter DNA oder falsch gefalteten Proteinen benötigt. Damit steht das zugegebene Substrat nicht nur für das Zellwachstum zur Verfügung. Somit wird unter Einbeziehung des Erhaltungsstoffwechsels die zur Berechnung der spezifischen Wachstumsrate Gleichung 3-2 angepasst (Gleichung 3-9).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} - m_S \cdot Y_{X/S,\mu} \quad \text{Gleichung 3-9}$$

3.8.2 Bilanzierung eines idealen Rührkesselreaktors im Satzverfahren

Nach Chmiel (2011) wird ein Bioreaktor als „ein abgegrenzter Raum bzw. Apparat [...]“ beschrieben, „in dem in Anwesenheit und unter Mitwirkung eines Biokatalysators eine Stoffumwandlung stattfindet“. In Abbildung 3.7 ist ein Rührkesselreaktor mit Scheibenblattrührer abgebildet, der zu den wichtigsten Produktionsreaktoren in der Biotechnologie zählt. In einem idealen Rührkesselreaktor herrschen isotrope Bedingungen, das heißt alle enthaltenen Komponenten sind homogen verteilt, damit gibt es keine lokalen Konzentrationsgradienten. Darüber hinaus findet die Stoffumwandlung im idealen

Rührkesselreaktor unter isothermen ($T=\text{konst.}$) und isobaren ($p=\text{konst.}$) Bedingungen statt (siehe Abbildung 3.8). Gleichung 3-10 gibt die allgemeine Stoffbilanz eines idealen Rührkesselreaktors an:

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = F_{\text{ein}} \cdot c_{i,\text{ein}} - F_{\text{aus}} \cdot c_{i,\text{aus}} + r_i \cdot V_R \quad \text{Gleichung 3-10}$$

- mit V_R : Reaktionsvolumen, L
 $F_{\text{ein}}, F_{\text{aus}}$: Zulauf- und Ablaufstrom, L h^{-1}
 $c_i, c_{i,\text{ein}}, c_{i,\text{aus}}$: Konzentration der Komponente i im Reaktor, sowie im Zulauf- und Ablaufstrom, g L^{-1}
 r_i : Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i , $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

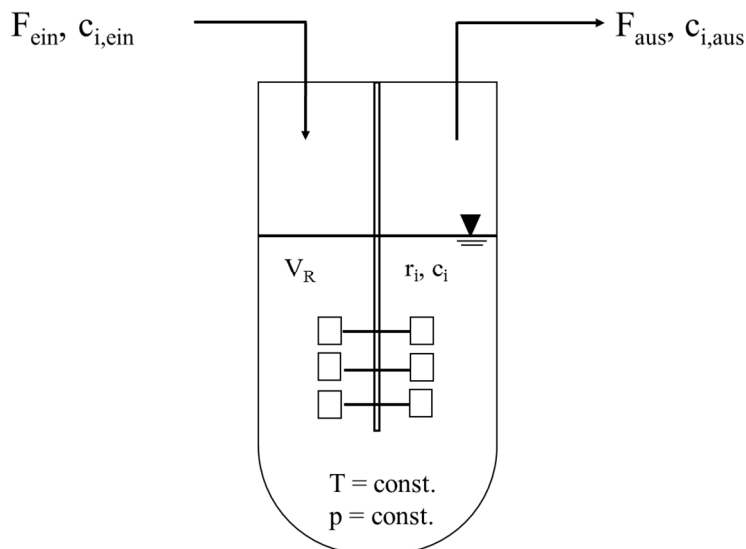


Abbildung 3.8: Rührkesselreaktor mit 6-Blatt Scheibenrührer im kontinuierlichen Betrieb mit dem Reaktionsvolumen V_R , den Stoffkonzentrationen c_i und den jeweiligen Reaktionsraten r_i bei isothermen, isobaren und isotropen Bedingungen.

Gleichung 3-10 beschreibt für den kontinuierlichen Betrieb einen idealen Rührkesselreaktor. Wird der Reaktor im Satzverfahren betrieben, werden von außen keine Zulaufströme in den Reaktor oder Ablaufströme aus dem Reaktor geführt. Die Zufuhr von Säure oder Base zur pH-Regelung wird in der Praxis aufgrund der geringen Mengen vernachlässigt. Mit den getroffenen Annahmen kann das Reaktionsvolumen V_R in Gleichung 3-10 als konstant betrachtet werden.

Des Weiteren sind die Zulauf- und Ablaufströme $F_{i,\text{ein}}$ und $F_{i,\text{aus}}$ Null. Daraus ergibt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit folgender vereinfachter Zusammenhang für ein Satzverfahren im idealen Rührkesselreaktor (siehe Gleichung 3-11 und 3-12):

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad \text{Gleichung 3-11}$$

Unter Einbeziehung der Gleichung 3-1 und Gleichung 3-2 kann aus der spezifischen Wachstumsrate die Zellkonzentration c_x berechnet werden. In der Praxis wird ein Satzverfahren mit einer hohen Anfangskonzentration an Substraten gestartet, sodass für eine bestimmte Zeit kein Substrat limitierend ist. Somit kann die maximale spezifische Wachstumsrate erreicht werden, weshalb Gleichung 3-1 integriert werden kann. Es ergibt sich:

$$c_x = c_{x0} \cdot e^{\mu_{\text{max}} \cdot t} \quad \text{Gleichung 3-12}$$

mit c_{x0} : Biomassekonzentration zum Zeitpunkt $t=0$, g L^{-1}

In Abbildung 3.9 ist der charakteristische Wachstumsverlauf von Mikroorganismen im Satzverfahren dargestellt. Nach der Inokulation ist in der Verzögerungsphase kein Biomassewachstum erkennbar, da sich die Mikroorganismen zuerst an die neuen Bedingungen (Substrat, Temperatur oder pH) adaptieren müssen. Je nach Organismus, Alter der Zellen oder Zellanzahl kann die Verzögerungsphase unterschiedliche Zeit in Anspruch nehmen. In der folgenden Phase, der Übergangsphase, ist eine Zunahme der Zellzahl messbar. Die Wachstumsrate nimmt zu bis sie in der exponentiellen Wachstumsphase maximal ist. Die Zellen wachsen mit μ_{max} , weshalb Gleichung 3-12 angewandt werden kann, um die Biomassekonzentration zu berechnen. Das Ende der Wachstumsphase entsteht durch die Verringerung der Wachstumsrate und ist bei pH kontrollierten Prozessen in der Regel auf Substratlimitierung zurückzuführen. Dieser Zusammenhang wird in der Monod-Kinetik (Gleichung 3-2) beschrieben. Neben der Kohlenstoffquelle kann eine Limitierung durch Sauerstoff, Phosphat, Stickstoff oder andere Substrate erfolgen. Es kann aber auch eine Hemmung durch Nebenprodukte zum Ende der exponentiellen Wachstumsrate führen. In der stationären Phase ist effektiv keine Änderung der Biomassekonzentration messbar. In der Absterbephase ist eine Abnahme der Biomasse zu beobachten, da die Lyse der Zellen größer ist als das Zellwachstum.

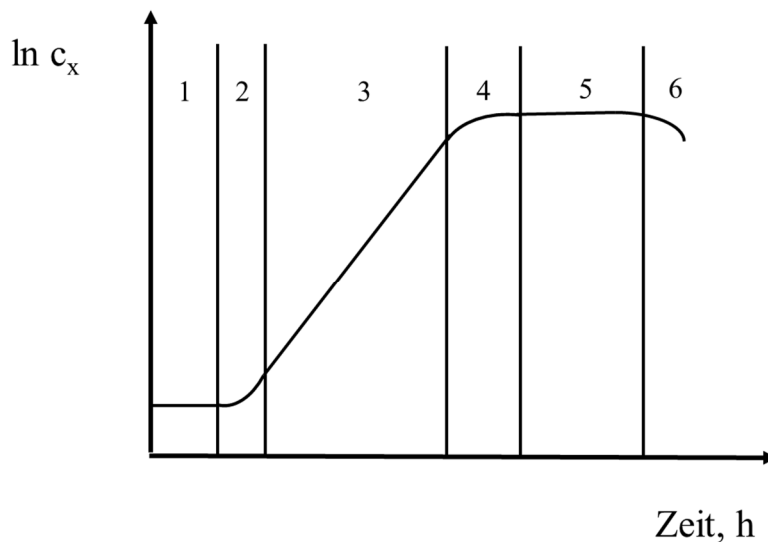


Abbildung 3.9: Typischer Wachstumsverlauf von Mikroorganismen im Satzverfahren. 1 Verzögerungsphase, 2: Übergangsphase, 3: Exponentielles Wachstum, 4: Übergangsphase, 5: stationäre Phase, 6: Absterbephase. Nach Monod (1949)

3.8.3 Konstanter Medienaustausch mit Zellrückhaltung

Im Satzverfahren ist eine Kontrolle und Regelung der Temperatur, des pH und des gelösten Sauerstoffs pO_2 möglich, jedoch ist eine Änderung der Medienzusammensetzung während des Satzverfahrens nicht möglich. Einerseits werden wichtige Ressourcen aus dem Medium verbraucht, andererseits sekretieren die Zellen Nebenprodukte oder Metabolite ins Medium, die sich negativ auf das Wachstum auswirken können. Um dieses Problem zu umgehen, gibt es verschiedene Herangehensweisen. Während eines halbkontinuierlichen Betriebs kann frisches, konzentriertes Medium in den Rührkesselreaktor gepumpt werden. Darüber hinaus ist es hier möglich die Wachstumsrate anhand eines exponentiellen Zulaufprofils zu kontrollieren. Aufgrund der geringen zudosierten Substratmenge im Rührkesselreaktor tritt der Effekt der Nebenproduktbildung (hier Acetat) bei ausreichender Sauerstoffsättigung (Überschussmetabolismus) nicht auf. In einem kontinuierlichen Verfahren wird frisches Medium in den Rührkesselreaktor zugeführt und zugleich wird das gleiche Volumen an Zellsuspension aus dem Reaktor ausgetragen. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass Zellen mit aus dem Reaktor ausgetragen werden, die für eine Genexpression oder andere Produktbildungen nicht mehr zur Verfügung stehen können.

Eine Weiterentwicklung des kontinuierlichen Betriebs bietet der kontinuierliche Medienaustausch mit Zellrückhaltung (Membranreaktor). Die Zellsuspension wird kontinuierlich aus dem Reaktor durch eine Filterkartusche gepumpt, deren Porengröße kleiner als die Zellen ist. Dadurch kann altes Medium mit einer bestimmten Flussrate als Permeat abgeführt werden und aufkonzentrierte Zellsuspension als Retentat wieder in den Reaktor zurückgeführt werden. Um das Volumen im Reaktor konstant zu halten, wird aus einem Vorlagebehälter mit der gleichen Flussrate frisches Medium in den Reaktor gepumpt (siehe Abbildung 3.10). Der Membranreaktor mit totaler Zellrückhaltung weist die Vorteile einer kontinuierlichen Betriebsweise auf und verbindet sie mit der Möglichkeit keine Biomasse zu verlieren (Woodside, Bowen et al. 1998, Voisard, Meuwly et al. 2003). Trotzdem ist eine totale Zellrückhaltung im Dauerbetrieb nicht möglich, da die Zellkonzentration gegen unendlich gehen würde. Durch das stetige Wachstum der Zellen im Membranreaktor ist die Substratkonzentration im zugeführten Medium nicht mehr ausreichend, um die Biomassebildung und den Erhaltungstoffwechsel zu bedienen. Durch diese Substratlimitierung wird das Wachstum der Zellen begrenzt. Darüber hinaus kann bei hoher Zellkonzentration die Ausscheidung von Nebenprodukt ins Medium höher sein, als die Auswaschung durch den Medienaustausch. Die Folge ist eine Akkumulation von Nebenprodukten, die sich inhibierend auf das Wachstum auswirken können. Eine wichtige Prozessgröße ist die mittlere hydraulische Verweilzeit τ (Gleichung 3-13). Sie ist durch den Quotient aus Reaktorvolumen und Zulaufstrom definiert. Die Verweilzeitsummenfunktion gibt den Anteil der Volumenelemente, die den Reaktor zur Zeit t nach der Zugabe zur Zeit $t=0$ wieder verlassen haben.

$$F(\varphi) = 1 - e^{-\varphi}$$

Gleichung 3-13

$$\text{mit } \varphi = \frac{t}{\tau} \text{ und } \tau = \frac{V_R}{\dot{V}}$$

$F(\varphi)$: Verweilzeitsummenfunktion

\dot{V} : Zulaufstrom des frischen Mediums und Ablaufstrom des Permeats, $L \text{ h}^{-1}$

V_R : Reaktorvolumen, L

τ : hydraulische Verweilzeit, h

Eine besonders effiziente Filtrationsmethode, die sich für einen kontinuierlichen Medien austausch mit Zellrückhaltung eignet ist die Querstromfiltration. Die zu filtrierende Suspension wird tangential zum Filtermodul geführt. Durch eine entsprechend hohe Querstromgeschwindigkeit kann sich eine turbulente Strömung ausbilden, die der Ausbildung einer Deckschicht auf der Membran entgegenwirkt. Unter einer Deckschicht versteht man die Ausbildung eines Filterkuchens durch die Ablagerung von Molekülen oder Zellen, die zu einem zusätzlichen Strömungswiderstand führen (Voisard, Meuwly et al. 2003). Je stärker die Bildung eines Filterkuchens ist, desto ineffizienter wird die Filtration. Neben der Querstromgeschwindigkeit ist der Transmembrandruck Δp (siehe Gleichung 3-14) eine wichtige Prozessgröße. Er entsteht durch den Druckverlust über die Membranfläche und beschreibt den Druck, der aufgebracht werden muss, um die Suspension durch die Filtermembran zu drücken. Mit zunehmender Filterkuchenbildung, ist ein Anstieg des Drucks zu verzeichnen. Als weitere wichtige Prozessgröße gilt die benötigte Filtermembranfläche. Sie ist abhängig vom Reaktorvolumen und der gewünschten Filtrationszeit. Je größer das Reaktionsvolumen und die Zellkonzentration, desto größer sollte die Membranfläche sein, um den Filtrationsprozess zeitlich effizient zu halten. Zur Erhöhung der Membranfläche werden in der Querstromfiltration sogenannte Hohlfaser Module verwendet. In einer Filterkartusche befinden sich mehrere Hohlfasermembranen mit einer bestimmten Porengröße, die von der zu filtrierenden Suspension umspült werden.

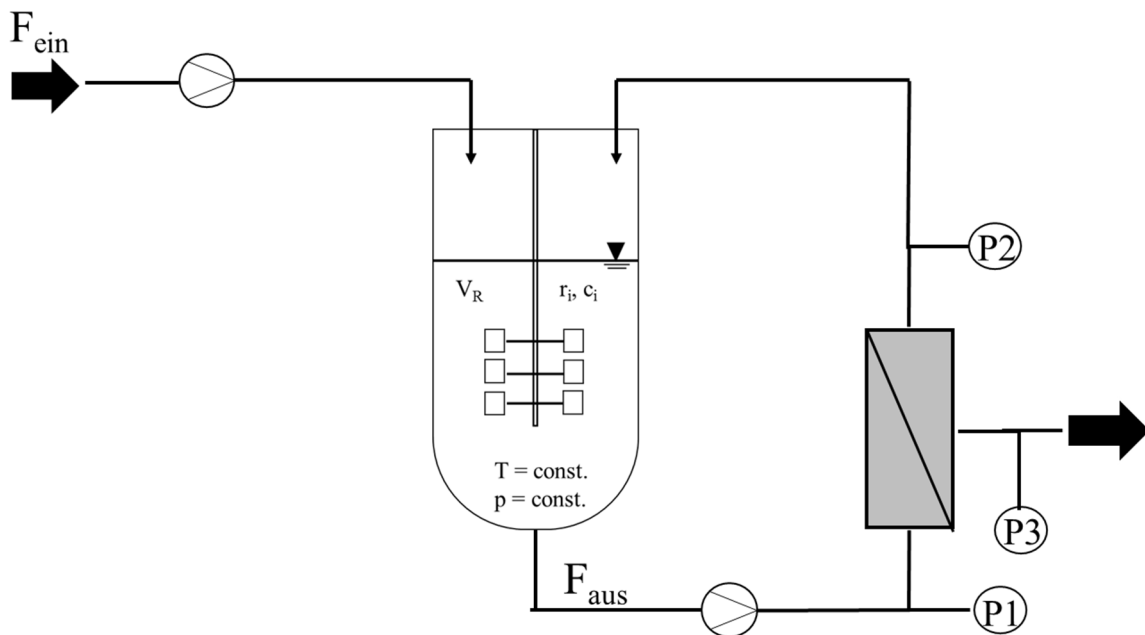


Abbildung 3.10: Membranreaktor: Aufbau zum kontinuierlichen Medien austausch mit Zellrückhaltung durch ein Hohlfasermodul. Mit den Manometern P1 und P2 kann der Druck vor und nach der Filterkartusche bestimmt werden.

Zur Abschätzung des mittleren Transmembrandrucks (Δp) wird Gleichung 3-14 verwendet:

$$\Delta p = \frac{p_1 + p_2}{2} - p_3$$

Gleichung 3-14

- mit Δp : Transmembrandruck, bar
 p_1 : statischer Druck der Flüssigkeit vor der Filterkartusche, bar
 p_2 : Druck des Retentats, bar
 p_3 : Druck des Permeats, bar

3.8.4 Enzymcharakterisierung

Die Charakterisierung von Enzymen umfasst die Bestimmung der Enzymaktivität unter Verwendung verschiedener Substrate sowie die Ermittlung der Enzymstabilität bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.

Das einfachste Modell zur Beschreibung einer 1 Substrat – 1 Produkt Enzymkinetik mit Hilfe eines Enzyms wurde von Michaelis und Menten (1913) entwickelt (Michaelis and Menten 1913). Abbildung 3.11 zeigt das Schema des Modells.

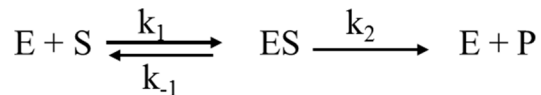


Abbildung 3.11: Schema einer irreversiblen 1-Substrat-1-Produkt Enzymreaktion unter Bildung eines Enzym-Substrat-Komplex (ES).

- mit
- k_1 : Geschwindigkeitskonstante zur Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ES
 - k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante zur Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplex
 - k_2 : Geschwindigkeitskonstante zur Dissoziation des Produkts P vom Enzym E

Zur Verwendung der Michaelis-Menten Kinetik müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- Ein Enzym und ein Substrat bilden einen Enzym-Substrat-Komplex
- Es wird die Bildung eines Fließgleichgewicht angenommen ($\frac{d(ES)}{dt} = 0$)
- Die Bildung des Produkts aus dem Enzym-Substrat-Komplex ist irreversibel
- Die Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Gesamtreaktion

Damit kann die Michaelis-Menten Gleichung (siehe Gleichung 3-15) formuliert werden:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Gleichung 3-15}$$

- mit
- v : Reaktionsgeschwindigkeit, mol s⁻¹
 - v_{\max} : maximale Reaktionsgeschwindigkeit, mol s⁻¹
 - $[S]$: Substratkonzentration, mol L⁻¹
 - K_M : Michaelis-Menten-Konstante, mol L⁻¹

In Abbildung 3.12 ist der Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit zur Substratkonzentration dargestellt. Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) ist die benötigte Substratkonzentration, um $\frac{1}{2} v_{\max}$ zu erreichen. Damit ist die Michaelis-Menten Konstante ein Maß für die Affinität des Substrats zum Enzym. Je kleiner die Konstante, desto höher ist die Affinität.

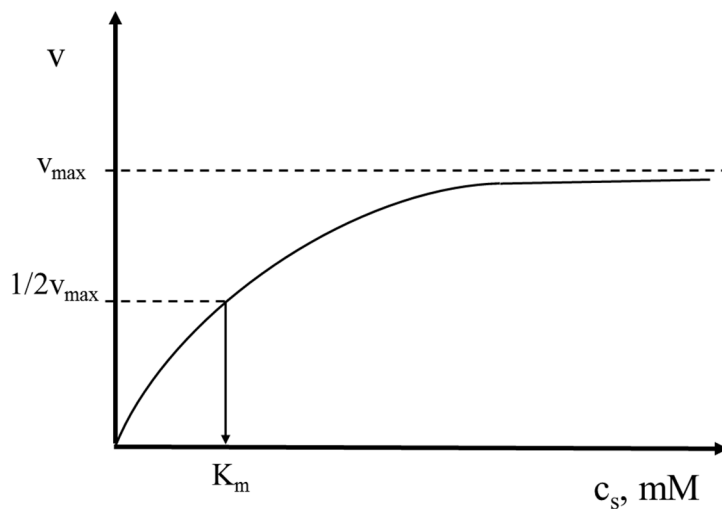


Abbildung 3.12: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (v) von der Substratkonzentration (c_s) nach Michaelis-Menten. K_m wird als Michaelis-Menten-Konstante bezeichnet und stellt die Substratkonzentration dar bei der $\frac{1}{2} v_{\max}$ erreicht werden kann.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{Gleichung 3-16}$$

Zur Berechnung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) in Gleichung 3-17 wird die Annahme getroffen, dass das gesamte Enzym (Anfangskonzentration $[E_0]$) als Enzym-Substrat-Komplex vorliegt. Damit wird v_{\max} durch das Produkt aus der Geschwindigkeitskonstante k_2 und der eingesetzten Enzymkonzentration $[E_0]$ berechnet. Die Geschwindigkeitskonstante des geschwindigkeitslimitierenden Schritts k_2 wird in folgender Gleichung als k_{cat} bezeichnet.

$$v_{\max} = k_2 \cdot [E]_0 = k_{\text{cat}} \cdot [E]_0 \quad \text{Gleichung 3-17}$$

mit k_{kat} : Wechselzahl, s^{-1}

$[E]_0$: Enzymkonzentration, $t=0$, mol L^{-1}

Die Charakterisierung biokatalytischer Satzprozesse kann durch die Berechnung des Umsatzes (X), der Ausbeute (Y) und der Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) erfolgen. Der Umsatz ermittelt das Verhältnis aus verbrauchtem Substrat zu eingesetztem Substrat (siehe Gleichung 3-18), wohingegen die Ausbeute das gebildete Produkt zur eingesetzten Substratmenge in Relation setzt (siehe Gleichung 3-19). Wird nur ein Substrat eingesetzt woraus nur ein Produkt entsteht, sind Umsatz und Ausbeute gleich. Die Produktivität eines Satzprozesses kann durch die Berechnung der Raum-Zeit-Ausbeute ermittelt werden (siehe Gleichung 3-20).

$$X(t) = \frac{n_{s,0} - n_t}{n_{s,0}} \cdot 100\% \quad \text{Gleichung 3-18}$$

mit X(t): Umsatz, %
n_{s,0}: Substratmenge, t=0, mol
n_s: Substratmenge t=t, mol

$$Y(t) = \frac{n_P - n_{P,0}}{n_{S,0}} \quad \text{Gleichung 3-19}$$

mit Y(t): Ausbeute, %
n_{P,0}: gebildete Produktmenge, t=0, mol
n_P: Produktmenge, t=t, mol

$$RZA = \frac{n_P}{V_R \cdot t} \quad \text{Gleichung 3-20}$$

mit RZA: Raum-Zeit-Ausbeute, mol L⁻¹ h⁻¹

3.8.5 Cofaktor-Regenerierung

Cofaktoren sind Moleküle, die essentiell für die Funktion von Enzymen ist. Dabei unterscheidet man die Enzym-gebundenen Cofaktoren (prothetische Gruppe) wie Biotin, Häme oder Flavin

und die Coenzyme/Cosubstrate, die nicht kovalent an das Enzym gebunden sind. (Zhao and van der Donk 2003). Diese müssen in stöchiometrischer Menge zum Reaktionsansatz hinzugegeben werden (Wichmann and Vasic-Racki 2005). Zu den Vertretern der Coenzyme gehören die beiden Moleküle Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) beziehungsweise Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH). Die Abkürzung NADH und NADPH bezeichnen die reduzierte Form der Moleküle. Zur Beschreibung der oxidierten Form wird NAD^+ und NADP^+ verwendet. Beide Coenzyme transportieren formal ein Hydridion (2 Elektronen, 1 Proton) bei Oxidationen und Reduktionen. Eine industriell wichtige Enzymklasse, die NAD(P)H abhängig sind, sind Oxidoreduktasen (EC 1.-) stellen eine für die Industrie wichtigste Enzymklasse dar (Fu, Hoelsch et al. 2012, Fu 2013). Aufgrund der hohen Kosten der Cofaktoren (siehe Tabelle 3.2) ist für eine ökonomische Prozessführung ein verlässliches und effizientes System zur prozessintegrierten Cofaktorregenerierung wichtig (Wichmann and Vasic-Racki 2005).

Bei der Entwicklung eines Cofaktor-Regenerierungssystems ist dabei folgendes zu beachten: i) beide Schritte müssen thermodynamische und kinetisch begünstigt ablaufen, ii) die Substrate und Produkte des Regenerationsschrittes sollen gut über die Zellmembran diffundieren können, dürfen jedoch keinen negativen Einfluss auf die eigentliche Enzym-katalysierte Reaktion haben, iii) die Wechselzahl (Molanzahl des gebildeten Produkts aus der Molanzahl des zugefügten Cofaktors) des Cofaktors muss hoch sein (in der Regel $10^3 - 10^5$) (Zhao and van der Donk 2003) und iv) bei einem Ganzzell-Biokatalyse Ansatz soll die Diffusion der Cofaktoren über die Zellmembran nicht möglich sein (Chen 2007)

Tabelle 3.2: Kosten der Cofaktoren (Wichmann and Vasic-Racki 2005)

Cofaktor	Kosten, € mol ⁻¹
NAD^+	2.655
NADH	8.868
NADP^+	11.417
NADPH	167.846

Bei den meisten Systemen zur Cofaktor-Regenerierung wird, wie in Abbildung 3.13 schematisch dargestellt, ein zweites Enzym verwendet (Lui and Wang 2007). Dieses katalysiert aus einem zugegebenen Co-Substrat ein Nebenprodukt unter Regeneration des für die Hauptreaktion verwendeten Cofaktors.

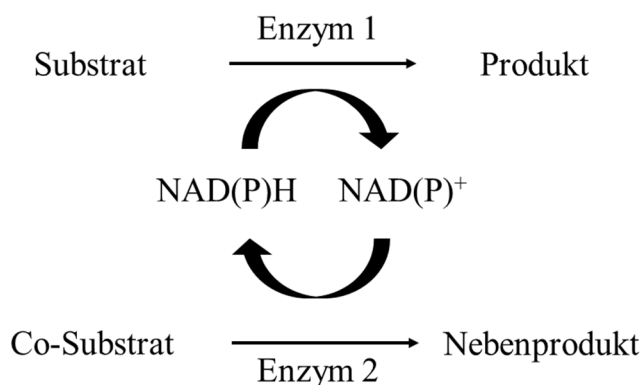


Abbildung 3.13: Schema zur Darstellung eines Cofaktor-Regenerierungssystems mit zwei Enzyme

Verschiedene Enzymsysteme wurden zur Cofaktor-Regenerierung entwickelt. Hauptsächlich findet Formiatdehydrogenasen und Glukosedehydrogenasen als Co-Enzym Verwendung (Woodyer, Johannes et al. 2006). Die Formiatdehydrogenase (FDH) katalysiert aus Formiat Kohlenstoffdioxid unter Bildung von NAD(P)H (siehe Abbildung 3.14). Ein besonderer Vorteil ist, dass die Reaktion durch die Entweichung des gasförmigen Produkts irreversibel wird und somit das Reaktionsgleichgewicht vollständig auf der Seite des Produkts liegt (Wichmann and Vasic-Racki 2005). Einen weiteren Vorteil bietet das kostengünstige Co-Substrat Formiat (Tishkov and Popov 2006).

Als alternatives System werden Glukosedehydrogenasen (GDH) verwendet. Das Enzym katalysiert die Oxidation von Glucose über Gluconolakton zu Gluconsäure (siehe Abbildung 3.14). Dabei wird NAD(P)⁺ zu NAD(P)H reduziert (Hilt, Pfeleiderer et al. 1991).

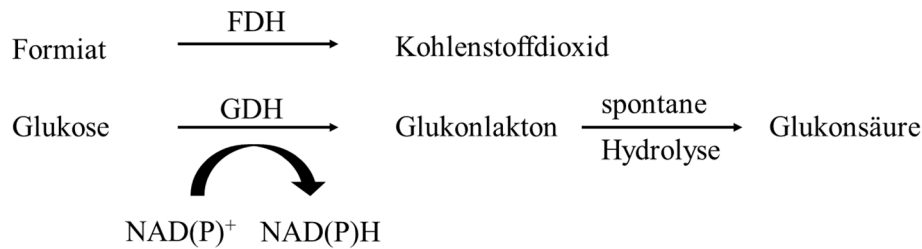


Abbildung 3.14: Katalysierte Reaktionen durch die beiden Enzyme Formiatdehydrogenase (FDH) und Glukosedehydrogenase (GDH) mit den jeweiligen Substrate und Produkte.

Die Cofaktor-Regenerierung kann mit aufgereinigten Enzymen oder in einem Ganzzell Ansatz durchgeführt werden (Tishkov and Popov 2006, Kratzer, Pukl et al. 2011). Am Prinzip des Regenerationssystems ändert sich nichts, jedoch müssen die Substrate beim Ganzzell Ansatz zuerst die Zellmembran passieren. Der Transport über die Membran kann hier den limitierenden Schritt darstellen (Chen 2007). Eine schnelle Diffusion ist bei kleinen, unpolaren Molekülen wie O_2 oder CO_2 zu beobachten. Kleine, polare, ungeladene Moleküle können ebenfalls durch die Zellmembran diffundieren. Eine Diffusion von großen ungeladenen Molekülen wie Glucose oder Ameisensäure durch die Zellmembran ist ebenfalls möglich. Für den Transport geladener Moleküle gibt es verschiedene Transportsysteme. Membranproteine können bestimmte Moleküle mit einer definierten Größe oder Ladung in die Zelle transportieren. Darüber hinaus existieren Transporter-Proteine, die das Molekül binden und unter einer Konformationsänderung in die Zelle befördern können. Wird für diesen Prozesse keine Energie verbraucht, wird von einem passiven Prozess gesprochen. Bei einem aktiven Prozess hingegen, wird Energie verbraucht (Alberts 2005). In Prokaryonten, im Besonderen auch bei *Haloferax volcanii*, ist der Transport von Glucose und Formiat über die Zellmembran aktiv und durch einen Na^+ Gradienten angetrieben (Henderson 1990, Tawara and Kamo 1991, Reizer, Reizer et al. 1993).

4 Material und Methoden

4.1 Puffer, Medien und Lösungen

Kultivierungsmedien für *Escherichia coli*

E. coli wurde in einem Satzverfahren in Schüttelkolben unter Verwendung des Komplexmediums *Lysogeny Broth* (LB) (Bertani 1951) kultiviert. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Bestandteile wurden eingewogen, in VE-H₂O gelöst und mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Das Medium wurde anschließend bei 121°C für 20 min autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung des *Lysogeny Broth* (LB) Mediums

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
NaCl	5,0
Hefeextrakt	5,0
Pepton	10,0

Für die Herstellung von LB-Agar Platten wurden 15 g L⁻¹ Agar zusammen mit den Komponenten aus Tabelle 4.1 eingewogen. Nach dem Sterilisieren wurde das Medium auf 60 – 70°C gekühlt, bevor die benötigten Antibiotika hinzugegeben werden konnten. Der flüssige Agar wurde aseptisch in Petrischale gegossen (Schichtdicke ~ 1 cm) und nach dem Austrocknen bei 4°C gelagert.

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden das SOB Medium (siehe Tabelle 4.2) sowie der CCMB80 Puffer benötigt (siehe Tabelle 4.3). Die Komponenten wurden eingewogen, in VE-H₂O gelöst und bei 121°C für 20 min autoklaviert.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung des SOB Mediums

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
Hefeextrakt	5,0
Trypton	20,0
NaCl	0,6
KCl	0,2
MgCl ₂ *6H ₂ O	2,0
MgSO ₄ *7H ₂ O	2,5

Tabelle 4.3: Zusammensetzung des CCMB80 Puffers

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
CaCl ₂ *2H ₂ O	11,4
MnCl ₂ *4H ₂ O	4,0
MgCl ₂ *6H ₂ O	2,0
KOAc	1,0
Glycerin	10% (v/v)

Kultivierungsmedien für *Haloferax volcanii*

Haloferax volcanii wurde im Satzverfahren mit dem Komplexmedium Hv-YPC kultiviert (Allers, Ngo et al. 2004, Holmes, Kamekura et al. 2008). Die Zusammensetzung ist in Tabelle 4.4 angegeben. Die Bestandteile wurden einzeln eingewogen und in VE-H₂O gelöst. 85 mM MgSO₄, 6 mM CaCl₂ und 12,5 mM Tris, pH 7,4 wurden aus je 1 M Stammlösungen (siehe Anhang Tabelle 12.3) erst nach dem Autoklavieren (121°C, 20 min) aseptisch zum Komplexmedium gegeben.

Tabelle 4.4: Bestandteile des Komplexmediums Hv-YPC

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
NaCl	144,0
MgCl ₂ *6H ₂ O	18,0
KCl	4,2
Hefeextrakt	5,0
Pepton	1,0
Casaminosäure	1,0
1 M Tris, pH 7,5	12,5 mL
1 M CaCl ₂	6 mL
1 M MgSO ₄ *7H ₂ O	85 mL

Die Zusammensetzung des Hv-Ca Mediums mit 15 g L^{-1} Agar ist in Tabelle 4.5 dargestellt. Die aufgeführten Komponenten NaCl, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KCl, Casaminsäure und Agar werden eingewogen und in 0,9 L VE- H_2O gelöst. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. 12,5 mL 1 M Tris, pH 7,5, 6 mL 1 M CaCl_2 und 85 mL 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ wurden steril nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von $60 - 70^\circ\text{C}$ dem Agar hinzugegeben. Die Zusätze Uracil ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) oder 5-Fluoroorotic Säure ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) wurden als Stammlösungen bei 4°C gelagert und wenn nötig, ebenfalls aseptisch nach dem Autoklavieren des Hv-Ca-Agars hinzugegeben. Anschließend wurde der noch flüssige Agar steril in Petrischalen mit einer Schichtdicke von 1 – 2 cm gegossen. Die Agarplatten wurden unter der Sterilbank getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert.

Tabelle 4.5: Zusammensetzung des Hv-Ca Agars.

Komponente	Konzentration, g L^{-1}
NaCl	144,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	18,0
KCl	4,2
Casaminsäure	3,0
Agar	15,0
1 M Tris, pH 7,5	12,5 mL
1 M CaCl_2	6 mL
1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	85 mL

Das definierte Medium Hv-Min (siehe Tabelle 4.6) (Allers, Ngo et al. 2004, Holmes, Kamekura et al. 2008) wurde für das Satzverfahren von *Haloferax volcanii* H1424 und H1895 im Schüttelkolben und im Rührkesselreaktor genutzt. Die Komponenten NaCl, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und KCl wurden nach Tabelle 4.6 eingewogen und in VE- H_2O gelöst. Anschließend wurde die Salzlösung autoklaviert. Danach wurden die weiteren Bestandteile nach Tabelle 4.6 steril in das Medium gegeben. Zur Herstellung der Kohlenstoffquelle (siehe Tabelle 4.7) wurden die Komponenten in VE- H_2O gelöst und mit 5 M NaOH auf einen pH von 7,5 justiert. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert ($0,2 \mu\text{m}$). Die Lösung wurde bei 4°C gelagert und nach Tabelle 4.7 aseptisch zum Medium Hv-Min gegeben. Die Spurenelementlösung wurde nach Tabelle 4.8 hergestellt. Um die Komponenten in Lösung zu bringen, wurde die Lösung durch die Zugabe von 1 M HCl angesäuert. Die Spurenelementlösung wurde steril

filtriert (0,2 μm) und bei 4°C gelagert. Die Stammlösung für 1 g L⁻¹ Thiamin und 1 g L⁻¹ Biotin wurden hergestellt, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Tabelle 4.6: Zusammensetzung des Minimalmediums Hv-Min

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
NaCl	144,0
MgCl ₂ *6H ₂ O	18,0
KCl	4,2
1 M MgSO ₄ *7H ₂ O	85 mL
1 M CaCl ₂	3,0 mL
1 M Tris, pH 7,5	42,0 mL
1 M NH ₄ Cl	5,0 mL
1 M K ₂ HPO ₄	2,0 mL
Kohlenstoff-Quelle	25,5 mL
Spurenelementlösung	1,0 mL
1 g L ⁻¹ Biotin	0,1 mL
1 g L ⁻¹ Thiamin	0,8 mL

Tabelle 4.7: Zusammensetzung der Kohlenstoffquelle für das definierte Medium Hv-Min

Komponente	Menge für 1 L
60% D/L Laktat	166,8 mL
Succinat, Na ₂ Salz	150 g
80% Glycerin	12,6 mL

Tabelle 4.8: Spurenelementlösung für die definierten Medien Hv-Min und CDM

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
MnCl ₂ *4H ₂ O	0,36
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,44
FeSO ₄ *7H ₂ O	2,3
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,05

Neben dem definierten Medium Hv-Min wurde das Minimalmedium CDM nach Kauri, et al., 1990 verwendet (Kauri, Wallace et al. 1990). Die Zusammensetzung ist in Tabelle 4.9 angegeben. NaCl, MgCl₂*6H₂O und K₂SO₄ wurden eingewogen, in 0,9 L VE-H₂O gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden die weiteren Komponenten hinzugegeben. Die Spurenelementlösung wurde nach Tabelle 4.8 gefertigt, steril filtriert und aseptisch zum

Medium hinzugegeben. Als Kohlenstoffquelle wurde zum Medium 0,5% (w/v) Glukose, 0,5% (v/v) Laktat, 0,1% Acetat (w/v) oder 0,5% (w/v) Succinat steril hinzugegeben. Glukose, Acetat und Succinat wurden als 1 M Stammlösungen hergestellt, autoklaviert (20 min, 121°C) und entsprechend der angegebenen Menge aseptisch zum Medium gegeben. Laktat war als 60%ige Lösung erhältlich. Die entsprechende Menge der DL-Laktat Lösung wurde autoklaviert und steril zum Medium hinzugegeben. Das Medium wurde aseptisch mit sterilem VE-H₂O auf 1 L aufgefüllt.

Tabelle 4.9: Zusammensetzung des definierten Mediums CDM

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
NaCl	125,0
MgCl ₂ *6H ₂ O	50,0
K ₂ SO ₄	5,0
1 M CaCl ₂	2 mL
1 M NH ₄ Cl	5 mL
1 M K ₂ HPO ₄	2 mL
Spurenelementlösung	1 mL
1 g L ⁻¹ Biotin	0,1 mL
1 g L ⁻¹ Thiamin	0,8 mL

Für die Induktionslösung wurden 27 mM L-Tryptophan in 18% (w/v) Salzwasser gelöst und steril filtriert. Das Salzwasser (s. Tabelle 4.10) wurde als 30%ige Stammlösung vorbereitet und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 4.10: Zusammensetzung der 30%igen Salzwasserlösung

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
NaCl	240,0
MgCl ₂ *6H ₂ O	30,0
MgSO ₄ *7H ₂ O	35,0
KCl	7,0
CaCl ₂	0,5

4.2 Mikroorganismen und gentechnische Arbeiten

4.2.1 *Haloferax volcanii* Stämme und Vektoren

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Haloferax volcanii* Stämme, sowie die Vektoren pTA963, pTA941_bgaH und pTA1228, aufgelistet in Tabelle 4.11 und Tabelle 4.13, wurden von Thorsten Allers, Institute of Genetics, School of Biology, University of Nottingham zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pRE5 wurde von Mechthild Pohlschröder, University of Pennsylvania, Department of Biology zur Verfügung gestellt. Die Gensequenzen der halophilen Alkohol Dehydrogenasen ADH/D1 und ADH/A1 sowie die der halophilen Dihydrodipicolinat Reduktasen DR/D1 und DR/A1 wurden an der Kind Abdullah University of Science and Technology in das Plasmid pTA963 integriert und zur Verfügung gestellt (Grotzinger, Alam et al. 2014). Der *dam⁻/dcm⁻* *E. coli* Stamm SCS110 wurde von Stratagene, La Jolla USA erhalten. *E. coli* DH5 α war am Lehrstuhl vorhanden. Für die Expression der halophilen Gene in *E. coli* wurde der für G/C reiche Sequenzen Codon optimierte *E. coli* Stamm CodonPlus(DE3)-RIPL verwendet (Stratagene, La Jolla USA). Die Stämme und Plasmide sind in Tabelle 4.11 bis 4.13 dargestellt.

Tabelle 4.11: In dieser Arbeit verwendete *Haloferax volcanii* Stämme mit ihrem Genotyp

Stamm	Abstammung	Charakterisierung
<i>Haloferax volcanii</i> H1424	DS2 (Wildtyp)	Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>hdrB</i> , <i>Nph-pitA</i> , Δ <i>mrr</i> , <i>cdc48d-Ct</i>
<i>Haloferax volcanii</i> H1895	DS2 (Wildtyp)	Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>hdrB</i> , <i>Nph-pitA</i> , Δ <i>mrr</i> , <i>cdc48d-Ct</i> , Δ <i>pilBC</i>
<i>Haloferax volcanii</i> H1830	DS2 (Wildtyp)	Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>trp</i> , Δ <i>pibD</i>

Tabelle 4.12: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme und ihr Genotyp

Stamm	Abstammung	Charakterisierung
<i>E. coli</i> SDS110	JM110	<i>rpsL (Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]</i>
<i>E. coli</i> CodonPlus (DE3)-RIPL	BL21-Gold	<i>F^r ompT gal dcm hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Camr] [argU ileY leuW Strep/Specr]</i>
<i>E. coli</i> DH5α		<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>

Tabelle 4.13: In dieser Arbeit verwendete Plasmide mit den codierenden Gensequenzen zur heterologen Genexpression.

Plasmid	Heterologes Protein	Resistenz
pTA963		Ampicillin
pTA963_ADH/D1	Alkohol Dehydrogenase ADH/D1	Ampicillin
pTA963_ADH/A1	Alkohol Dehydrogenase ADH/A1	Ampicillin
pTA963_DR/A1	Dihydrodipicolinat Reduktase aus Discovery Deep	Ampicillin
pTA963_DR/D1	Dihydrodipicolinat Reduktase aus Atlantis Deep	Ampicillin
pTA1228_bgaH	β-Gaktosidase BGAH	Ampicillin
pTA941_bgaH	β-Gaktosidase BGAH	Ampicillin
pET-3a-ADH/D1	Alkohol Dehydrogenase ADH/D1	Ampicillin/Tetramycin
pET-3a-ADH/A1	Alkohol Dehydrogenase ADH/A1	Ampicillin/Tetramycin
pRE5	Aus pTA131, enthält Gensequenz pyrE2 sowie 700 bp vor Hvo_1033 und 700 bp nach Hvo_1034	Ampicillin

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

Chemisch kompetente Zellen SCS110 und DH5α

5 mL steriles LB-Medium (siehe Tabelle 4.1) wurden mit Stammkulturen von *E. coli* SCS110 bzw. DH5α inokuliert und über Nacht bei 37°C und 200 U min⁻¹ inkubiert. Am Folgetag wurden 100 mL steriles SOB Medium (s. Tabelle 4.2) in einem sterilen 500 mL Schüttelkolben mit 1 mL der Vorkultur inokuliert. Die Kultur wurde bei 37°C und 200 U min⁻¹ bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis gelagert, bevor das Pellet bei 1600xg für 7 min bei 4°C abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 40 mL sterilem CCMB80 Puffer (siehe Tabelle 4.3)

resuspendiert und für 30 min in auf Eis gelagert. Das Pellet wurde bei 1600xg und 4°C für 7 min abzentrifugiert und in 4 mL CCMB80 Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis, wurden Aliquots mit 150 µL Zellsuspension in sterile 1,5 mL Eppendorf Reagenzgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Aliquots bei -80°C gelagert. Alle Arbeiten wurden steril ausgeführt.

Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparationen wurden mit dem GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit mit einer 10 mL Übernachtskultur nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Für die Elution des gebundenen Plasmids auf der Säule wurde der zur Verfügung gestellte Puffer verwendet, welcher auf 50°C angewärmt wurde.

Restriktionsverdau und Ligation

10 U der benötigten Restriktionsenzyme wurden verwendet um ein gereinigtes Plasmid oder Genfragment bei 37°C über Nacht zu verdauen. Der benötigte Puffer wurde anhand der Herstellerangaben eingesetzt. Die Ansatzgröße betrug bei einem analytischen Verdau 20 µL und bei einem präparativen Verdau 50 µL. Die verdauten Fragmente wurden mit GenElute™ PCR Clean-Up Kit aufgereinigt und für die Ligation verwendet. Die Ligation wurde anhand der Herstellerangaben mit 20 U T4 DNA Ligase durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert.

Polymerasenkettenreaktion

Zur Vervielfältigung von Genfragmenten wurde die drei-Schritt Polymerasenkettenreaktion (PCR) mit 1 U Phusion® High-Fidelity als Polymerase verwendet. Der PCR Ansatz (20 bzw. 50 µL) enthielt 0,5 µM Primer, 0,2 µM Desoxyribonuklidtriphosphate (dNTPs), 3% (v/v) DMSO, 2 µL Template und den Phusion® High-Fidelity Reaktionspuffer für GC reiche Sequenzen. Die PCR wurde anhand der Herstellerangaben durchgeführt. Die Annealingtemperatur der Primer, sowie die Elongationszeit ergab sich aus den verwendeten Oligonukleotiden (siehe Tabelle 4.14).

Tabelle 4.14: Primer zur Untersuchung der Gendeletion Hvo_1033 und Hvo_1034 in *Haloferax volcanii* H1424.

Primer	Oligonukleotidsequenz	Schmelz- temperatur	Annealing- temperatur
Fwd10331034	AAGCTAGGATCCCGTCCTGCTGCCCA	80°C	72°C
Rev10331034	GAACCTTCTAGACGAACTCGTCGGGCGCG	80°C	

Agarosegelelektrophorese

Durch das verwendete 1% (w/v) Agarosegel mit 10 μ L Roti®-Safe GelStain konnten DNA-Fragmente im Bereich von 0,3 – 10 kbp aufgetrennt werden. Die entsprechende Menge Agarose wurde eingewogen, mit 1x TAE Puffer versetzt und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung der Agarose erhitzt. Anschließend wurde 10 μ L Roti®-Safe GelStain hinzugegeben und das Gel gegossen. Die Auftrennung erfolgte unter Verwendung des Puffers 1x TAE und 120 V. Für die Aufreinigung von aufgetrennten DNA-Fragmente im Gel wurde das Kit GenElute™ PCR Clean-Up verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Die Elution der DNA-Fragmente wurde mit dem zur Verfügung gestellten Puffer durchgeführt, der auf 50°C aufgewärmt wurde.

Transformation

Die Aliquots der chemisch kompetenten *E. coli* Zellen, welche bei -80°C gelagert wurden, wurden auf Eis aufgetaut. Nachdem die Zellen mit 2 μ L der gereinigten Plasmidlösung versetzt wurden, wurden sie 30 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 40 Sekunden. Die Zellen wurden anschließend für 10 min auf Eis gelagert, bevor sie mit 800 μ L sterilem LB-Medium versetzt wurden und bei 37°C für 60 min und 300 U min⁻¹ inkubiert wurden. Davon wurden 200 μ L steril auf LB-Agar-Platten, welche mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt waren, ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne ausgewählte Klone wurden zur Herstellung einer Stammkultur verwendet.

Die Transformation von *Haloferax volcanii* wurde nach dem Protokoll von Thorsten Allers durchgeführt (Holmes, Kamekura et al. 2008). Hierfür wurden 500 μ L einer Zellsuspension, die bei -80°C gelagert wurden, zur Inokulation von 10 mL Hv-YPC Medium verwendet. Nach einer Inkubationsperiode von 72 h bei 45°C und 170 U min⁻¹ wurde die Zellkultur zur Inokulation von 50 mL frisch autoklaviertem Hv-YPC Medium verwendet. Die Inkubation

erfolgte für 16 h über Nacht bei 45°C und 170 U min⁻¹. Am Folgetag erfolgte die Transformation der Zellen nach Holmes et al., (2008). Transformierte Zellen wurden auf Hv-YPC Platten ausgestrichen und für fünf Tage bei 45°C inkubiert. Einzelne, auf den Hv-YPC Platten, gewachsenen *Haloferax volcanii* Kolonien wurden zur Herstellung von Stammkulturen verwendet.

Stammhaltung

Für die Herstellung der *E. coli* Stammkultur wurden einzelne Klone nach einer erfolgreichen Transformation oder 100 µL einer früheren Stammkultur in 20 mL steriles LB-Medium überimpft und für 16 h bei 37°C und 200 U min⁻¹ inkubiert. Die Kultur wurde mit einer 80%igen (v/v) Glycerinlösung gemischt, sodass die resultierende Mischung 25% Glycerin enthält. Davon wurden je 2 mL aseptisch in sterilen Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C eingefroren und gelagert.

Zur Herstellung der Stammkulturen für von *Haloferax volcanii* wurden 20 mL steriles Hv-YPC Medium mit einer Kolonie nach einer Transformation oder mit 100 µL einer früheren Stammkultur angeimpft und für 72 h bei 45°C und 170 U min⁻¹ inkubiert. Mit einer 80%igen (v/v) Glycerinlösung wurde eine Mischung hergestellt, die 25% (v/v) Glycerin enthält. Daraus wurden 2 mL Aliquots in sterilen Kryoröhrchen erstellt, die anschließend bei -80°C eingefroren und gelagert wurden.

Klonierung von pTA1228_bgaH

Das Gen bgaH wurde im Plasmid pTA941 zur Verfügung gestellt. *E. coli* DH5α wurde mit dem Plasmid transformiert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden einige ausgewählt und in 10 mL steriles LB-Medium mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin überimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 200 U min⁻¹ inkubiert, sodass am Folgetag eine Plasmidpräparation durchgeführt werden konnte. Das bgaH Genfragment konnte durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen NotI und NdeI aus pTA941 isoliert werden. Da der Zielvektor pTA1228 ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen verdaut wurde, konnte anschließend das Genfragment bgaH in den Zielvektor pTA1228 ligiert werden. Zur Vermehrung des Plasmids wurde *E. coli* DH5α mit pTA1228_bgaH transformiert, bevor *Haloferax volcanii* H1895 mit dem aufgereinigten Plasmid pTA1228_bgaH transformiert werden konnte. Eine Sequenzierung des Gens bgaH in

pTA1228, durchgeführt von MWG Eurofines, bestätigte die korrekte Ligation (Forward Primer 5'-GTTCTGAACCGCCCTTTCCC-3', reverse primer 5'-ATGACCATGATTACGCCAAG-3' und interner Primer 5'-GCCAGCAGTACGACGATT-3').

Deletion der Gene pilB3C3

Der Stamm H1424 (*ΔpyrE2*) wurde mit dem Plasmid pRE5 transformiert (siehe Abbildung 4.1). Das Plasmid enthält unter anderem den Selektionsmarker pyrE2, ein Gen aus dem Uracil-Biosyntheseweg sowie eine Gensequenz, die sich aus je 700 bp vor und 700 bp nach den zu deletierenden Genen Hvo_1033 (2124 bp) und Hvo_1034 (1662 bp) zusammensetzt. Durch einen Crossover Mechanismus konnte sich das Plasmid nach der Transformation in das Genom von *Haloferax volcanii* H1424 integrieren (2). Zur Selektion von Kolonien, die das Plasmid in sich tragen, wurden die transformierten Zellen auf Hv-Ca Uracil⁻ Agar (siehe Tabelle 4.5) ausplattiert. Die Agarplatten wurden für 5 – 7 Tage bei 45°C inkubiert. Ausgewählte, einzelne Kolonien wurden gepickt und in 5 mL flüssigem Hv-YPC Medium bei 45°C und 230 U^{min-1} für 48 h inkubiert. Durch die Inkubation im Komplexmedium wurde das Plasmid aus den Zellen ausgeschleust (3). Anschließend wurden die Flüssigkultur auf Hv-Ca Agar mit 25 µg mL⁻¹ Uracil und 20 µg mL⁻¹ 5-Fluororotsäure⁺ (5-FOA: 5-Fluoroorotic acid) ausplattiert. Zellen die das Plasmid nicht ausgeschleust hatten, trugen das pyrE2 Gen noch in sich, wodurch, das im Agar enthaltene, 5-FOA zum Zelltoxin 5-Fluorouracil katalysiert wurde, was zur Apoptose führte. Zellen ohne Plasmid, sind *ΔpyrE2* Stämme, konnten 5-FOA durch das fehlende pyrE2 Gen nicht verwerten und nahmen das im Agar vorhandene Uracil zum Wachstum auf. Bei den gewachsenen Kolonien handelte es sich daher entweder um den Wildtyp oder um den Deletionsstamm (4). Die Kolonien wurden gepickt und in flüssigem Hv-YPC bei 45°C, 230 U^{min-1} für 48 h inkubiert, bevor sie anhand einer Polymerasenkettenreaktion auf die Deletion untersucht wurden. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4.14 dargestellt.

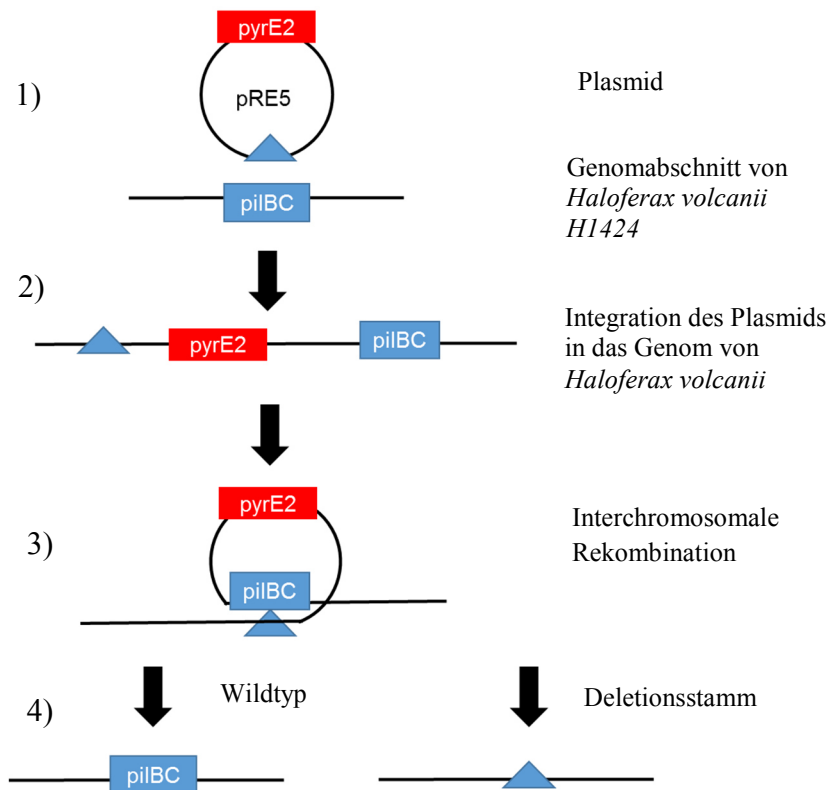


Abbildung 4.1 Deletion der Gene Hvo_1033 (*pilB*) und Hvo_1034 (*pilC*) in *Haloferax volcanii* H1424. 1) Transformation von H1424 mit dem Plasmid pRE5. pRE5 besitzt Δ *pyrE2* sowie eine Gensequenz (\blacktriangle) bestehend aus 700 bp vor und nach dem zu deletierenden Gen *pilBC*. 2) Integration des Plasmids in das Genom. Selektion Klone mit richtig integriertem Plasmid mit einem +Ura Agar. 3) Durch die Kultivierung der gewachsenen Kolonien auf dem +Ura Agar im Komplexmedium Hv-YPC wird das Plasmid pRE5 aus dem Genom durch intramolekulare Rekombination ausgeschlossen. 4) Die Selektion der Klone mit korrekt ausgeschlossenem Plasmid (Wildtyp oder Deletionsstamm) erfolgt auf einem +Ura, +5-Fluororotic Säure Agar.

Phänotypische Bestimmung des Deletionsstammes

Die Eigenschaft der Motilität wurde anhand eines Assays nach (Tripepi, Imam et al. 2010) untersucht. In 0,3% Hv-Ca Agar und 0,3% Hv-YPC Agar Platten wurde in die Mitte mit einem Zahnstocher Zellen des zu untersuchenden *Haloferax volcanii* Stamms gegeben. Die Platten wurden bei 45°C für 5 Tage inkubiert. Wiesen die Zellen Motilität auf, war nach der Inkubation ein kreisförmiger, trüber Hof um die Einstichstelle zu sehen.

Die Biofilmbildung wurde anhand eines Oberflächen Assays (O'Toole, Kaplan et al. 1999, Tripepi, Imam et al. 2010) und im parallelen Bioreaktorblock untersucht. Für den Assay wurden je drei Milliliter des Komplexmedium Hv-YPC (Tabelle 4.4) oder des definierten Mediums CDM (Tabelle 4.9) in die Vertiefung einer 12-Well-Platte gegeben und mit *Haloferax volcanii*

inokuliert, sodass eine optische Dichte bei 650 nm von 0,3 vorlag. In die Vertiefungen wurden Deckgläser (22 x 22 mm, 0,19 – 0,25 mm Dicke) gestellt. Anschließend wurde die 12-Well-Platte bei 45°C und 230 U min⁻¹ für 2 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gläschen herausgenommen und mit Kristallviolett eingefärbt. Hierfür wurden die Deckgläschen in eine 1% Kristallviolett-Lösung für 15 min inkubiert. Unspezifisch gebundenes Kristallviolett wurde anschließend mit Wasser vom Deckgläschen gespült. Angehaftete und gefärbte Zellen konnten unter dem Lichtmikroskop bei einer 100x Vergrößerung beobachtet werden. Für eine quantitative Auswertung wurden die Deckgläschen in 0,5 mL 90% Ethanol für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte des Ethanols mit dem gelösten Kristallviolett bei 595 nm bestimmt.

4.3 Satzverfahren zur Kultivierung von *Haloferax volcanii*

Aufgrund der Biofilmbildung von *Haloferax volcanii* H1424 konnte dieser Stamm nur im Schüttelkolben kultiviert werden. Ein Satzverfahren von *Haloferax volcanii* im Rührkesselreaktor wurde erst durch Deletion der Gene Hvo_1033 und Hvo_1034 und der damit verbundenen Generierung des neuen Stammes *Haloferax volcanii* H1895 möglich.

Aufgrund der Selektionsmarker *hdrB* und *pyrE2* von *Haloferax volcanii* H1424 und H1895 mussten den verwendeten Medien Hv-YPC bzw. Hv-Min und CDM verschiedene Zusätze nach Tabelle 4.15 hinzugegeben werden.

Tabelle 4.15: Zusätze, die aufgrund der Selektionsmarker *hdrB* und *pyrE2* von *Haloferax volcanii* H1895 zu den Medien Hv-YPC, Hv-Min und CDM bei einer Kultivierung des Stammes hinzugegeben werden müssen.

Selektionsmarker	Hv-YPC-Medium	Hv-Min/CDM-Medium
<i>hdrB</i>	40 µg mL ⁻¹ Thymidin	40 µg mL ⁻¹ Thymidin 50 µg mL ⁻¹ Hypoxanthin 50 µg mL ⁻¹ Methionin 50 µg mL ⁻¹ Glycin 50 µg mL ⁻¹ Pantothenensäure
<i>pyrE2</i>	---	50 µg mL ⁻¹ Uracil

4.3.1 Vorkulturherstellung

100 µL der Stammkultur von *Haloferax volcanii* H1424 oder H1895 wurde in 50 mL steriles Hv-YPC Medium (siehe Tabelle 4.4), angereichert mit 60 µg mL⁻¹ Thymidin, in einem 250 mL

Schüttelkolben überführt. Die Kultur wurde für 48 h bei 45°C und 170 U min⁻¹ inkubiert. Anschließend wurden davon 10 mL in 200 mL frisches und steriles Hv-YPC mit 60 µg mL⁻¹ Thymidin überführt. Die Vorkultur wurde für 16 h bei 45°C und 170 U min⁻¹ inkubiert und zur Inokulation der Hauptkultur verwendet. Handelte es sich bei der Hauptkultur um ein definiertes Medium wurde die Vorkultur bei 2000 U min⁻¹ für 15 min abzentrifugiert und in 20 mL definiertem Medium resuspendiert. Der Vorgang wurde insgesamt drei Mal wiederholt.

Die Kultivierung der *Haloferax volcanii* H1424 und H1895 im Satzverfahren, transformiert mit den Plasmiden pTA963_ADH/D1, pTA963_ADH/A1, pTA963_DR/D1, pTA963_DR/A1 und pTA1228_bgaH, konnte im Komplexmedium Hv-YPC ohne zusätzliche Zugabe von Thymidin erfolgen, da alle Plasmide die Selektionsmarker pyrE2 und hdrB trugen.

4.3.2 Satzkultivierung im Schüttelkolben

Falls nicht anders angegeben, erfolgte das Satzverfahren im Schüttelkolben von *Haloferax volcanii* H1424 und H1895 bei 45°C und 170 U min⁻¹. 50 mL steriles Medium wurden in einem sterilem 250 mL Schüttelkolben ohne Schikanen vorgelegt und mit 5 mL der Vorkultur steril inokuliert. Die optische Dichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 650 nm bestimmt.

Satzverfahren im definierten Medium

Zur Untersuchung des Wachstums von *Haloferax volcanii* H1424 und H1895 im definierten Medium wurden die beiden Medien CDM (siehe Tabelle 4.9) und Hv-Min (siehe Tabelle 4.6) ausgewählt. Für beide Stämme mussten die in Tabelle 4.15 aufgelisteten Zusätze hinzugegeben werden. Die Kultivierung im Satzverfahren unter Verwendung von CDM, wurde mit den folgenden Kohlenstoffquellen untersucht: 0,5% (v/v) Laktat, 0,5% (w/v) Succinat, 0,3% (w/v) Glukose, 0,3% (v/v) Glycerin und 0,1% (w/v) Acetat. Im dreistündigen Rhythmus wurde steril eine Probe genommen und hinsichtlich Substratkonzentration, Nebenproduktkonzentration und Zelldichte untersucht.

Satzverfahren im Komplexmedium Hv-YPC

100 mL steriles Hv-YPC Medium wurden in sterilen 500 mL Schüttelkolben vorgelegt und mit 10 mL aus den Vorkulturen von *Haloferax volcanii* H1424 und *Haloferax volcanii* H1895

inokuliert. Im dreistündigen Rhythmus wurde steril eine Probe genommen und hinsichtlich Substratkonzentration, Nebenproduktkonzentration und Zelldichte untersucht.

Voruntersuchungen zur Entwicklung eines Expressionsprotokolls

Zur Entwicklung eines Protokolls zur Expression der halophilen Gene wurde in der Literatur nach Protokollen für eine heterologe Genexpression, kontrolliert durch den Promotor *p.tna*, gesucht (siehe Tabelle 4.17). 50 mL steriles Hv-YPC Medium wurden mit einer 5 mL Vorkultur aus H1895-pTA1228_bgaH inokuliert. Die Expression der halophilen β -Galaktosidase entsprechend der Tabelle 4.17 wurde durch die Zugabe von L-Tryptophan induziert.

Tabelle 4.16: bgaH Expression in H1895 im 250 mL Schüttelkolben in 50 mL Hv-YPC. Die Expressionsbedingungen wurden den entsprechenden Literaturquellen entnommen. N.d. bedeutet hier, dass keine genaueren Angaben in den Literaturquellen gemacht wurden.

Temp, °C	1. Induktion			2. Induktion			Quelle	
	OD	L-Trp, mM	Inkubationszeit, h	OD	L-Trp, mM	Inkubationszeit, h		
1	45	n.d.(0.3)	14.7*10 ⁻³	1	-	-	-	Tripepi <i>et al.</i> , 2012 (Tripepi et al. 2012)
2	45	n.d.(0.3)	5	5	-	-	-	Lestini <i>et al.</i> , 2013 (Lestini et al. 2013)
3	45	Nach 24 h	5	7	-	-	-	Timpson <i>et al.</i> , 2012 (Timpson et al. 2012)
4	45	n.d.(0.3)	5	48	-	-	-	Liliensiek <i>et al.</i> , 2013 (Liliensiek et al. 2013)
5	42	n.d.(0.3)	1	5 - 6	0.5	3	1	Allers <i>et al.</i> , 2010 (Allers 2010)
6	45	0.3	3	16	n.d. (2.5)	1	4	Allers <i>et al.</i> , unpublished
7	45	0.3	6	16	2.5	3	4	

Expression der Gene aus den Solebecken im Roten Meer

50 mL Vorkultur von *Haloferax volcanii* H1424, transformiert mit pTA963_ADH/D1 beziehungsweise pTA963_ADH/A1, wurden verwendet um einen Liter steriles Hv-YPC, aufgeteilt in fünf 1 L Schüttelkolben zu inokulieren. Die Induktion der Genexpression erfolgte während der exponentiellen Wachstumsphase mit 6 mM L-Tryptophan, das als 27 mM Stammlösung in 18% Salzwasser gelöst war. Es folgte eine Inkubation der Kultur von 16 h bei 45°C und 170 U min⁻¹. Anschließend wurde die Genexpression mit 3 mM L-Tryptophan in einem zweiten Schritt induziert. Nach einer weiteren Inkubation von 4 h bei 45°C und 170 U min⁻¹ wurden die Zellen mit 4500xg bei 4°C für 45 min abzentrifugiert und geerntet. Das Zellpellet wurde bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert.

Ein Kryostock mit *E. coli*-CodonPlus(DE3)-RIPL, transformiert mit pET-3a-ADH/D1 beziehungsweise pET-3a-ADH/A1, wurde verwendet um 100 mL steriles LB-Medium mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin zu inokulieren. Die Vorkultur wurde bei 37°C und 170 U min⁻¹ über Nacht inkubiert. Die Vorkultur wurde verwendet, um 1,6 L steriles LB-Medium mit 100 µg mL⁻¹ und 15 µg mL⁻¹ Tetramycin zu inokulieren. Die Hauptkultur wurde auf vier 1 L Schüttelkolben aufgeteilt. Die Kultur wurde bei 37°C und 200 U min⁻¹ inkubiert bis bei einer OD₆₀₀ ~ 0,6 die Genexpression mit 1 mM Isopropyl-d-Thiogalaktopyronosid (IPTG) induziert wurde. Nach einer Inkubation bei 30°C für 9 h wurden die Zellen bei 4500xg und 4°C für 20 min abzentrifugiert und geerntet. Das Zellpellet wurde bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert.

4.3.3 Satzverfahren im 7,5 L Rührkesselreaktor

Das Satzverfahren im Rührkesselreaktor im Liter Maßstab wurde im Rührkesselreaktor vom Typ Labfors (Infors HAT, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Die Steuerung erfolgte mit Hilfe der korrespondierende Software Iris (Infors HAT, Bottmingen, Schweiz). Falls nicht anderes angegeben, erfolgte die Satzkultivierung stets bei 45°C und pH 7,4. Im Rührkesselreaktor wurde der pH mit 12,5% Ammoniak und 28% Phosphorsäure geregelt. Der Gelöstsauerstoff im Medium lag bei >50%, um nicht limitierend zu sein. Die optische Dichte des Kultivierungsmediums wurde photometrisch bei 650 nm bestimmt.

Aufbau des Glas-Rührkesselreaktors

Für die durchgeführten Satzkultivierungen wurde ein doppelwandiger Glasreaktor mit einem Nennvolumen von 7,5 L verwendet. Der Doppelmantel, der mit Prozesswasser befüllt war, wurde zur Temperatursteuerung verwendet. Ein Station-interner Heizkreislauf konnte durch das Aufwärmen oder Kühlen des Prozesswassers das sich im Reaktor befindende Medium temperieren.

Der Reaktordeckel verfügte über eine Rührwelle, die mittig unten am Deckel angebracht war und in das Medium tauchte. Die Welle verfügte über drei 6-Blatt-Scheibenrührer, die in einem Abstand von 3 cm angebracht waren. Die Rührwelle wurde von einem Elektromotor, der mit der Station verbunden war, angetrieben. Der Deckel enthielt Durchführungen für eine pH-, Temperatur- und pO₂-Sonde, sowie für einen Abgaskühler, ein Begasungsrohr und ein Probenahmerohr. Der Abgaskühler war an eine Schaumfalle angeschlossen. Der CO₂ und O₂ Gehalt der austretenden Abluft wurde in einer anschließenden Messstation bestimmt. Verwendete Säuren und Basen zur pH Regelung, sowie Zulaufmedien können durch Pumpen, die an der Labfors Station angebracht sind über Schnellkupplungen am Deckel in den Reaktor gefördert werden.



Abbildung 4.2: Aufbau des 7,5 L Rührkesselreaktors mit Doppelmantel (1), Rührer (2), Abgaskühler (3), Schaumfalle (4), Abgasmessgerät (5), pH und pO₂ Sonde (6). Die Begasung erfolgt durch Druckluft, die über einen Sterilfilter ins Medium dispergiert wird (7). Aus Säure und Base Vorlagefalschen (8) kann mit den Pumpenköpfen (9) der pH des Kultivierungsmediums geregelt werden. Die Ausgabe der *online* Messwerte sowie der Stell- und Regelungsgrößen erfolgt am Bildschirm (10).

Versuchsdurchführung

Aufgrund des hohen Salzgehalts der definierten Medien CDM und Hv-Min, sowie auch des Komplexmediums Hv-YPC wurde der Reaktor mit der zuvor kalibrierten pH- und pO₂-Sonde getrennt vom Medium bei 121°C und 2 bar Überdruck für 20 min autoklaviert. Das sterile Medium wurde anschließend in den sterilen Reaktor gepumpt. Medienzusätze (s. Tabelle 4.15) sowie das Inokulum wurden über ein Septum in den Reaktor gegeben. Die Startrührgeschwindigkeit lag bei 200 U min⁻¹. Das Startvolumen lag bei 2 L. Das Medium wurde mit 4 L min⁻¹ Luft begast. Um die Gelöstsauerstoffkonzentration im nicht limitierenden Bereich zu halten, erfolgte bei Unterschreiten der Gelöstsauerstoffkonzentration von 50%, durch die Software IRIS eine automatische Erhöhung der Rührgeschwindigkeit um 50 U min⁻¹ bis maximal 1200 U min⁻¹. In regelmäßigen Abständen wurden mit Hilfe des Probenahmerohrs Proben genommen und hinsichtlich Substratkonzentration, Nebenproduktkonzentration und Zelldichte analysiert.

Wurde im Reaktor eine Genexpression durchgeführt, wurde *Haloferax volcanii* H1895, transformiert mit pTA963-ADH/D1, pTA963-ADH/A1, pTA963-DR/D1 oder pTA963-DR/A1 im Komplexmedium Hv-YPC kultiviert. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurden 6 mM L-Tryptophan zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 16 h wurden 3 mM L-Tryptophan ins Medium gegeben. Nach weiteren 4 h Inkubation konnten die Zellen geerntet werden. Hierfür wurde die Zellsuspension mit einer Peristaltikpumpe aus dem Reaktor in 1 L Zentrifugenbecher gepumpt. Die Suspension wurde für 45 min bei 4500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wohingegen das Zellpellet bei -20°C gelagert wurde.

Medienoptimierung

Zur Optimierung der Biotrockenmasseausbeute wurde im Rührkesselreaktor der Einfluss von 0,5% (v/w) Laktat, 0,5% (w/w) Pyruvat sowie 0,3% (w/w) Acetat auf das Wachstum von *Haloferax volcanii* H1895 im Komplexmedium Hv-YPC untersucht. In einem weiteren Experiment wurde zu Hv-YPC 5 mM Ammoniumchlorid und 2 mM Kaliumphosphat, pH 7,5 hinzugegen und der Einfluss dieser Komponenten auf das Wachstum von *Haloferax volcanii* H1895 untersucht. In einem dritten Experiment wurde der Einfluss steigender Hefeextrakt- und

Casaminosäure-Konzentrationen untersucht. Die Durchführung der Versuche erfolgte wie oben beschrieben. Die Komponenten nach Tabelle 4.17 wurden aseptisch zum Medium hinzugegeben.

Tabelle 4.17: Komponenten, die in einzelnen Satzverfahren im Rührkesselreaktor zum Komplexmedium Hv-YPC hinzugegeben wurden

Komponente	Konzentration
Laktat	0,5% (v/v)
Pyruvat	0,5% (w/v)
Acetat	0,1% (w/v)
Kaliumphosphat, pH 7,5	2,0 mM
Ammoniumchlorid	5,0 mM
Hefeextrakt	5,0 – 20,0 g L ⁻¹
Casaminosäure	1,0- 4,0 g L ⁻¹

Aus den Ergebnissen wurde ein angereichertes Hv-YPC Medium generiert, das für alle, im Folgenden beschriebenen, Satzverfahren im Komplexmedium benutzt wurde (siehe Tabelle 4.18).

Tabelle 4.18: Gegenüberstellung des angereicherten Hv-YPC Mediums zum ursprünglichen Hv-YPC Medium.

Komponente	Hv-YPC	angereichertes Hv-YPC
NaCl	144 g L ⁻¹	144 g L ⁻¹
MgCl ₂ *6H ₂ O	18 g L ⁻¹	18 g L ⁻¹
KCl	4,2 g L ⁻¹	4,2 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5 g L ⁻¹	15 g L ⁻¹
Casaminosäure	1 g L ⁻¹	3 g L ⁻¹
Pepton	1 g L ⁻¹	1 g L ⁻¹
Kaliumphosphat	---	2 mM
Ammoniumchlorid	---	5 mM
Laktat	---	0,5% (v/v)

4.3.4 Zellrückhaltung

Zur Erhöhung der Biotrockenmassekonzentration wurde das Medium im Rührkesselreaktor mit vollständiger Zellrückhaltung kontinuierlich ausgetauscht.

Versuchsaufbau und Durchführung

Eine externe Peristaltikpumpe förderte das Kultivierungsmedium mit einer Geschwindigkeit von $0,75 \text{ L min}^{-1}$ im Kreislauf aus dem Rührkesselreaktor, durch die Filterkartusche und zurück in den Reaktor. Die verwendete Filterkartusche wies eine Porengröße von 750 kDa mit einer Membranfläche von 110 cm^2 auf (GE Healthcare, Schweden). Das Permeat wurde durch die Zulaufpumpe der Labforsstation in ein separates Gefäß gepumpt. Zeitgleich wurde durch die eine zweite Zulaufpumpe frisches Komplexmedium in den Rührkesselreaktor gepumpt. Die beiden Zulaufpumpen wiesen hierbei die gleiche Fördergeschwindigkeit auf, wobei Experimente mit Medien austauschraten von $0,075$, und $0,1 \text{ h}^{-1}$ durchgeführt wurden. *Haloferax volcanii* H1895 wurde für 8 h im optimierten Komplexmedium bis zur exponentiellen Wachstumsphase im Rührkesselreaktor ohne Medien austausch kultiviert. Nach 8 h wurde der Medien austausch mit Zellrückhaltung gestartet. Nach etwa 48 h wurde die stationäre Wachstumsphase erreicht, weshalb das Experiment abgebrochen wurde. Durch regelmäßige Probennahme wurde der Wachstumsfortschritt von *Haloferax volcanii* H1895 kontrolliert.

4.3.5 Parallele Kultivierung im Milliliter Maßstab

Versuchsaufbau

Parallele Kultivierungen wurden im Bioreaktorblock (bioREAKTOR 48, 2mag AG, München) mit 48 parallelen Rührkesselreaktoren (2mag AG, München) und gasinduzierenden Rührern durchgeführt. Die aus Polystyrol gefertigten Rührkesselreaktoren wiesen Strömungsbrecher und ein Nennvolumen von 18 mL auf. Das Arbeitsvolumen lag bei 10 – 14 mL. Zur pH und $p\text{O}_2$ Bestimmung verfügten die Reaktoren am Boden über fluorometrische Sensorfilme. Eine optosensorische Einheit, die unterhalb des Reaktorblocks angebracht war, sendete Lichtimpulse mit einer definierten Wellenlänge aus, die die Sensorfilme anregen konnte. Das Abklingverhalten des Fluoreszenzsignals, das mit der jeweiligen Konzentration des Analyten korrespondiert, wurde gemessen und über die Software Fedbatch XP ausgelesen. Durch die Einbindung in den automatisch gesteuerten Roboter konnte eine Regelung des pH in den parallelen Bioreaktoren erreicht werden. Über zwei separate Heiz- und Kühlkreisläufe konnte der Reaktorblock auf die gewünschte Reaktionstemperatur aufgewärmt werden, wobei der Reaktordeckel gekühlt wurde, um die Verdunstung zu minimieren. Zum gesamten Roboteraufbau gehörte noch ein Pipettier- und Robotergreifarm mit acht festinstallierten

teflonbeschichteten Spitzen, eine Mikrotiterplatte (MTP) Waschstation sowie ein MTP Photometer. In Vorratsgefäßen konnten Säuren und Basen für die pH Regelung sowie Zulaufmedien oder Medien zum Verdunstungsausgleich vorgelegt werden. Mit dem Pipettierroboterarm konnte die pH Regelung, der Verdunstungsausgleich sowie die *atline* OD Messung realisiert werden. Der Greifarm bewegte die MTP von der Arbeitsfläche zum Photometer und zur Waschstation, wo sie gereinigt wurde, um für die nächste OD Messung verwendbar zu sein.

Die Steuerung wurde durch die Software Fedbatch-XP durchgeführt. Die Software verarbeitete die Daten der Sensorik und steuerte mit dem FBXP Server die Robotersoftware Gemini an. Gemini steuerte die MTP-Waschstation an sowie den Roboter und konnte durch die Photometer Software Magellan auf das Photometer zugreifen.

Am Reaktordeckel waren 48 Rührer angebracht, die für die Rührgeschwindigkeit, einen Dauermagneten verfügten. Angetrieben wurden die Rührer durch einen Elektromagneten am Boden des Bioreaktors. Durch die Drehung der Rührorgane konnte durch die Hohlachse Luft aus dem Reaktorkopfraum in das Medium gesogen und dispergiert werden. Somit konnte eine konstante Versorgung der Kultur mit Sauerstoff gewährleistet werden.

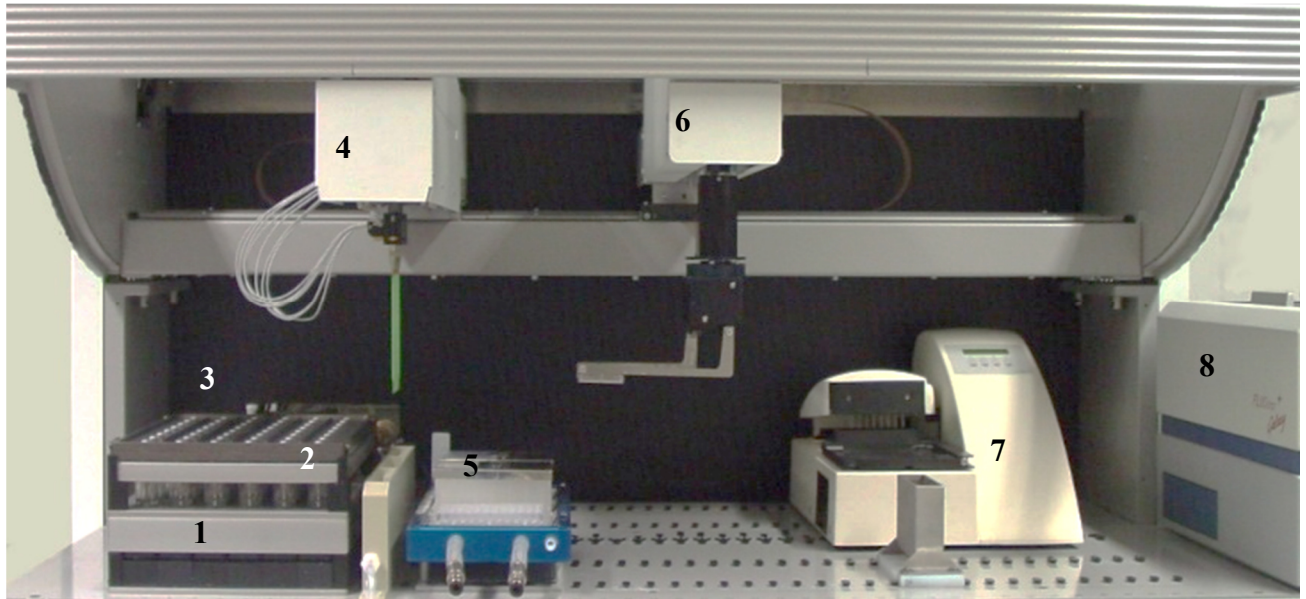


Abbildung 4.3: Aufbau zur automatisierten Kultivierung mit dem parallelen Bioreaktorblock (1) mit 48 Bioreaktoren aus Polystyrol (2), einem Reaktordeckel mit 48 Rührern (3). Der Greifarm (4) mit acht Edelstahlspitzen wird zur automatisierten Probenahme, Säure- und Basezugabe oder Mediumzugabe benötigt. In der Vorlagegefäßen (5) können Säure, Base oder Medien bereitgestellt werden. Der Greifarm (6) bewegt die Mikrotiterplatte mit den Proben aus den Reaktoren. In der Waschstation (7) wird die Mikrotiterplatte gewaschen. Im Photometer (8) können die Proben gemessen werden.

Versuchsdurchführung

Der Reaktordeckel wurde mit den verwendeten gasinduzierenden Rührern steril autoklaviert. Die Reaktoren waren steril abgepackt und wurden steril in den Reaktorblock gesetzt. In die Reaktoren wurden 12 mL des Komplexmediums Hv-YPC gegeben. Am parallelen Bioreaktorblock wurden Versuche zur Medienoptimierung und zur Entwicklung eines Expressionsprotokolls durchgeführt. Wurden Experimente zur Erweiterung des Kultivierungsmediums Hv-YPC durchgeführt, wurde das Komplexmedium mit einer Vorkultur von *Haloferax volcanii* H1895 inokuliert. Zur Entwicklung des Expressionsprotokolls wurde H1895, transformiert mit pTA1228_bgaH, verwendet. Nachdem der Bioreaktorblock mit dem Reaktordeckel verschlossen wurde, konnte er in die vorgesehene Halterung in der Roboteranlage gestellt werden. Der Block wurde auf 45°C geheizt, der Deckel wurde auf 10°C gekühlt. In zwei Vorlagebehälter wurde 12,8% Ammoniak und 28% Phosphorsäure zur Regelung des pH bereitgestellt. In einem weiteren Behälter wurde steriles VE-H₂O vorgelegt. Davon wurden stündlich 100 µL in die Reaktoren pipettiert, um die Verdunstung auszugleichen. Die Rührgeschwindigkeit betrug 2500 U min⁻¹ (0,42 W L⁻¹). Die

Kopfraumbegasung eines jeden Bioreaktors betrug $0,1 \text{ L min}^{-1}$. Im dreistündigen Rhythmus wurden automatisch Proben aus den Reaktoren genommen und in die bereitgestellte Mikrotiterplatte vorgelegt. Die optische Dichte der Proben wurde im Photometer bei 650 nm bestimmt.

Entwicklung eines Expressionsprotokolls

Die Untersuchungen zur Auswirkung der Induktorkonzentration und der Inkubationszeit auf die Genexpression wurde im parallelen Bioreaktorblock unter Verwendung des Expressionssystems *Haloferax volcanii* H1895_pTA1228-bgaH untersucht. L-Tryptophan Konzentration im Bereich von $1 - 9 \text{ mM}$ wurden zum Reaktionssystem hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 h wurde der Versuch abgebrochen. Im Vergleich dazu, wurde in einem weiteren Ansatz die zugegebene L-Tryptophan im Bereich von $2 - 10 \text{ mM}$, auf zwei Dosen aufgeteilt, hinzugegeben. Die Inkubationszeit zwischen der ersten und der zweiten Zugabe betrug 16 h . Nach der zweiten Zugabe von L-Tryptophan betrug die Inkubationszeit 4 h bevor die Zellen geerntet wurden. In einem weiteren Experiment wurde die Inkubationszeit untersucht. Die Inkubationszeit nach der ersten L-Tryptophan Zugabe wurde zwischen 12 und 20 h variiert, währenddessen blieb die zweite Inkubationszeit bei 4 h . In einem zweiten Versuchsansatz wurde nach einer Inkubationszeit von 16 h die zweite Inkubationszeit im Bereich von $1 - 6 \text{ h}$ variiert.

Variation der Medienbestandteile

Um Limitierungen durch zu geringe Konzentrationen an Nukleinbasen, B-Vitamine und Aminosäuren, die für die niedrige Biotrockenmasseausbeute von *Haloferax volcanii* H1895 verantwortlich sind, ausschließen zu können, wurden zum Reaktionsmedium Hv-YPC jeweils Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil in den Konzentrationen von $0 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Die einzelnen 21 Aminosäuren, sowie die Vitamine Biotin, Pantothersäure und Thiamin wurden in der Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ zum Ansatz hinzugegeben. Die Biotrockenmasseausbeute wurde als Indikator zur Evaluierung des Satzverfahrens benutzt.

In einem weiteren Experiment wurde die KCl und die MgCl_2 Konzentration im Komplexmedium Hv-YPC in einem Bereich von $55 - 400 \text{ mM}$ bzw. $88 - 500 \text{ mM}$ variiert. Die prozentuale Menge der beiden Salze gemessen an der Gesamtsalzmenge variierten im Medium

zwischen 9,9 – 47,0% (MgCl_2) bzw. 2,3 – 12,2% (KCl). Zugleich wurde, um die Salinität des Mediums nicht zu verändern, die Konzentration von NaCl im Medium verringert, um bei einem Gesamtsalzgehalt von 18% (w/w) zu bleiben. Die Biotrockenmasseausbeute wurde zur Bewertung des Experiments herangezogen. Die Durchführung der Versuche erfolgte wie oben beschrieben.

4.4 Proteinaufreinigung und analytische Methoden

4.4.1 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie

Die beiden Alkoholdehydrogenasen ADH/D1 und ADH/A1 sowie die beiden Dihydrodipicolinat Reduktasen DR/D1 und DR/A1 verfügten über einen His-Tag, weshalb sie mit Hilfe einer Metallaffinitätschromatographie, mit Ni^{2+} als immobilisiertes Kation, aufgereinigt werden konnte.

Das bei -20°C eingefrorene Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in Puffer A (2 M NaCl , 10 mM HEPES, pH 7,5) mit 1 mM Pefablock resuspendiert. Pro Gramm Zellpellet wurden 5 mL Puffer A verwendet. Der Zellaufschluss erfolgte mit der Sonotrode MS72 (600 W, 50% Amplitude, 50% Pulszeit, 1 h Gesamtzeit).

Die Zelltrümmer wurden bei 40.000xg 50 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4°C mit Hilfe einer *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) Anlage über eine mit Puffer A äquilibrierte 5 mL HisTrapTM Säule (GE Healthcare, Schweden) aufgereinigt. Die Flussrate betrug 2 mL min^{-1} .

Um Verunreinigungen abtrennen zu können, erfolgte der erste Elutionsschritt bei der Aufreinigung von AFD/D1 mit 11% Puffer B (2 M NaCl , 10 mM HEPES, pH 7,5, 300 mM Imidazol) bei AFD/A1 mit 4% Puffer B für zwei Säulenvolumen. Anschließend wurde das Protein in einem zweiten Schritt anhand eines linearen Gradienten von 11 – 50% Puffer B eluiert. Die Elution von DR/D1 und DR/A1 wurde durch einen Gradienten von 0 – 50% Puffer B durchgeführt. Im letzten Elutionsschritt wurde mit 100% Puffer B die Säule gespült. Das Eluat wurde in 5 mL Fraktionen gesammelt. Anhand eines Online UV-Detektors konnte, durch die Absorption bei 280 nm, das Zielprotein detektiert werden. Mit Hilfe einer

Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese konnten Fraktionen mit dem Zielprotein mit einer Reinheit von >90% identifiziert werden, die anschließend vereinigt und über Nacht in einem Verhältnis von 1/1000 dialysiert (2 M NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,5) wurden. Danach wurde die Lösung mit Hilfe von Vivaspin Zentrifugenröhrchen (MWCO 10 kDa) aufkonzentriert.

4.4.2 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Durchführung der Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden 12,5% Bis-Tris Gele verwendet. Die Proteinproben wurden mit 5 x Lämmli (Laemmli 1970) versetzt und für 5 min bei 95°C bis zur vollständigen Proteindenaturierung inkubiert. Zur Bestimmung der Größe wurde der Blue AQUA Prestained Protein Marker (212 – 20 kDa) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 45 mA im Tris-Glycin-Laufpuffer. Die Gele wurden mit Fairbanks Lösungen eingefärbt (Fairbanks, Steck et al. 1971).

4.4.3 Lagerung der aufgereinigten Proteine

Die aufgereinigten Proteine wurden aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

4.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Bicinchoninic acid (BCA) Test

Die Konzentration der Proteine wurde in Triplikaten mit dem BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Science) bestimmt. Dabei wurde nach den Anweisungen des Herstellers vorgegangen. Die Proteinproben wurden mit Dialysepuffer verdünnt, um zu garantieren, dass sie im Bereich des BSA Standards (20 – 2000 mg L⁻¹) liegen.

UV Absorption

Die Proteinkonzentration wurde durch die Absorption bei 280 nm bestimmt. Der molare Absorptionskoeffizient (ϵ) wurde mit Hilfe des Programms ExPASy - ProtParam bestimmt.

4.5 Analytische Methoden

4.5.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 650 nm bestimmt. Hierfür wurde Zellsuspension in Einmalküvetten mit einem Durchmesser von 1 cm gefüllt. Des Weiteren

wurde bei höheren Zellkonzentrationen die Suspension mit Medium ausreichend verdünnt, um den linearen Messbereich des Photometers nicht zu verlassen. Die Absorption konnte mit der Biotrockenmasse korreliert werden. In getrockneten und gewogene 1,5 mL Reagenzgefäße wurde 1 mL Zellsuspension gefüllt und bei 13.000xg für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wohingegen das Pellet bei 80°C für zwei Tage getrocknet wurde. Anschließend wurde das Pellet mit 1% NaCl (w/v) gewaschen, um getrocknete Salzreste zu entfernen und für weitere zwei Tage bei 80°C getrocknet (Mironescu, Mironescu et al. 2003). Danach wurde das Reagenzgefäß mit dem getrockneten Zellpellet auf einer Feinwaage ausgewogen und die Gewichts Differenz zum leeren Reagenzgefäß bestimmt. Die Biotrockenmassekonzentration wurde mit Gleichung 4-1. Die Masse des Zellpellets wurde nach Gleichung 4-2 mit der gemessenen optischen Dichte korreliert. Die Bestimmung der Biotrockenmasseskorrelation wurde in Triplikaten durchgeführt.

$$c_x = \frac{m_{\text{Pellet}} - m_{\text{Leer}}}{V} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

c_x	Biotrockenmassekonzentration, g L ⁻¹
m_{Pellet}	Masse des 1,5 mL Reagenzgefäß mit getrocknetem Pellet, g
m_{Leer}	Masse des leeren, getrocknetes 1,5 mL Reagenzgefäß, g
V	Probenvolumen, L

$$c_x = f \cdot OD_{650} \quad \text{Gleichung 4-2}$$

c_x	Biotrockenmassekonzentration, g L ⁻¹
f	Proportionalitätsfaktor, g L ⁻¹
OD_{650}	Optische Dicht bei 650 nm bestimmt

4.5.2 Bestimmung der Acetat-, Laktat-, Ammonium- und Phosphatkonzentration

Für die Bestimmung der Acetat, Laktat und Ammoniumkonzentration in den Proben, die während einer Kultivierung genommen wurden, wurden ein Laktat, Acetat und Ammonium Kit (r-biopharm, yellow line) verwendet. Bei der Durchführung wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen.

4.5.3 Bestimmung der L-Tryptophankonzentration

Die Tryptophankonzentration konnte mit Hilfe einer HPLC und einer C18 *reversed phase* Säule (Synergie, 4u Hydro RP 80A, 150,0 x 2,0 mm, phenomenex, USA) bestimmt werden. Hierfür wurden 10 µL Probe auf die Säule geladen. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,4 mL min⁻¹. Die Elution von L-Tryptophan erfolgte durch die schrittweise Erhöhung von Acetonitril von 0 auf 95% in 20 mM TFA in dd-H₂O über 50 min. L-Tryptophan konnte im Eluat mittels UV-Detektors bei 254 nm detektiert werden.

4.5.4 Bestimmung der 1-Pentanal- und 1-Pentanol Konzentrationen

Die Bestimmung der 1-Pentanal und 1-Pentanol Konzentration erfolgte mit Hilfe einer Head Space Gas-Chromatographie. 500 µL der Probenflüssigkeit wurde in 10 mL Head Space Vials gegeben. Die Vials wurden in den Autosampler gestellt und in einem angegliederten Ofen auf 80°C vorgeheizt. Aus dem Head Space Raum wurde ein Probenvolumen von 700 µL genommen und mit einem Split von 1:10 auf die Säule (Stablewax 30 m, 0,25 mm, Restek GmbH) injiziert. Die Injektortemperatur betrug 200°C. Die Auftrennung erfolgte auf der Säule mit einem Fluss von 1,2 mL min⁻¹ und dem folgenden Temperaturprogramm: Der Säulenofen wird für 2 min bei 50°C gehalten. Anschließend erfolgte eine Erhöhung der Temperatur um 10°C min⁻¹ auf 120°C. Diese Temperatur wurde für 3 min gehalten. Die Retentionszeit betrug für 1-Pentanal 3,92 min und 1-Pentanol 7,39 min.

4.6 Enzymcharakterisierung

In der vorliegenden Arbeit wurden die halophile Alkoholdehydrogenase ADH/D1 und die zwei halophile Dihydrodipicolinat Reduktasen DR/D1 und DR/A1 charakterisiert. Die spezifische Aktivität der halophilen Enzyme wurde nach Gleichung 4-3 bestimmt.

$$EA = \frac{\Delta NAD(H) \cdot V_R}{\Delta t \cdot v \cdot c_p} \quad \text{Gleichung 4-3}$$

EA spezifische Enzymaktivität, U mg⁻¹

$\Delta NAD(H)$ Änderung der Konzentration des Cosubstrats NAD⁺ oder NADH, µM

V_R Reaktionsvolumen, µL

v	Probenvolumen, μL
c_P	Proteinkonzentration, mg L^{-1}

4.6.1 Enzymaktivitätstest

β -Galaktosidase BGAH

Die Aktivitätsbestimmung der halophilen β -Galaktosidase BGAH wurde bei Raumtemperatur in Einmalküvetten mit einem Gesamtvolumen von 1 mL durchgeführt. 700 μL bgaH-Puffer (2,5 M NaCl, 50 mM Tris, pH 7,2, 10 μM MnCl_2 , 0,1% (v/v) β -Mercaptoethanol) wurden mit 100 μL Zellsuspension und 100 μL 2% (v/v) Triton X-100 in die Küvette gegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur 5 min inkubiert, um eine vollständige Zerstörung der Zellen zu erreichen. Durch die Zugabe von 100 μL einer ortho-Nitrophenyl-para-Galaktosid (ONPG) Lösung, mit einer Konzentration von 8 mg mL^{-1} , wurde die Reaktion gestartet. Der Umsatz von ONPG zu ortho-Nitrophenyl (ONP), konnte durch die Änderung der Absorption bei 405 nm bestimmt werden. Die Bestimmung der Hintergrundaktivität wurde mit Zellen ohne bgaH Genexpression durchgeführt. Die berechnete Hintergrundaktivität wurde von der bestimmten spezifischen Aktivität subtrahiert. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der einzelnen Proben erfolgte in Triplikaten.

Dihydrodipicolinat Reduktasen DR/A1 und DR/D1

Die Enzymaktivität konnte anhand der Absorptionsänderung durch die Oxidation von NADH bei 340 nm photometrisch bestimmt werden. Als molarer Extinktionskoeffizient (ϵ) wurde 6,22 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ verwendet. Dabei wurde eine Enzymeinheit (1 U) der als Umsatz von 1 μmol NADH zu NAD^+ pro Minute definiert. Die Hintergrundaktivität der Enzyme wurde in Abwesenheit der Substrate bestimmt und von der spezifischen Aktivität subtrahiert. Die Reaktionen wurden, falls nicht anders angegeben in einem 200 μL Ansatz in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) mit 2 M KCl mit 10 μM NADH und 220 mM Citraconic Anhydrid bei 40°C und einer Enzymkonzentration von 0,1 mg mL^{-1} durchgeführt.

Für die Bestimmung der Substrat- und Cofaktorspezifität wurde der katalytische Umsatz verschiedener Alkene mit den Cofaktoren NADH und NADPH untersucht.

Alkoholdehydrogenasen ADH/D1 und ADH/A1

Die Enzymaktivität konnte anhand der Absorptionsänderung durch die Reduktion von NAD^+ zu NADH bei 340 nm photometrisch ermittelt werden. 1 U der Enzymaktivität entspricht dem reduktiven Umsatz von 1 μmol NAD^+ zu NADH pro Minute. Falls nicht anderes angegeben wurde die Enzymaktivität in 1 mL Ansätzen in Einweg-Küvetten bei 60°C bestimmt. Dafür wurde ein Glycinpuffer (50 mM, pH 10) mit 3 M KCl verwendet. Weiter wurden dem Versuchsansatz 12,5 mM NAD^+ und 30 mM Cinnamylalkohol als Substrat hinzugegeben. Das Enzym lag in einer Konzentration von 0,35 μM mit einem 20fachen Überschuss an Zn^{2+} bzw. Mn^{2+} vor. Kontrollansätze wurden durchgeführt und von der bestimmten spezifischen Aktivität subtrahiert. Die Aktivität der einzelnen Proben wurde in Triplikaten durchgeführt.

Alkoholdehydrogenasen können Fe^{2+} oder Zn^{2+} abhängig sein (Jörnvall, Persson et al. 1987, Persson, Krook et al. 1991, Sun and Plapp 1992). Nach Grötzinger et al. handelt es sich bei ADH/D1 um eine Fe^{2+} abhängige Alkoholdehydrogenase. Zur Untersuchung der Metallabhängigkeit wurde frisch aufgereinigte Enzymlösung gegen einen Glycinpuffer (50 mM, pH 10) mit 2 M NaCl und 10 mM EDTA über Nacht im Verhältnis 1:1000 bei 4°C dialysiert. Damit konnte an das Enzym gebundenes Metall von EDTA komplexiert und entfernt werden. Aus 10 mM Stammlösungen von MgCl_2 , CrCl_2 , MnCl_2 , MnSO_4 , $\text{FeC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , NiSO_4 , CuSO_4 , ZnCl_2 und ZnSO_4 wurde ein 20facher Überschuss (0,44 mM) zu 1 mL Enzymlösung mit einer Konzentration von 22,2 μM zugegeben und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Enzymlösung zur Bestimmung der spezifischen Aktivität verwendet.

Zur Bestimmung der Substrat- und Cofaktorspezifität wurden zum Ansatz 4 μL verschiedener primärer, sekundärer und tertiärer Alkohole (siehe Tabelle 12.1) hinzugegeben. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde mit 12,5 mM NAD^+ und 12,5 mM NADP^+ durchgeführt.

4.6.2 Bestimmung von Einflussgrößen

Temperaturoptima

Die Temperaturoptima der Alkoholdehydrogenase, sowie der beiden Dihydrodipicolinat Reduktasen wurden in einem Bereich von 25 – 80°C und mit Hilfe des oben beschriebenen

Versuchsaufbau bestimmt. Für die Bestimmung der Aktivierungsenergie wurde die in Gleichung 4-4 dargestellte Arrhenius Gleichung verwendet.

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{R \cdot T}}$$

Gleichung 4-4

k	Reaktionskonstante, s ⁻¹
A	Arrheniusfaktor, s ⁻¹
E _A	Aktivierungsenergie, J mol ⁻¹
R	Gaskonstante, 8,314 J mol ⁻¹ K ⁻¹
T	Absolute Temperatur, K

Bestimmung der pH Optima

Zur Bestimmung der pH Optima der Dihydrodipicolinat Reduktasen wurde ein Phosphatpuffer (50 mM) mit 2 M KCl in einem pH Bereich von 7 – 9 verwendet. Die Reaktion wurde bei 35°C durchgeführt.

Das pH Optimum der Alkoholdehydrogenase wurde unter der Verwendung eines Phosphatpuffers (50 mM) und eines Glycinpuffers (50 mM), jeweils mit 3 M KCl versetzt, durchgeführt. Die Reaktionstemperatur lag bei 70°C. Als Substrat wurde 38,4 mM 1-5-Pentandiol verwendet.

Salzoptima

Der Einfluss einer ansteigenden KCl Konzentration (0 – 4 M) im Reaktionspuffer (50 mM Phosphat) auf die Enzymaktivitäten der Dihydrodipicolinat Reduktasen wurde bei pH 7,5 und 35°C, sowie bei pH 9 und 30°C untersucht.

Die Bestimmung des Einflusses der Salzkonzentration auf die Aktivität von ADH/D1 wurde in 50 mM Glycinpuffer, pH 10 mit 0,1 – 4 M KCl bzw. NaCl bei 70°C mit 38,4 mM 1-5-Pentandiol als Substrat durchgeführt.

4.6.3 Bestimmung kinetischer Parameter

Die kinetischen Parameter für die katalytische Umsetzung von Citraconic Anhydrid mit der Dihydrodipicolinat Reduktase DR/D1 wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 mit 3 M KCl bei 40°C durchgeführt. Die Substratkonzentration wurde von 0 – 300 mM variiert, wobei die NADH Konzentration bei 500 mM konstant gehalten wurde. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter für NADH wurde das Cosubstrat von 0 – 15 mM bei einer konstanten Substratkonzentration von 220 mM variiert. Die Bestimmung der kinetischen Parameter für das Enzym DR/A1 wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 9 mit 2 M KCl und bei 30°C durchgeführt. Das Cosubstrat wurde von 1 – 15 mM bei einer konstanten Substratkonzentration von 220 mM variiert. Anschließend wurde bei einer konstanten Cosubstratkonzentration von 500 mM NADH die Substratkonzentration von 0 – 300 mM variiert.

Kinetische Parameter wurden für die drei Substrate Cinnamylalkohol, 1-5-Pentandiol und 1-3-Propandiol bei der katalytischen Umsetzung durch ADH/D1 mit 100 mM NAD⁺ und bei 70°C bestimmt. Für den Cofaktor NAD⁺ erfolgte die Bestimmung der kinetischen Parameter mit einer konstanten Konzentration 100 mM 1-5-Pentandiol als Substrat und bei 70°C. Die Konzentration des Cofaktors wurde von 1 – 15 mM variiert. Die Bestimmung der Parameter erfolgte unter der Verwendung der Michaelis-Menten-Kinetik. Um eine Pseudo-1-Substrat-1-Enzym Reaktion darstellen zu können, ist es erforderlich, dass entweder das Substrat oder der Cofaktor im Überschuss vorliegen und eine Rückreaktion bei diesen Bedingungen ausgeschlossen ist (Bisswanger 2008).

Die Abschätzung der kinetischen Parameter erfolgte gemäß der Michaelis-Menten Gleichung mit Hilfe nichtlinearer Regression unter Verwendung der Software Sigma Plot (Version 11.0).

4.6.4 Evaluierung der Enzymstabilität

Lagerstabilität

Lösungen von frisch aufgereinigtem Enzym wurde aliquotiert und bei -20°C, 4°C, 25°C und 50°C gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden Aktivitätsmessungen nach den oben genannten Bedingungen durchgeführt und mit Gleichung 4-5 die Halbwertszeit bestimmt. Zur Bestimmung der Halbwertszeit nach Gleichung 4-5 wurde für den Enzymzerfall eine Reaktion 1. Ordnung angenommen.

$$EA_t = EA_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

Gleichung 4-5

EA_t	spezifische Aktivität bei einer Zeit t
EA_0	spezifische Aktivität zur Zeit t = 0
k	Konstante, h ⁻¹
t	Zeit, h

Lösungsmittelstabilität

Durch die hohe Salzkonzentration im Puffer, steht den Enzymen zur Solubilisierung wenig freies Wasser zur Verfügung. Es ist daher möglich, dass halophile Enzyme generell in Umgebungen mit geringer Wasseraktivität stabil sind (Fukushima, Mizuki et al. 2004) (Sellek and Chaudhuri 1999). Dimethylsulfoxid (DMSO) als organisches Lösemittel verringert die Wasseraktivität zusätzlich. Die Verwendung lösungsmittelstabiler Biokatalysatoren kann verschiedene Vorteile besitzen. Hier seien die höhere Löslichkeit hydrophober Substrate genannt sowie die Möglichkeit das Enzym ohne zusätzliche Stabilisierungsmaßnahmen wie Immobilisierung direkt verwenden zu können.

DMSO wurde in den Konzentrationen von 0 – 20% (v/v) dem Reaktionsansatz zugegeben. Die KCl Konzentration wurde in einem Bereich von 0 – 3 M variiert. Die katalytische Umsetzung von 220 mM Citraconic Anhydrid mit DR/A1 erfolgte in 50 mM Kaliumphosphat, pH 9 bei 30°C.

Der Einfluss von DMSO auf das Enzym DR/D1 wurde bei 40°C in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,5 und 3 M KCl untersucht.

Für das Enzym ADH/D1 wurde der Einfluss des Lösemittels DMSO (0 – 20%) bei 70°C in 50 mM Glycin, pH 10 mit variierenden KCl Konzentrationen von 0 – 3 M untersucht. Als Substrat wurde 38,4 mM 1-5-Pentandiol gewählt.

4.7 Ganzzell-Biotransformation

Für die Experimente zur Ganzzell-Biotransformation im Satzverfahren wurden *Haloferax volcanii* H1895, transformiert mit dem Plasmid pTA963_ADH/D1, verwendet. Durch Zugabe

der Cosubstrate Formiat und Glukose zur Cofaktorregenerierung sollte die exprimierte Alkohol Dehydrogenase AFD/D1 mit Hilfe der intrinsischen Formiat (Hvo_0935 und Hvo_B0235) und Glukose Dehydrogenase (Hvo_1531) das Aldehyd als Substrat katalytisch zum korrespondierenden Alkohol umsetzen.

Mit Hilfe der in *Haloferax volcanii* intrinsisch vorhandenen Formiat- und Glukosedehydrogenasen könnte eine katalytische Umsetzung von Aldehyden zu Alkoholen mit Hilfe der heterolog exprimierten AF_D und durch die Zugabe von Formiat bzw. Glukose zu den ganzen Zellen möglich sein.

4.7.1 Vorversuche zur Untersuchung verschiedener Substrate auf *Haloferax volcanii* H1895

In 250 mL Schüttelkolben wurde 50 mL steriles Hv-YPC Medium gegeben und mit H1895_pTA963-AF_D Vorkultur inokuliert. Zu den Ansätzen wurden die Aldehyde 1-Pentanal, 1-Heptanal und Cinnamaldehyd in den Konzentrationen 1 – 10 mM gegeben. Durch regelmäßiges Überprüfen des Wachstums konnten Rückschlüsse auf den Einfluss des Aldehyds auf den Metabolismus von *Haloferax volcanii* H1895 gezogen werden.

4.7.2 Biotransformation im Milliliter Maßstab

Für die Experimente zur Ganzzell-Biotransformation im Satzverfahren wurden *Haloferax volcanii* H1895, transformiert mit dem Plasmid pTA963_ADH/D1, verwendet. Die Kultivierung des Stammes erfolgte im Satzverfahren wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben. Das Zellpellet wurde nicht gelagert, sondern sofort mit sterilem Hv-YPC Medium resuspendiert. Durch Verdünnen konnten Biotrockenmassekonzentration von 0,1 – 34 g L⁻¹ erreicht werden.

Die Biotransformation erfolgte in Glasgefäßen (4 mL Nominalvolumen, Carl Roth), die mit einem Plastikdeckel verschlossen werden konnten. Zur besseren Durchmischung der Zellsuspension wurde ein Kreuzmagnetrührer in die Gefäße gegeben. Zur Untersuchung der katalytischen Umsetzung von 10 mM 1-Pentanal wurden 1,6 mL der Zellsuspension in den Konzentrationen 0,1 – 34 g L⁻¹ in die Glasgefäße gegeben. Als Cosubstrat wurde 200 mM Formiat bzw. 200 mM Glukose zugegeben. Gegenstand der Untersuchung war ebenfalls die Variation der Cosubstratkonzentration zwischen 0 und 200 mM und die der

Substratkonzentration von 0 – 10 mM. Die Reaktionen erfolgten bei 45°C und 280 U min⁻¹ in einem Zeitraum vom 0,5 – 24 h.

5 Deletion der Biofilmgene in *Haloferax volcanii* H1424

Eine Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1424 im Rührkesselreaktor war aufgrund der störenden Einflussnahme des Biofilms auf die Sensorik im Bioreaktor nicht möglich. Verantwortlich für die Ausbildung des Biofilms sind Pili-ähnliche Strukturen auf der Zelloberfläche von *Haloferax volcanii*. Die Gensequenzen Hvo_1033 (pilB3) und Hvo_1034 (pilC3) kodieren eine ATPase und ein Membranprotein des Pili Assemblierungssystems (Tripepi, Imam et al. 2010, Tripepi, Esquivel et al. 2013). Aufgrund der Deletion dieser Gene ist eine Ausbildung von Biofilm-bildenden Pili auf der Zelloberfläche nicht mehr möglich. Die Ausbildung von Flagellen, die für die Motilität der Zellen verantwortlich sind, bleibt davon unberührt. Somit sollte der neue Deletionsstamm keinen Biofilm mehr ausbilden, jedoch seine Motilität noch behalten (Tripepi, Esquivel et al. 2013).

5.1 Deletion der Gene Hvo_1033 und Hvo_1034

Zur Deletion der Gene wurde das Plasmid pRE5 (siehe Tabelle 4.13) in das Genom von *Haloferax volcanii* eingeschleust. Anhand interchromosomaler Rekombination konnten die Gene Hvo_1033 und Hvo_1034 aus dem Genom genommen werden. Das ins Genom von *Haloferax volcanii* integrierte Plasmid pRE5 wurde durch eine Anzucht einzelner Kolonien in flüssigem Hv-YPC Medium aus dem Genom ausgeschleust. Die Selektion nach Kolonien, die das Plasmid erfolgreich ausgeschleust hatten, wurde durch das Ausplattieren des Stammes auf Hv-Ca Agar mit Uracil und 5-Fluororotsäure untersucht. Die auf dem Agar gewachsenen Kolonien lagen entweder als *Haloferax volcanii* H1424 oder als Deletionsstamm vor. Einzelne Klone aus den gewachsenen 5-Fluororotsäure resistenten Kolonien wurden mit Hilfe einer Polymerasenkettenreaktion auf die Deletion untersucht. Die Gene Hvo_1033 und Hvo_1034 haben zusammen eine Größe von 3786 bp. Die Primer lagern sich 700 bp vor und 700 bp nach den beiden Genen an. Damit ergibt sich für den Wildtyp ein PCR Fragment von 5186 bp. Liegt die Mutante vor, erhält man ein Fragment mit einer Größe von 1400 bp. In Abbildung 5.1 sind die Ergebnisse der Polymerasenkettenreaktion gezeigt. Bis auf die Spalte g in Abbildung 5.1 A

und n in Abbildung 5.1 B sind bei allen anderen Spalten PCR Fragmente von >5000 bp zu sehen. Bei diesen Kolonien handelt es sich daher nicht um die Mutante Δ pilB3C3, sondern um den Ausgangsstamm *Haloferax volcanii* H1424. Bei g und n kann eine PCR Fragment bei <1500 bp detektiert werden. Diese beiden Kolonien wurde auf Hv-YPC Agar mit 50 μ g mL⁻¹ Thymidin ausplattiert und für weitere phänotypische Untersuchung bereitgehalten.

Die Fragmente mit einer Größe zwischen 2500 bp und 2000 bp mögen aus unspezifischen Primeranlagerungen resultieren. Die Spalten a, l und m in Abbildung 5.1 weisen eine Bande bei >5000 bp und bei <1500 bp auf. Hierbei könnte es sich um eine unvollständige Gendeletion im polyploiden *Haloferax volcanii* handeln.

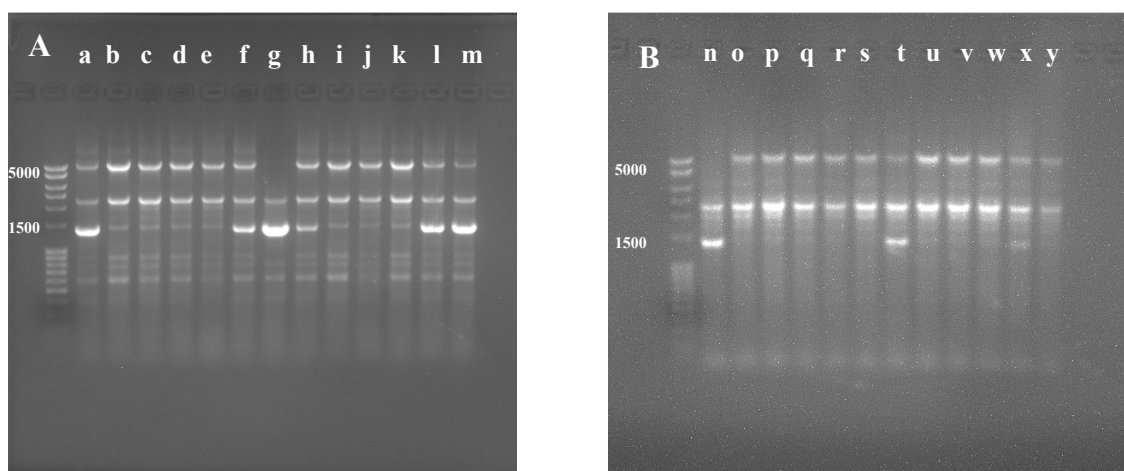


Abbildung 5.1: Ergebnis der Kolonie-PCR von 5-FOA resistenten Kolonien (a – y). In der ersten Spalte ist je der Marker (1000 bp extended, NEB) aufgetragen.

5.2 Phänotypische Charakterisierung des Stammes Δ pilB3C3

Die phänotypische Charakterisierung der beiden Stämme *Haloferax volcanii* H1424 Δ pilB3C3 g und *Haloferax volcanii* H1424 Δ pilB3C3 n erfolgte anhand der Eigenschaften Motilität und Biofilmbildung. Als Kontrolle wurden die in Tabelle 5.1 aufgelisteten Stämme verwendet. Anhand der Deletion des Gens einer Prepilin Peptidase pibD in *Haloferax volcanii* H1830 können weder Flagellen noch Pili ausgebildet werden, wodurch H1830 keinen Biofilm bildet, jedoch auch keine Motilität aufweist (Tripepi, Imam et al. 2010, Tripepi, Esquivel et al. 2013).

Der Stamm *Haloferax volcanii* H1895, welcher durch die Gendeletion von pilB3 und pilC3 aus *Haloferax volcanii* H1424 entwickelt wurde, wurde als Positivkontrolle verwendet.

Tabelle 5.1: Verwendete Kontrollstämme für die Bewertung der Δ pilB3C3 Stämme bei der phänotypischen Charakterisierung

Stamm	Motilität	Biofilmbildung
H1895	+	-
H1830	-	-
H1424	+	+

5.2.1 Motilität

Zur Evaluierung der Motilität wurden Zellen der *Haloferax volcanii* Stämmen H1895, H1424, H1830, H1424 Δ pilB3C3 n und H1424 Δ pilB3C3 g in die Mitte eine Petrischale, gefüllt mit 0,3% Hv-Ca Agar (siehe Tabelle 4.5) gegeben. Nach vier Tagen Inkubation wurde die Hofbildung um die Einstichstelle gemessen und als Indikator für Motilität herangezogen. Bei den *Haloferax volcanii* Stämmen H1895, H1424, H1424 Δ pilB3C3 n und H1424 Δ pilB3C3 g war nach vier Tagen Inkubation bei 45°C eine Hofbildung von 4 cm zu beobachten. Bei *Haloferax volcanii* H1830 konnte keine Hofbildung festgestellt werden.

5.2.2 Oberflächen Adhäsionstest

Die Versuche zur Adhäsion wurden im Komplexmedium Hv-YPC und im definierten CDM Medium (siehe Tabelle 4.8) durchgeführt. Die Medien wurden mit den *Haloferax volcanii* Stämmen, aufgelistet in Tabelle 5.1 inokuliert. In die mit den verschiedenen Stämmen inokulierten Medien wurde je ein Deckglas gestellt. Als Kontrolle wurde in Deckglas in das jeweilige Medium ohne Zellen gestellt. Je höhere die Fähigkeit Biofilm auszubilden war, desto mehr Zellen haben sich an die Deckgläser angelagert. Die gebundenen Zellen auf den Deckgläsern wurden mit Kristallviolett angefärbt. Das gebundene Kristallviolett wurde mit einer definierten Menge Ethanol gelöst und die optische Dichte bei 595 nm der Lösung bestimmt. Somit wurde die Höhe der Absorption bei 595 nm als Indiz für das Maß der Biofilmbildung herangezogen. In Abbildung 5.2 ist die optische Dichte bei 595 nm der einzelnen *Haloferax volcanii* Stämme, die in den beiden Medien CDM und Hv-YPC generiert wurden, dargestellt.

Generell war die Oberflächenadhäsion im definierten Medium CDM etwas höher als im Komplexmedium Hv-YPC. Das verdeutlichen die konstant höheren Absorptionswerte bei 595 nm für die *Haloferax volcanii* Stämme, die in CDM Medium kultiviert wurden. Die höchste Absorption von 0,162 im Hv-YPC Medium beziehungsweise 0,184 im CDM Medium wurde durch *Haloferax volcanii* H1424 verursacht. Die Biofilmbildung der Kontrollstämme H1830 und H1895 zeigte in Hv-YPC die geringsten Absorptionswerte mit 0,084 und 0,069. Im definierten Medium lagen die Werte mit 0,104 und 0,084 marginal höher. Der Stamm H1424 Δ pilB3C3 g weist in Hv-YPC und CDM eine höhere Absorption auf (0,104 und 0,117)) als H1424 Δ pilB3C3 n (0,083 und 0,091).

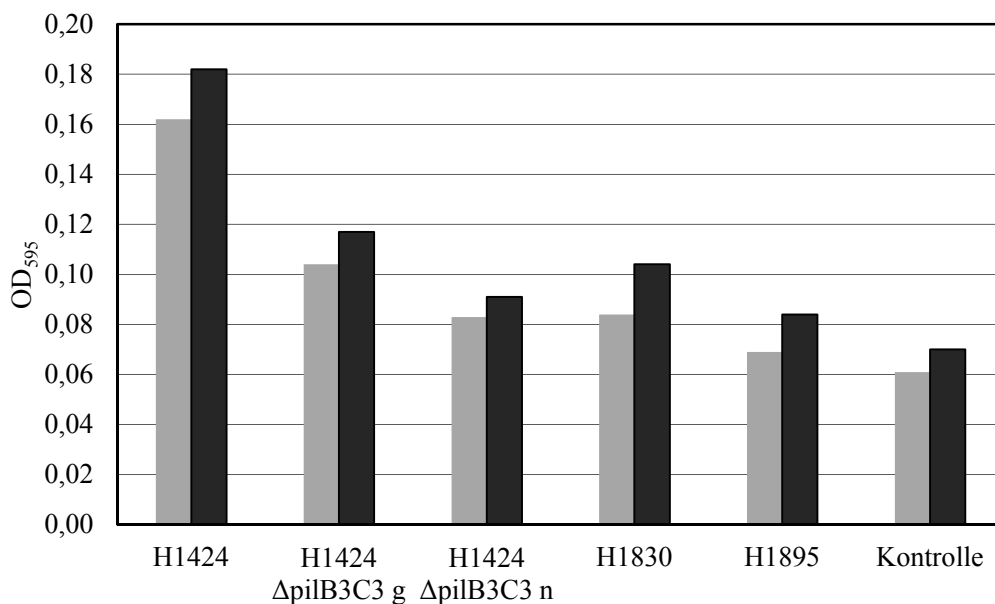


Abbildung 5.2: Ergebnisse des Oberflächen Adhäsionstests zur Evaluierung der Biofilmbildung. Hierfür wurde die optische Dichte des gelösten Kristallvioletts bei 595 nm bestimmt. Die Versuche wurden mit den *Haloferax volcanii* Stämmen H1424, H1424 Δ pilB3C3 g, H1424 Δ pilB3C3 n, H1830 und H1895 im Komplexmedium Hv-YPC (graue Balken) und im definierten Medium CDM (schwarze Balken) durchgeführt. Bei der dargestellten Kontrolle befand sich das Deckglas in nicht inokuliertem Medium.

Eine weitere phänotypische Charakterisierung wurde mit den genannten Stämmen im parallelen Bioreaktorblock durchgeführt. In einem größeren Maßstab als beim durchgeführten Oberflächen Adhäsionstest sollte die Biofilmbildung untersucht werden. Die Stämme aus Tabelle 5.1 wurden im sterilen Komplexmedium Hv-YPC (13 mL) bei 45°C kultiviert. In

Abbildung 5.3 ist das Wachstum der einzelnen Stämme dargestellt. Bei H1424 konnte im Komplexmedium Hv-YPC kein Wachstum festgestellt werden, jedoch wurde an den Bioreaktoren eine starke Biofilmbildung beobachtet. Die beiden Kontrollstämme, wie auch H1424 Δ pilB3C3 n zeigten nach 9 h eine Biotrockenmassekonzentration von 1,18 – 1,2 g L⁻¹. An den Wänden des Reaktors konnte keine Biofilmbildung beobachtet werden. Der Stamm H1424 Δ pilB3C3 g wies mit 1,05 g L⁻¹ eine niedrigere Biomasseausbeute auf. Dafür zeigte sich an den Bioreaktoren eine leichte Biofilmbildung.

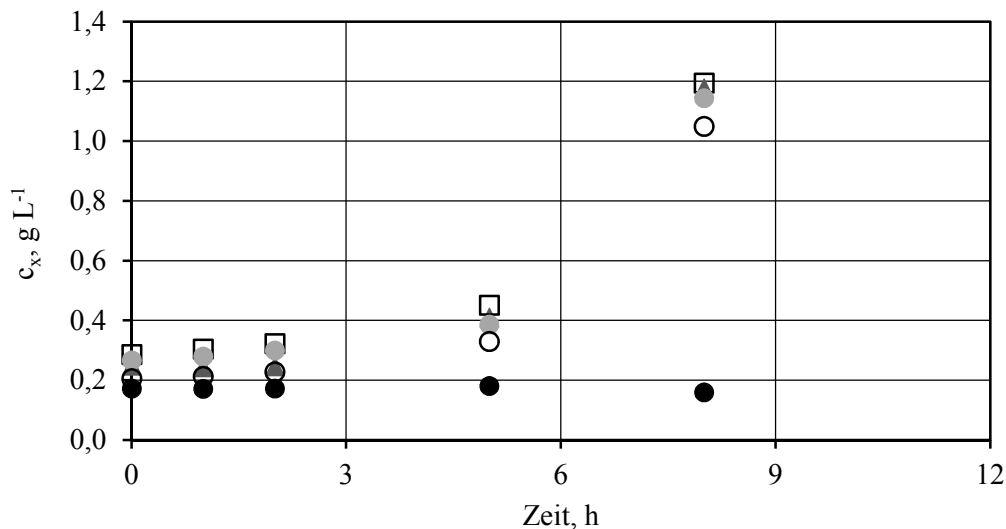


Abbildung 5.3: Kultivierung der *Haloferax volcanii* H1895 (▲), H1830 (□), H1424 Δ pilB3C3 g (●), H1424 Δ pilB3C3 n (○) und H1424 (●) in Hv-YPC bei 45°C, pH 7,5 und 2500 U min⁻¹

5.3 Diskussion

Haloferax volcanii bildet Pili Strukturen aus, die zur Oberflächenadhäsion führen. Bei einer Kultivierung im Bioreaktor führt die Biofilm zu störenden Interaktionen mit den Sensoren. Pohlschröder et al. identifizierte im Genom von *Haloferax volcanii* zwei Gene (Hvo_1033 *pilB3* und Hvo_1034 *pilC3*), die im Pili Assemblierungssystem eine ATPase und ein Membranprotein codieren. Durch die Deletion der beiden Gene, kann *Haloferax volcanii* keinen Biofilm mehr ausbilden. Diese Deletion wurde mit dem Stamm *Haloferax volcanii*

H1424 ebenfalls durchgeführt, um einen Stamm herzustellen, der im Rührkesselreaktor kultiviert werden kann.

Nach den Ergebnissen der durchgeführten Motilitäts-, Adhäsions- und Kultivierungsexperimente zeigt der Deletionsstamm *Haloferax volcanii* H1424 Δ pilB3C3 die gleichen phänotypischen Merkmale wie der Kontrollstamm *Haloferax volcanii* H1895. Aufgrund der Deletion der beiden Gene Hvo_1033 (pilB3) und Hvo_1034 (pilC3) ist der Stamm motil geblieben und zeigt keine Oberflächenadhäsion mehr. Darüber hinaus konnte mit den Δ pilB3C3 Deletionsstämmen ein Wachstum im Bioreaktor beobachtet werden. Somit kann von einer erfolgreichen Gendeletion ausgegangen werden.

Haloferax volcanii H1424 Δ pilB3C3 g bildete marginal noch Biofilm aus. Dies ist zum einen als Resultat des Oberflächenadhäsionstest an den höheren Absorptionwerten in den Medien Hv-YPC und CDM (0,11 und 0,12) im Vergleich zu den Absorptionwerten von H1895 (0,069 und 0,081 in Hv-YPC und CDM) zu sehen. Zum anderen ist neben der leichten Zelladhäsion an den Bioreaktoren die finale Biomassekonzentration von *Haloferax volcanii* H1424 Δ pilB3C3 g in der Satzkultivierung im parallelen Bioreaktorblock geringer als die von *Haloferax volcanii* H1895. Diese marginale Zelladhäsion könnte einer unvollständigen Gendeletion geschuldet sein. *Haloferax volcanii* besitzt ein polyploides Genom (Large, Stamme et al. 2007, Blaby, Phillips et al. 2010). In der exponentiellen Wachstumsphase besitzt eine Zelle bis zu 18 Kopien des Genoms. In der Ruhephase kann *Haloferax volcanii* bis zu 10 Kopien pro Zelle tragen (Breuert, Allers et al. 2006). Somit ist es möglich, dass die Deletion der Gene Hvo_1033 und Hvo_1034 nicht in allen Kopien des Genoms stattgefunden hat. Dies ist anschaulich auch in Abbildung 5.1 zu beobachten. In den Spalten a, f, h, l, m und t des Agarosegels ist eine Bande bei > 5000 bp (pilB3C3 enthalten) und eine bei < 1500 bp (pilB3C3 entfernt) zu beobachten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass nur in einigen Genomkopien die Gendeletion erfolgreich stattgefunden hat, in anderen Genomkopien dagegen ist pilB3 und pilC3 vollständig erhalten. Somit bilden diesen unvollständigen Deletionsstämmen noch Biofilm aus.

Aufgrund der Deletion der beiden Gene Hvo_1033 (pilB3) und Hvo_1034 (pilC3) kann eine Satzkultivierung im Rührkesselreaktor durchgeführt werden. Somit können Genexpressionen bei höhere Biomasseausbeuten als im Schüttelkolben möglich, realisiert werden.

In der fortlaufenden Arbeit wird der klonierten Deletionsstamm *Haloferax volcanii* H1424 Δ pilB3C3 n als *Haloferax volcanii* H1895 bezeichnet. An der University of Nottingham (Nottingham, England) in der Arbeitsgruppe von Prof. Thorsten Allers wurde der Stamm zur gleichen Zeit ebenfalls kloniert.

6 Reaktionstechnische Charakterisierung von *Haloferax volcanii* H1424 und H1895¹

Haloferax volcanii sollte mit dem korrespondierenden Plasmid pTA963 zur halophilen Genexpression, unter der Kontrolle des Promotors *p.tna*, verwendet werden (Allers, Ngo et al. 2004, Large, Stamme et al. 2007, Allers, Barak et al. 2010). Das Expressionssystem war bereits etabliert und in der Literatur publiziert (Allers, Ngo et al. 2004, Lestini, Laptенок et al. 2013, Liliensiek, Cassidy et al. 2013, Timpson, Liliensiek et al. 2013). Jedoch fehlte für hohe produzierte Proteinkonzentration eine hohe Biomassekonzentration von *Haloferax volcanii*. Bisherige, in der Literatur publizierte, Kultivierungen von *Haloferax volcanii* wurden nur im unkontrollierten Schüttelkolben durchgeführt, da aufgrund der Biofilmbildung von *Haloferax volcanii* bisher keine Kultivierung im kontrollierten Rührkesselreaktor durchgeführt werden konnte. Durch die Deletion der beiden Gene Hvo_1033 und Hvo_1034 in *Haloferax volcanii* H1424 konnte eine Deletionsstamm (H1895) hergestellt werden, der für die Kultivierung im Rührkesselreaktor verwendet werden kann (Strillinger, Grotzinger et al. 2015).

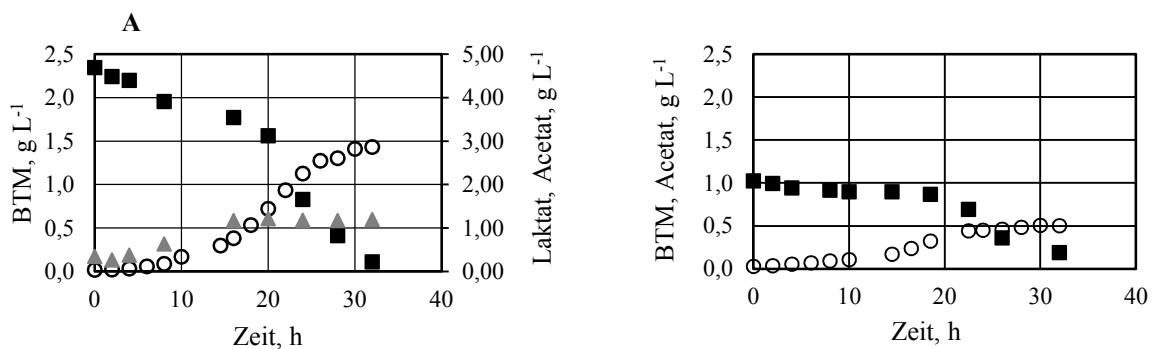
6.1 Minimalmedien

Die Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1424 im sterilen 500 mL Schüttelkolben und H1895 im 7,5 L Rührkesselreaktor erfolgte in den Minimalmedien Hv-Min und CDM. Falls nicht anders erwähnt erfolgten die durchgeführten Experimente im Schüttelkolben immer bei einer Temperatur von 45°C, bei 170 U min⁻¹ und bei pH 7,4. Die Satzverfahren im Rührkesselreaktor wurden bei 45°C, pH 7,4 einer Start-Rührgeschwindigkeit von 200 U min⁻¹ (0,005 W L⁻¹) sowie einer Begasungsrate von 2 vvm durchgeführt. Die angegebenen spezifischen Wachstumsraten wurden durch exponentielle Regression bestimmt. Die optische Dichte der Zellkultur wurde photometrisch bei 650 nm bestimmt.

¹Teile des Kapitels sind bereits publiziert in: Strillinger E, Grötzingler SW, Allers T, Groll M, Eppinger J, Weuster-Botz D (2016): Production of halophilic proteins with *Haloferax volcanii* H1895 in a stirred tank bioreactor. *App Microbiol Biotechnol* **100**: 1183–1195.

6.1.1 Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1424 im Schüttelkolben

Das Satzverfahren im sterilen Minimalmedium CDM (100 mL) erfolgte unter Verwendung folgender Kohlenstoffquellen: 0,5% (v/v) Laktat, 0,3% (w/v) Acetat, 0,3% (w/v) Glucose, 0,3% (v/v) Glycerin und 0,5% (w/v) Succinat. Der Gehalt der Substrate, sowie das gebildete Nebenprodukt Acetat im Medium wurden enzymatisch bestimmt. Der Kultivierungsverlauf für die einzelnen Substrate ist in Abbildung 6.1 dargestellt. Bei der Betrachtung der Wachstumskurven ist die Verzögerungsphase von 6 h bei der Verwendung von Laktat als Substrat am kürzesten. Anschließend ist eine lange exponentielle Wachstumsphase von etwa 10 h zu beobachten, die in einer finalen Biomassekonzentration von $1,5 \text{ g L}^{-1}$ resultiert. Die Wachstumsrate betrug hier $0,24 \text{ h}^{-1}$ (siehe Abbildung 6.1 A, Tabelle 6.1). Mit den Substraten Acetat, Glucose und Succinat wurde eine längere Verzögerungsphase von 8 – 10 h bestimmt. Für die Substrate Acetat und Glycerin konnte eine spezifische Wachstumsraten von $0,17 \text{ h}^{-1}$ und für das Substrate Glucose eine spezifische Wachstumsrate von $0,20 \text{ h}^{-1}$ beobachtet werden (siehe Abbildung 6.1 B, C, E). Mit den Substraten Acetat und Laktat konnte der höchste Biomassertragskoeffizient $Y_{X/S}$ von $0,37 \text{ g g}^{-1}$ erreicht werden (siehe Tabelle 6.1). Der niedrigste Biomassertragskoeffizient $Y_{X/S} = 0,15 \text{ g g}^{-1}$ wurde unter Einsatz von Glukose bestimmt. Bei der Satzkultivierung mit den Substraten Laktat, Glycerin, Succinat und Glukose konnte als Nebenprodukt Acetat detektiert werden. Die höchste, im Verlauf des Satzverfahrens bestimmte, Acetat Konzentration von $0,93 \text{ g L}^{-1}$ trat mit dem Substrat Laktat auf. Das entspricht einer Produktselektivität ($Y_{P/S}$) von $0,20 \text{ g g}^{-1}$. Gemessen an der zur Verfügung gestellten Substratmenge, wurde in Zusammenhang mit dem Substrat Glukose die höchste Nebenproduktbildung erreicht ($Y_{P/S} = 0,23 \text{ g g}^{-1}$).



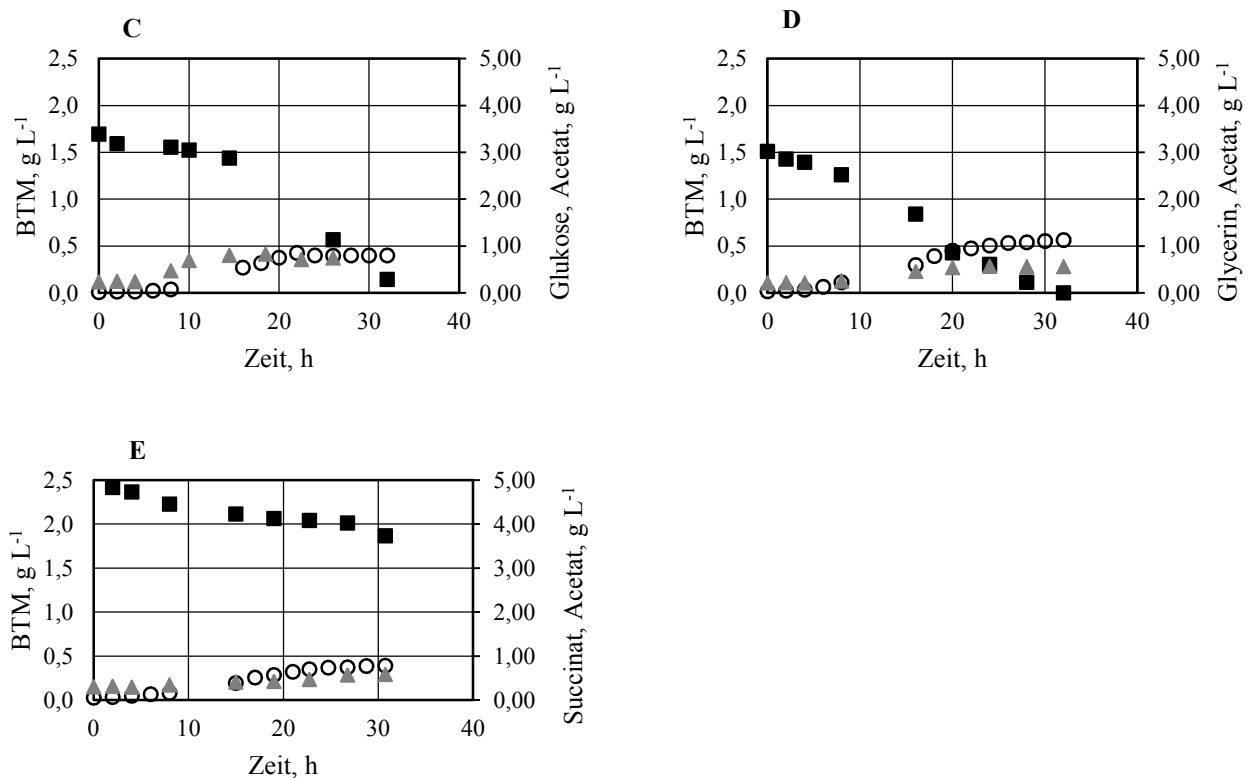


Abbildung 6.1: Satz kultivierung von *Haloferax volcanii* im sterilen 500 mL Schüttelkolben mit 100 mL definierten Medium CDM bei 45°C und 170 U min⁻¹. Es wurden die folgenden Kohlenstoffquellen verwendet: 0,5% (v/v) Laktat (A), 0,1% (w/v) Acetat (B), 0,3% (w/v) Glukose (C), 0,3% (v/v) Glycerin (D) und 0,5% (w/v) Succinat (E). In den Diagrammen ist jeweils der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (○), die Änderung des Substrats während der Kultivierung (■) und die Bildung des Nebenprodukts Acetat (▲) dargestellt.

Tabelle 6.1: Spezifische Wachstumsrate μ , ermittelt durch exponentielle Regression und die Biomasseertrags- bzw. Produktselektivitätskoeffizienten $Y_{X/S}$ & $Y_{P/S}$ für die Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1424 im Schüttelkolben in 100 mL CDM mit den in der Tabelle genannten Kohlenstoffquellen. Der Produktbildungskoeffizient $Y_{P/S}$ bezieht sich auf die Nebenproduktbildung von Acetat.

Kohlenstoffquelle	μ , h ⁻¹	$Y_{X/S}$, g g ⁻¹	$Y_{P/S}$, g g ⁻¹
0,5% (v/v) Laktat	0,24	0,37	0,20
0,1% (w/v) Acetat	0,17	0,37	-
0,3% (w/v) Glukose	0,20	0,15	0,23
0,3% (v/v) Glycerin	0,17	0,21	0,12
0,5% (w/v) Succinat	0,12	0,32	0,21

6.1.2 Satz kultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor

Die Satz kultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 erfolgte in 2 L sterilem definiertem Medium CDM mit 0,5% (v/v) Laktat als Substrat (siehe Abbildung 6.2). Die Temperatur wurde

konstant auf 45°C gehalten. Der pH konnte automatisch auf pH 7,5 geregelt werden. Der Sauerstoffpartialdruck pO_2 wurde durch die automatische Erhöhung der Rührerdrehzahl bei nicht limitierenden Werten gehalten ($pO_2 > 50\%$). Die Begasung des Reaktionsmediums erfolgte mit 2 vvm Luft. Im durchgeführten Versuch konnte nach 30 h eine Biotrockenmassekonzentration von 2,0 g L⁻¹ erreicht werden. Die, durch exponentielle Regression bestimmte, maximale Wachstumsrate von *Haloferax volcanii* H1895 betrug im definierten Medium CDM mit 0,5% (v/v) Laktat 0,30 h⁻¹. Das Substrat Laktat führte zu einem Biomassertragskoeffizient ($Y_{X/S}$) von 0,46 g g⁻¹. Als Nebenprodukt wurden während der Satzkultivierung 1,2 g L⁻¹ Acetat gebildet was einer Produktselektivität ($Y_{P/S}$) von 0,27 g g⁻¹ entspricht (siehe Abbildung 6.2).

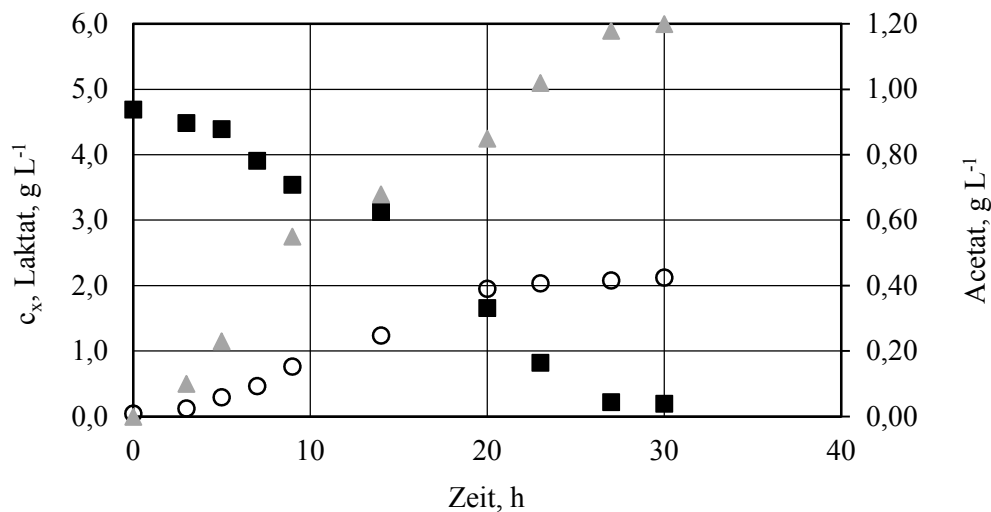


Abbildung 6.2: Satz Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor unter Verwendung von 2 L des definierten Mediums CDM mit 0,5% Laktat als Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung erfolgte bei 45°C, pH 7,5 und $pO_2 > 50\%$. Das Medium wurde mit 2 vvm Luft begast. Die Rührerdrehzahl wurde in einem Bereich von 200 – 600 U min⁻¹ variiert. Im Diagramm sind die Biotrockenmassekonzentration c_x (○), die Laktatkonzentration (■) und die Acetatkonzentration (▲) aufgetragen.

In einem weiteren Experiment wurde *Haloferax volcanii* H1895 unter Verwendung des definierten Mediums Hv-Min im Rührkesselreaktor im Satzverfahren bei 45°C, pH 7,5 und einer Begasung mit Luft von 2 vvm kultiviert. Der Sauerstoffpartialdruck pO_2 wurde bei nicht limitierenden Werten gehalten ($pO_2 > 50\%$). Um $pO_2 > 50\%$ während des Satzprozessen halten

zu können, wurde die Rührerdrehzahl automatisch erhöht. Als C-Quelle lag im definierten Medium Hv-Min eine Mischung aus $0,30 \text{ g L}^{-1}$ Glycerin, $4,0 \text{ g L}^{-1}$ Succinat und $3,0 \text{ g L}^{-1}$ Laktat vor. In Abbildung 6.3 sind die Ergebnisse der Satzkultivierung dargestellt. Nach 30 h konnte bei einer maximalen Wachstumsrate von $0,24 \text{ h}^{-1}$ eine Biomassekonzentration von $2,0 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden.

Wie in Abbildung 6.4 zu beobachten ist, wurden die drei Substrate in Hv-Min nacheinander aufgenommen. Glycerin wurde zu Beginn metabolisiert und nach 9 h Kultivierungszeit bereits aufgebraucht. Anschließend konnte eine Metabolisierung des Substrats Succinat beobachtet werden. Succinat war nach 22 Prozessstunden aufgebraucht. Eine signifikante Aufnahme von Laktat aus dem Medium durch *Haloferax volcanii* H1895 war erst nach 15 h zu beobachten. Am Ende der Satzkultivierung nach 30 h konnten noch $0,5 \text{ g L}^{-1}$ Laktat im Medium nachgewiesen werden.

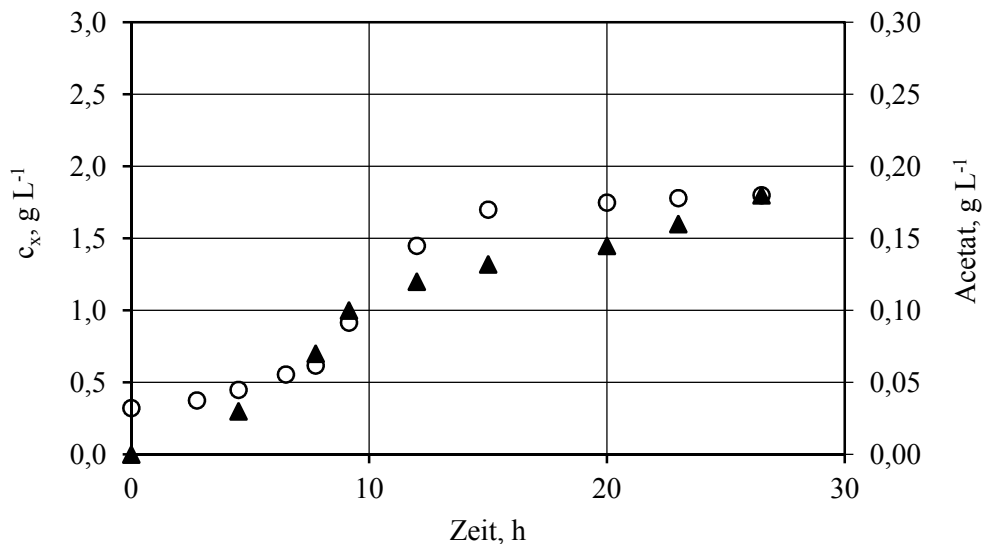


Abbildung 6.3: Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor unter Verwendung von 2 L des definierten Mediums Hv-Min. Die Kultivierung erfolgte bei 45°C , pH 7,5 und $p\text{O}_2 > 50\%$, bei einer Rührerdrehzahl von 200 – 600 U min^{-1} . Darstellung Biotrockenmassekonzentration (\circ) und die Acetatkonzentration (\blacktriangle) aufgetragen.

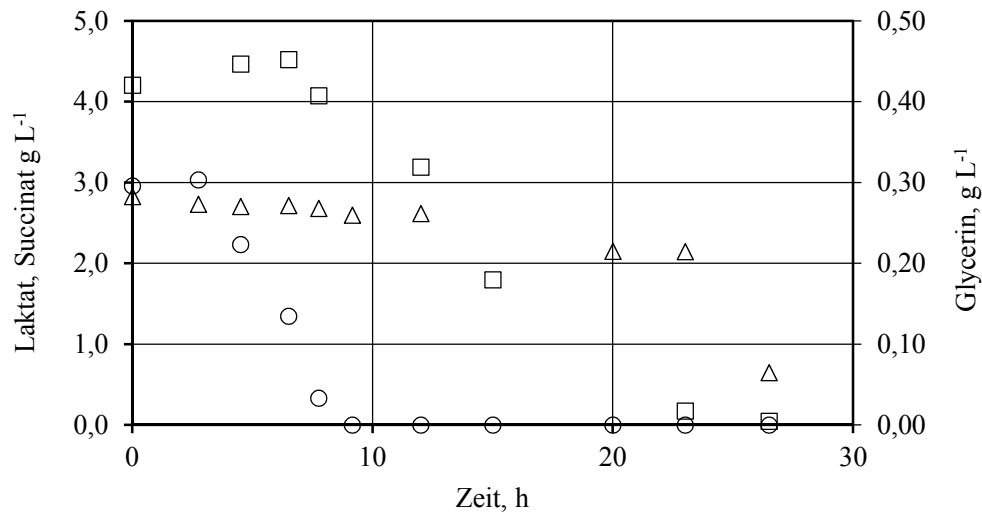


Abbildung 6.4: Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor unter Verwendung von 2 L des definierten Mediums Hv-Min. Die Kultivierung erfolgte bei 45°C, pH 7,5 und $pO_2 > 50\%$, bei einer Rührerdrehzahl von 200 – 600 U min⁻¹. Darstellung des Konzentrationsverlauf der Substrate Glycerin (o), Laktat (Δ) und Succinat (□).

6.2 Komplexmedium

6.2.1 Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1424 und H1895 im Schüttelkolben

Der Verlauf der Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1424 und H1895 in einem sterilem 500 mL Schüttelkolben in 100 mL sterilem Komplexmedium Hv-YPC-Medium ist in Abbildung 6.5 dargestellt. Mit beiden Stämmen wurde eine Biotrockenmassekonzentration von 2,0 g L⁻¹ erreicht. Die spezifische Wachstumsrate liegt bei 0,22 h⁻¹. Beide Wachstumskurven sind deckungsgleich.

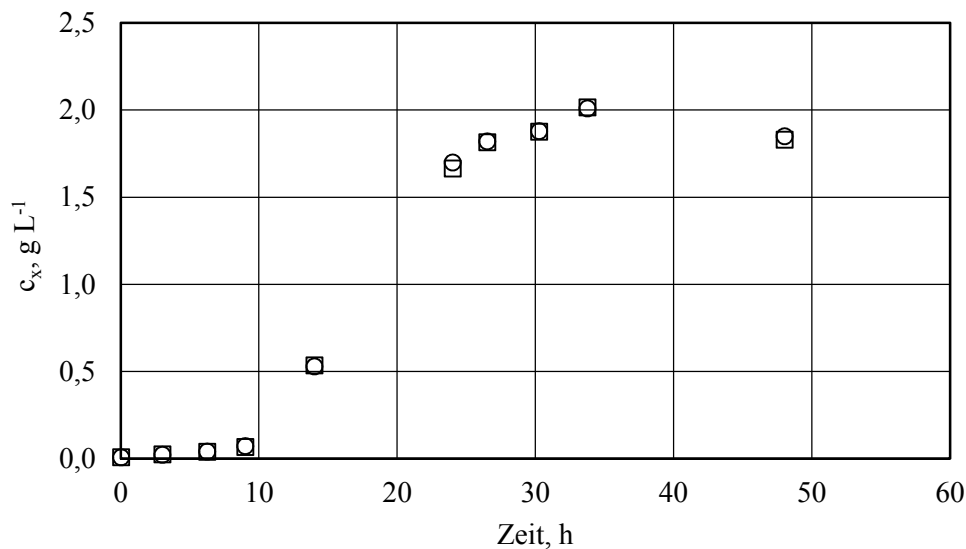


Abbildung 6.5: Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1424 (\circ) und H1895 (\square) in 100 mL sterilem Komplexmedium Hv-YPC in einem 500 mL Schüttelkolben bei 45°C, pH 7,5 und 170 U min⁻¹.

6.2.2 Satzverfahren zur Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor

Durch den verbesserten Sauerstoffeintrag und die pH Kontrolle konnte bei der Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 in Hv-YPC-Medium mit 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Thymidin im Rührkesselreaktor eine Biotrockenmassekonzentration von 3,5 g L^{-1} erreicht werden (siehe Abbildung 6.6). Die durch exponentielle Regression ermittelte spezifische Wachstumsrate betrug hier 0,26 h^{-1} . Des Weiteren wurde die Konzentration von Acetat bestimmt, das als Nebenprodukt im Satzverfahren gebildet wurde. Nach 18 h wurde eine maximale Acetatkonzentration von 0,12 g L^{-1} ermittelt. Anschließend konnte eine Metabolisierung des Acetats beobachtet werden, bis nach 38 h kein Acetat mehr im Medium nachgewiesen werden konnte.

Die durch Stoffwechselaktivität bedingte Abnahme der Gelöstsauerstoffkonzentration im Reaktionsmedium wurde durch die automatische Erhöhung der Rührerdrehzahl auf maximal 1000 U min⁻¹ (0,25 W L^{-1}) ausgeglichen.

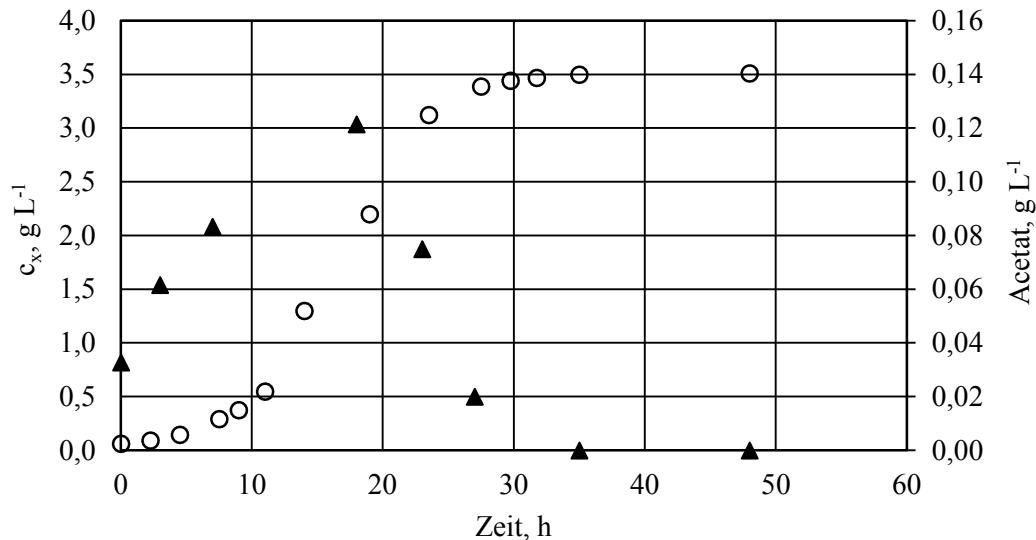


Abbildung 6.6: Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor in 2 L Hv-YPC mit $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ Thymidin bei 45°C , pH 7,5, $200 - 1000 \text{ U min}^{-1}$ und $p\text{O}_2 > 50\%$ sowie einer Begasung von 2 vvm Luft. Es ist die Biotrockenmassekonzentration (○) und die Acetatkonzentration (▲) dargestellt.

6.3 Variation der Medienbestandteile

In den durchgeführten Satzprozessen mit *Haloferax volcanii* im Schüttelkolben und im Rührkesselreaktor konnte eine Biotrockenmassekonzentration von maximal $2,0 \text{ g L}^{-1}$ im definierten Medium beziehungsweise $3,5 \text{ g L}^{-1}$ im Komplexmedium erreicht werden. Im Hinblick auf eine ausreichende hergestellte Proteinkonzentration sollte die Zellkonzentration im Satzverfahren erhöht werden. Um Limitierungen ausschließen zu können, wurde der Einfluss der einzelnen Medienbestandteile im Komplexmedium Hv-YPC untersucht. Des Weiteren wurde die Auswirkung einzelner Kohlenstoffquellen wie Laktat, Pyruvat und Acetat auf das Wachstum untersucht. Die Salzzusammensetzung des Toten Meeres, dem natürlichen Habitat von *Haloferax volcanii* (Mullakhanbhai and Larsen 1975) ist mit 50% (w/w) MgCl_2 , 14,4% (w/w) CaCl_2 , 30,4% (w/w) NaCl und 4,4% (w/w) KCl (Ma'or, Henis et al. 2006) deutlich unterschiedliche zur Salzzusammensetzung im Komplexmedium Hv-YPC (86,1% (w/w) NaCl , 2,5% (w/w) KCl , 0,2% (w/w) CaCl_2 , 5,1% (w/w) MgCl_2 , 6% (w/w) MgSO_4). Um einen möglichen Einfluss der Salzzusammensetzung untersuchen zu können, wurde die MgCl_2 sowie die KCl Konzentration im Komplexmedium Hv-YPC variiert. Des Weiteren zeichnet sich das Tote Meer durch eine höhere Salinität aus (28% (w/w)) als es im Komplexmedium Hv-YPC

vorhanden ist (18% (w/w)). Daher wurden Satzverfahren zur Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 in Hv-YPC mit 18% (w/w), 28% (w/w) und 30% (w/w) Salinität durchgeführt.

6.3.1 Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen

Zu 2 L Komplexmedium Hv-YPC mit $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ Thymidin wurden 0,5% (w/v) Pyruvat, 0,5% (v/v) Laktat oder 0,3% (w/v) Acetat zugegeben. Die Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 erfolgte im Satzverfahren im 7,5 L Rührkesselreaktor. Mit allen zugegebenen Kohlenstoffquellen konnte die Biomassekonzentration gesteigert werden. Die Zugabe von 0,3% (w/v) Acetat und 0,5% (w/v) Pyruvat führte zu einer Biotrockenmassekonzentration von 6,0 beziehungsweise 5,8 g L^{-1} (Abbildung 6.7). Den größten Einfluss dabei zeigten 0,5% (v/v) Laktat. Durch Einsatz dieses Substrats war eine Steigerung um 40% auf $7,0 \text{ g L}^{-1}$ Biomasse möglich.

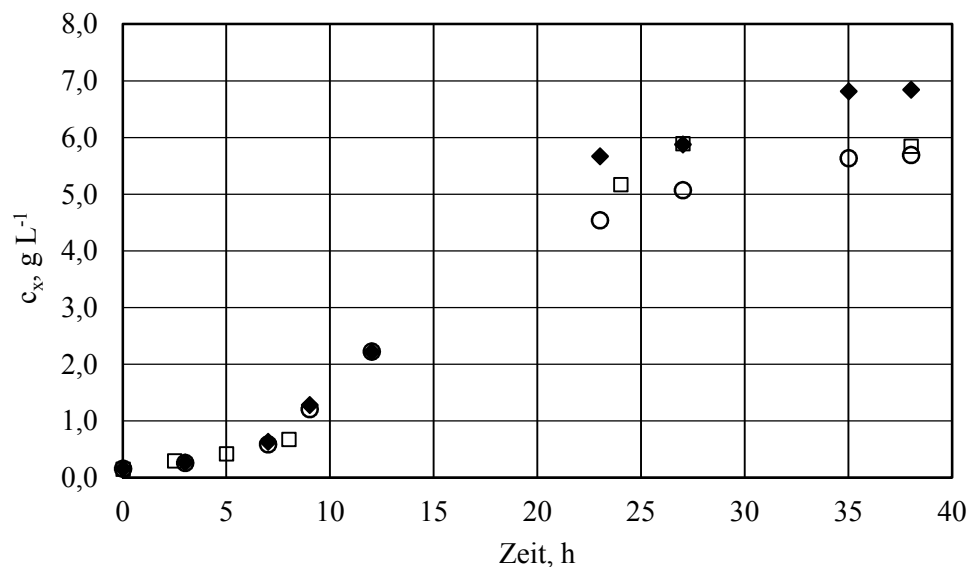


Abbildung 6.7: Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Satzverfahren im Rührkesselreaktor in 2 L Hv-YPC-Medium mit $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ Thymidin bei 45°C , pH 7,5, 200 - 1000 U min^{-1} und $p\text{O}_2 > 50\%$ sowie einer Begasung von 2 vvm Luft. Zum Hv-YPC-Medium wurde $5,0 \text{ g L}^{-1}$ Laktat (\blacklozenge) $0,1 \text{ g L}^{-1}$ Acetat (\square) oder $5,0 \text{ g L}^{-1}$ Pyruvat (\circ) hinzugegeben.

6.3.2 Erhöhung der Komplexbestandteile

Im verwendeten Komplexmedium Hv-YPC befinden sich $5,0 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt, $1,0 \text{ g L}^{-1}$ Pepton und $1,0 \text{ g L}^{-1}$ Casaminsäure. Durch Vorversuche in Schüttelkolben konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung von Pepton keine Auswirkungen auf das Wachstum hatte, jedoch zeigte die Erhöhung von Hefeextrakt und Casaminsäure eine deutliche Verbesserung der Biotrockenmasseausbeute. Im $7,5 \text{ L}$ Rührkesselreaktor wurde eine Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 in 2 L sterilem Hv-YPC mit der doppelten ($10,0 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt, $2,0 \text{ g L}^{-1}$ Casaminsäure), dreifachen ($15,0 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt, $3,0 \text{ g L}^{-1}$ Casaminsäure) und vierfachen Menge ($20,0 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt, $4,0 \text{ g L}^{-1}$ Casaminsäure) der beiden Komplexbestandteile durchgeführt (siehe Abbildung 6.8). Durch die Verdreifachung der Menge an Hefeextrakt und Casaminsäure im Hv-YPC-Medium konnte die Biotrockenmassekonzentration auf $6,8 \text{ g L}^{-1}$ gesteigert werden. Durch die Zugabe von $5,0 \text{ mM}$ NH_4Cl als zusätzliche, schnell verfügbare Stickstoffquelle und $2,0 \text{ mM}$ Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 als weitere Phosphatquelle zum Komplexmedium Hv-YPC konnte eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $7,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden (siehe Abbildung 6.9).

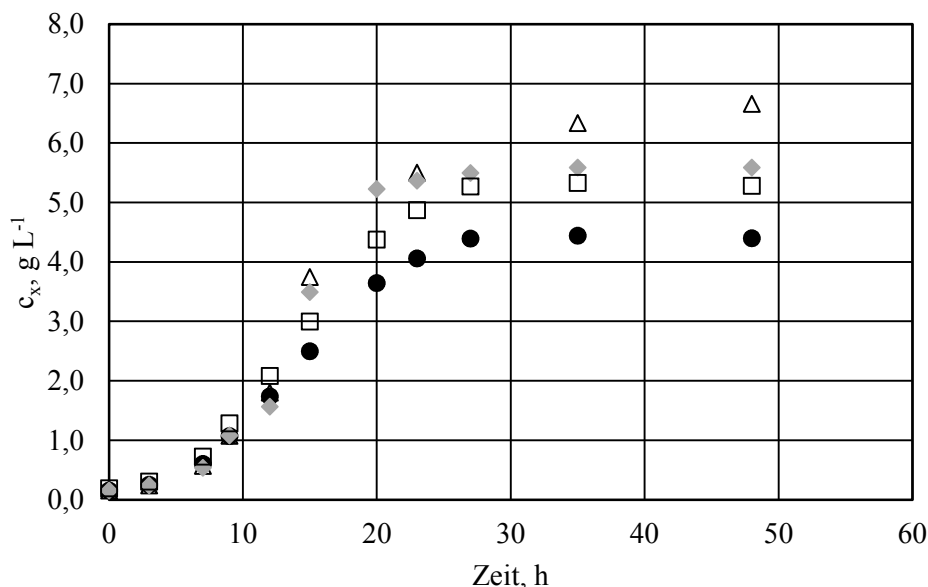


Abbildung 6.8: Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor in 2 L Hv-YPC bei 45°C , pH 7,4, einer Begasung von 2 vvm und 200 U min^{-1} (●). Erhöhung der Komplexbestandteile in Hv-YPC: 10 g L^{-1} Hefeextrakt, 2 g L^{-1} Casaminsäure (◆), 15 g L^{-1} Hefeextrakt, 3 g L^{-1} Casaminsäure (Δ) und 20 g L^{-1} Hefeextrakt, 4 g L^{-1} Casaminsäure (□). Diagramm

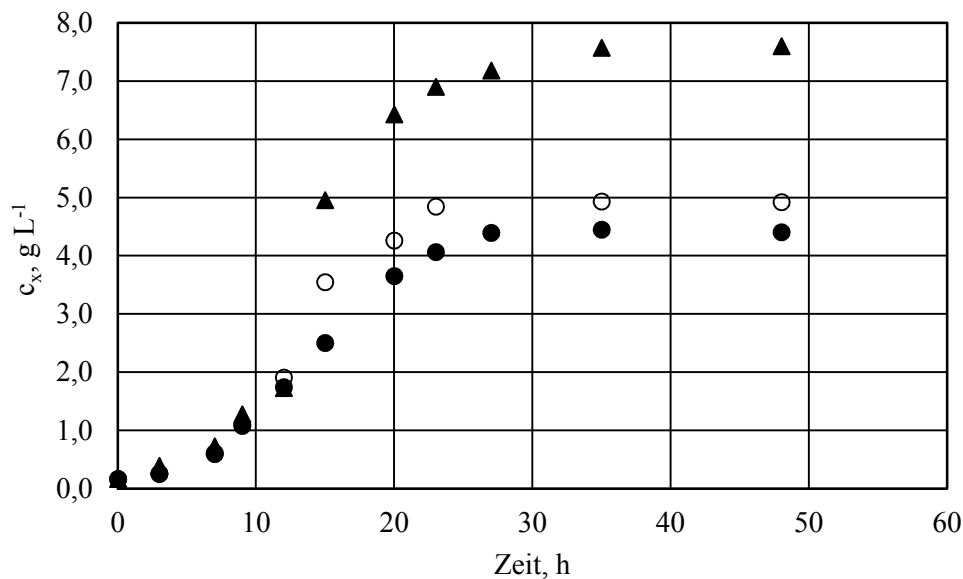


Abbildung 6.9: Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor in 2 L Hv-YPC-Medium bei 45°C, pH 7,4, einer Begasung von 2 vvm und 200 – 1000 U min⁻¹ (●). Zugabe zum Medium: 2 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 und 5 mM NH₄Cl (○), 2 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 und 5 mM NH₄Cl mit 15 g L⁻¹ Hefeextrakt, 3 g L⁻¹ Casaminosäure (▲).

Aufgrund der höheren Biomassekonzentration wurde *Haloferax volcanii* H1895 in folgenden Satzverfahren im Medium Hv-YPC angereichert mit 5,0 g L⁻¹ Laktat, 2,0 mM NH₄Cl, 5,0 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,5, 15,0 g L⁻¹ Hefeextrakt und 3,0 g L⁻¹ Casaminosäure im Rührkesselreaktor kultiviert. So konnte eine maximale Biotrockenmasse von 10,5 g L⁻¹ erreicht werden. Dies entspricht einer Steigerung der vormaligen Biotrockenmasse von 4,0 g L⁻¹ im Komplexmedium Hv-YPC um einen Faktor 2,5. Im Folgenden wird diese Medienzusammensetzung als *angereichertes Hv-YPC-Medium* bezeichnet. Das Ergebnis der Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 in Hv-YPC mit den oben genannten Zusätzen ist in Abbildung 6.10 dargestellt. Das zugegebene Laktat wird während der Kultivierung nicht vollständig aufgebraucht. Nach 35 h verbleiben 0,85 g L⁻¹ im Medium.

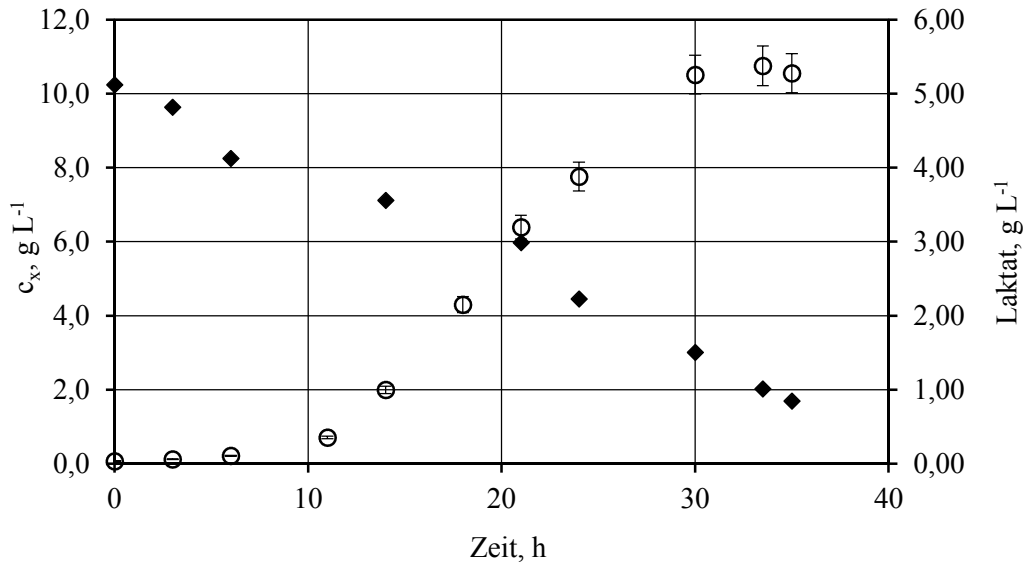


Abbildung 6.10: Satz kultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor in 2 L Hv-YPC mit $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ Thymidin bei 45°C , pH 7,5, 200 - 1000 U min^{-1} , Begasung 2 vvm und $\text{pO}_2 > 50\%$. Darstellung der Biomassekonzentration (○). Zu Hv-YPC wurde $5,0 \text{ g L}^{-1}$ Laktat (◆), $2,0 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$, $5,0 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,5 hinzugegeben. Das Komplexmedium enthielt zudem $15,0 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt und $3,0 \text{ g L}^{-1}$ Casaminoäure

Um weitere Limitierungen ausschließen zu können, die zum Erreichen des Stationärenzustands führen und um somit eine Erhöhung der Biotrockenmassekonzentration von *Haloferax volcanii* H1895 zu erreichen, wurden die Aminosäuren, gruppiert nach ihrer Synthese im Stoffwechsel, die DNS Basen Adenin, Guanin, Uracil und Cytosin sowie einzelne B-Vitamine (Pantothensäure, Biotin und Thiamin) dem optimierten Komplexmedium Hv-YPC zugegeben. Als Kontrolle wurde eine Satz kultivierung im optimierten Hv-YPC ohne weitere Komponenten verwendet. Die Untersuchung des Einflusses der Komponenten erfolgte im parallelen Bioreaktorblock. Eine weitere Steigerung der Biotrockenmassekonzentration war gegenüber der Kontrolle im Satzverfahren nicht mehr möglich (siehe Abbildung 6.11).

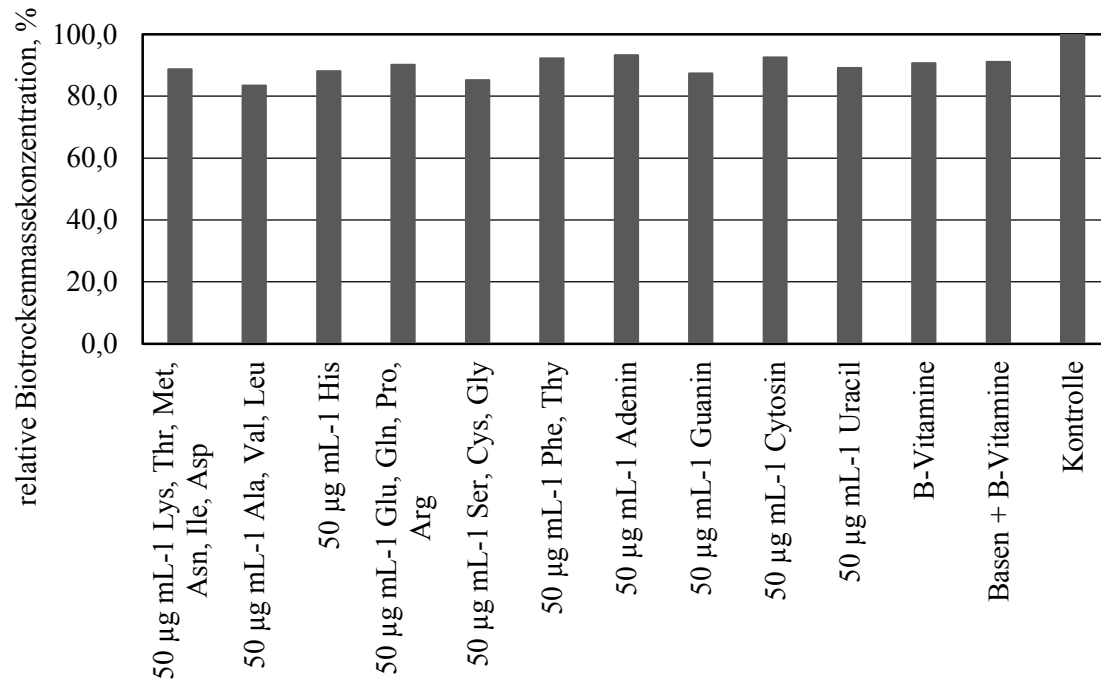


Abbildung 6.11: relative Biotrockenmassekonzentration einer Satzkkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im parallelen Bioreaktorblock (bioREAKTOR48) unter Zugabe verschiedener Zusätze an Aminosäuren, Nukleotidbasen und B-Vitaminen bei 45°C, pH 7,5, 2500 U min⁻¹, Begasungsrate: 0,1 L min⁻¹ in 13 mL angereichertem Hv-YPC-Medium.

6.3.3 Salzzusammensetzung im Kultivierungsmedium

Die im Toten Meer vorliegenden MgCl₂ Konzentration (50% (w/w)) weicht stark von der in Hv-YPC-Medium vorliegenden Konzentration ab (9,9% (w/w)). KCl wird von *Haloferax volcanii* intrazellulär gespeichert, um dem osmotischen Druck standzuhalten. Aufgrund des möglichen Einflusses dieser beiden Komponenten wurde im Komplexmedium Hv-YPC die MgCl₂ und KCl Konzentrationen in einem Bereich von 0,088 – 0,40 M (9,9 – 47,0% (w/w)) beziehungsweise von 0,055 – 0,50 M (2,3 – 12,2% (w/w)) variiert. Durch die entsprechende Verringerung der NaCl Konzentration im Hv-YPC-Medium blieb die Salinität bei 18% (w/w). In Abbildung 6.12 ist das Ergebnis in einem Blasendiagramm gezeigt. Je größer die Blase, desto höher ist die erreichte Biotrockenmasse. Die höchste Biotrockenmassekonzentration von 7,3 g L⁻¹ wurde bei der ursprünglichen MgCl₂ und KCl Konzentrationen (0,088 M und 0,055 M) erhalten. Durch eine Erhöhung der MgCl₂ und KCl Konzentrationen, bei gleichbleibender Salinität, war eine stetige Verringerung der Biotrockenmassekonzentration bis zu 30% auf 5,2 g L⁻¹ (0,3 M MgCl₂ und 0,48 M KCl) zu beobachten.

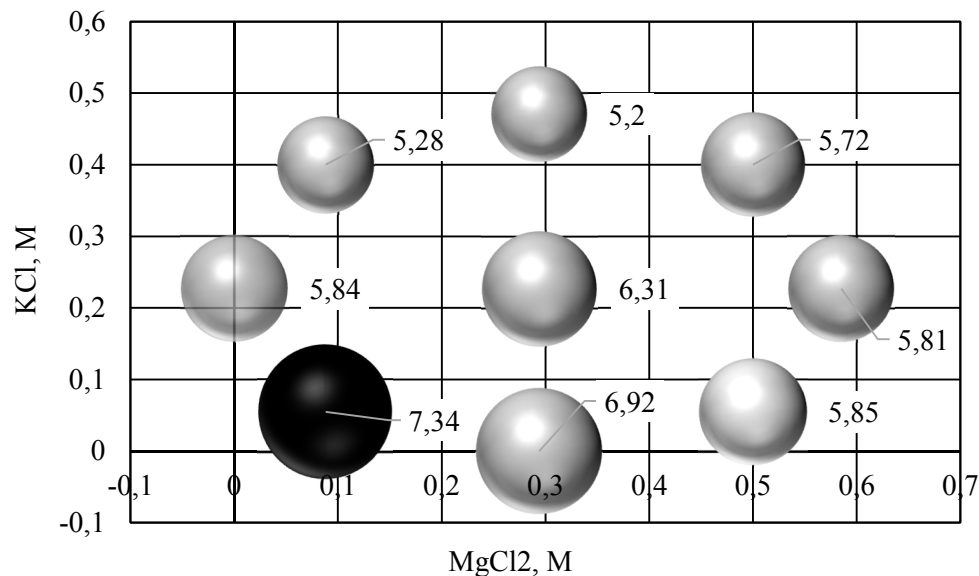


Abbildung 6.12: Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im parallelen Bioreaktorblock (bioREAKTOR48) bei 45°C, 2500 U min⁻¹, pH 7,5 und einer Begasungsrate von 0,1 L min⁻¹. Die MgCl₂ sowie die KCl Konzentration wurden im Hv-YPC-Medium in einem Bereich von 0,088 – 0,4 M beziehungsweise von 0,055 – 0,5 M variiert. Die schwarze Blase zeigt die ursprüngliche MgCl₂ und KCl (0,088 M und 0,055 M) Konzentration in Hv-YPC-Medium. Die Datenbeschriftung zeigt die resultierende Biotrockenmassekonzentration in g L⁻¹.

Da die Salinität im Toten Meer bei 28% (w/v) und nicht wie in Hv-YPC bei 18% (w/v) vorliegt, wurde in einem weiteren Experiment die Gesamt-Salzkonzentration variiert, sodass vier verschiedene Hv-YPC Medien mit einer Salinität von 10, 18, 28 und 30% (w/v) entstanden. Die Änderung der Salinität von ursprünglich 18% (w/v) auf 10 bzw. 30% (w/v) im Komplexmedium Hv-YPC führte zu einer Verschlechterung des Wachstums, trotzdem wurde noch eine Biotrockenmassekonzentration von 4,0 - 4,9 g L⁻¹ erhalten. Entsprechend der Salinität im Hv-YPC Medium dem des Toten Meers (28% (w/v) Salinität) lag die maximal erreichte Biotrockenmassekonzentration bei 5,5 g L⁻¹ (siehe Abbildung 6.13).

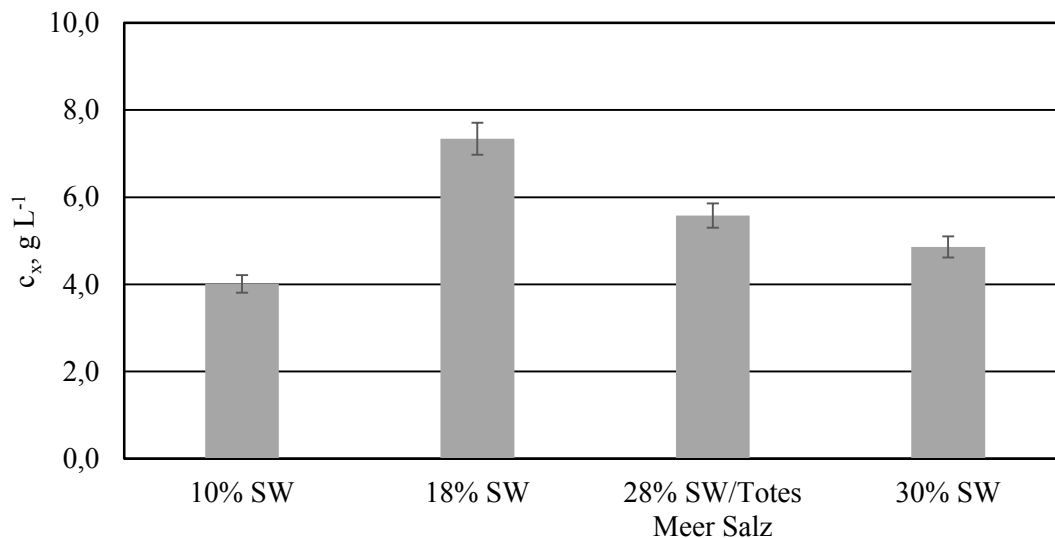


Abbildung 6.13: Einfluss der Salinität auf das Wachstum von *Haloferax volcanii* H1895. Die Satzkultivierungen erfolgten im Bioreaktorblock (bioREAKTOR48) bei 45°C, 2500 U min⁻¹, pH 7,5 und einer Begasungsrate von 0,1 L min⁻¹ bei verschiedenen Salzwasserkonzentrationen (SW) im Komplexmedium Hv-YPC: 10%, 18% und 30%. Das Tote Meer Salz weist folgende Zusammensetzung auf: 50% MgCl₂, 14,4% CaCl₂, 30,4% NaCl und 4,4% KCl. Die Zusammensetzung der Komplexbestandteile in diesem Medium entsprach dem des Hv-YPC Mediums.

6.4 Zellrückhaltung

Haloferax volcanii H1895 wurde im 7,5 L Rührkesselreaktor unter Verwendung von 2 L angereichertem Hv-YPC Mediums kultiviert. Nach 8 h wurde der kontinuierliche Medienaustausch mit vollständiger Zellrückhaltung gestartet. Bei einer Medienaustauschrates von 0,1 h⁻¹ konnte eine maximale Biotrockenmassekonzentration von 21,7 g L⁻¹ erreicht werden. Durch die Verlangsamung des Medienaustausches auf 0,075 L⁻¹ sinkt die maximale Biotrockenmassekonzentration auf 13,1 g L⁻¹ (siehe Abbildung 6.14). Durch den langsameren Medienaustausch reichert sich Acetat bei einer Konzentration von 0,12 g L⁻¹ im Medium an, wohingegen sich bei einer Austauschrate von 0,1 h⁻¹ kein Acetat im Medium anreichert (siehe Abbildung 6.15).

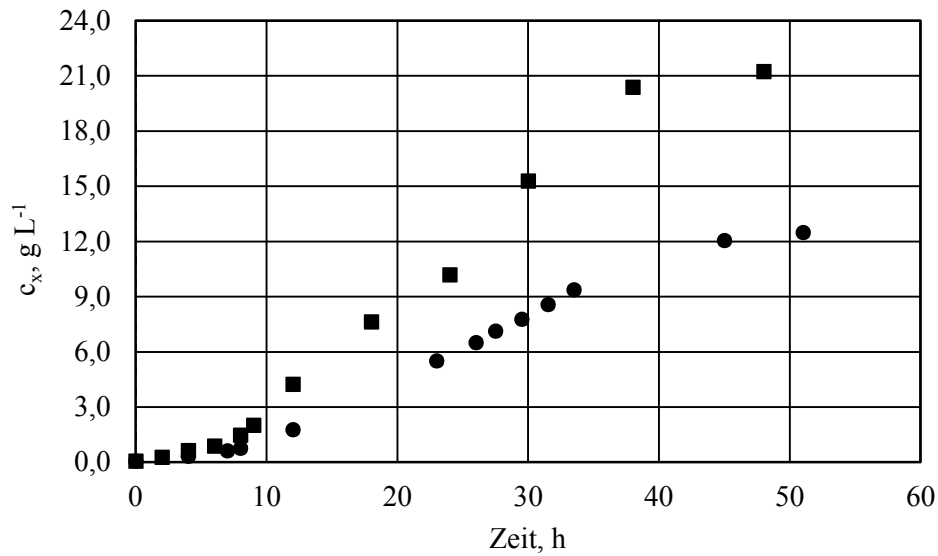


Abbildung 6.14: Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Membranreaktor im angereicherten Hv-YPC Medium mit kontinuierlichem Medien austausch und vollständiger Zellerückhaltung. Darstellung der Biotrockenmasskonzentration für eine Medien austauschrate von $0,1 \text{ h}^{-1}$ (■) und $0,075 \text{ h}^{-1}$ (●).

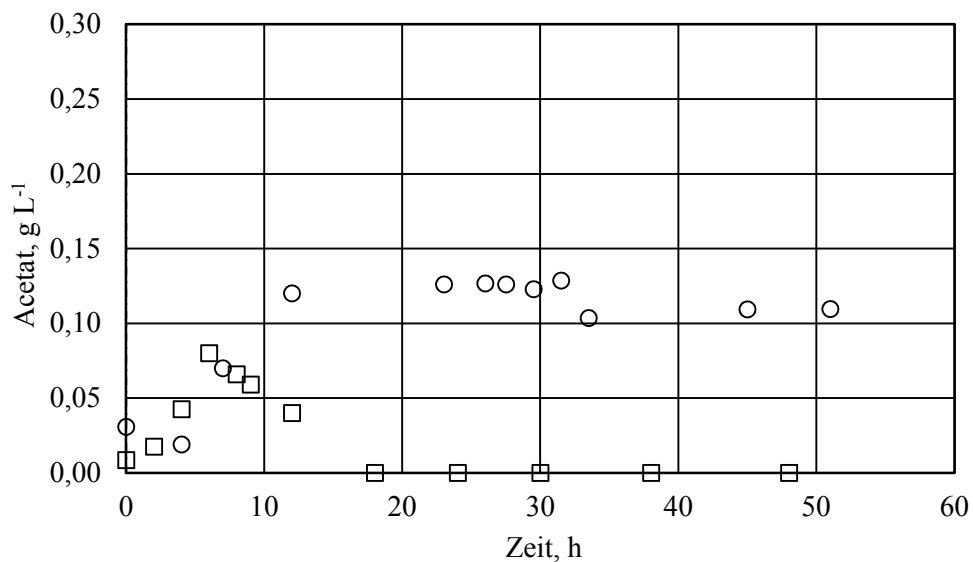


Abbildung 6.15: Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Membranreaktor im angereicherten Hv-YPC Medium mit kontinuierlichem Medien austausch und vollständiger Zellerückhaltung. Darstellung der Konzentration des gebildeten Acetats bei $0,1 \text{ h}^{-1}$ (□) und $0,075 \text{ h}^{-1}$ (○).

6.5 Diskussion

Kultivierung im Schüttelkolben

Die Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1424 im Schüttelkolben führte im Komplexmedium Hv-YPC zu einer maximalen Biotrockenmassekonzentration von $2,0 \text{ g L}^{-1}$. Im Minimalmedium CDM konnte maximal nur eine Biomassekonzentration von $1,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden. Wurde dem Minimalmedium 0,5% (v/v) Laktat beziehungsweise 0,1% (w/v) Acetat als Kohlenstoffquelle zugegeben konnte ein Biomassertragskoeffizient von $0,37 \text{ g g}^{-1}$ erreicht werden. Mit Acetat als Substrat im Minimalmedium CDM konnte jedoch nur eine spezifische Wachstumsrate von $0,17 \text{ h}^{-1}$ erreicht werden, hingegen konnte mit Laktat eine Wachstumsrate von $0,24 \text{ h}^{-1}$ realisiert werden. Darüber hinaus zeigte die Satzkultivierung mit Laktat eine kürzere Verzögerungsphase (5 h) als in Verbindung mit dem Substrat Acetat beobachtet werden konnte (10 h). Acetat wird, wenn es als Substrat gegeben wird, über den Glyoxylatzyklus metabolisiert. Dies könnte ein Grund für die längere Verzögerungsphase bei einer Kultivierung im Schüttelkolben gewesen sein, da die benötigten Enzyme zum Metabolismus des Substrats erst in *Haloferax volcanii* exprimiert werden mussten (Falb, Muller et al. 2008). Obwohl es sich bei den Substraten Glycerin und Succinat um natürliche Substrate von *Haloferax volcanii* handelt (Oren and Gurevich 1995), zeigte sich im definierten Medium CDM geringe spezifische Wachstumsraten und Biomassertragskoeffizienten von $0,12 \text{ h}^{-1}$ und $0,32 \text{ g g}^{-1}$ (Succinat) sowie $0,17 \text{ h}^{-1}$ und $0,21 \text{ g g}^{-1}$ (Glycerin). Diese Erkenntnisse decken sich auch mit den in der Literatur publizierten Daten. Kauri et al. (1990) kultivierten *Haloferax volcanii* ebenfalls in CDM mit verschiedenen Konzentrationen an Laktat, Acetat, Glycerin, Glucose und Succinat. Mit 0,5% (v/v) Laktat im Minimalmedium CDM konnte im Satzverfahren die höchste Biotrockenmassekonzentration ($1,2 \text{ g L}^{-1}$) erreicht werden. Hingegen wurde bei den Satzkultivierungen mit den anderen Substraten eine Biotrockenmassekonzentration im Bereich von $0,48 \text{ g L}^{-1}$ (0,3% (w/v) Glucose) bis $0,67 \text{ g L}^{-1}$ (0,3% (v/v) Glycerin) erreicht (Kauri, Wallace et al. 1990). Eine Kultivierung von *Haloferax volcanii* im Komplexmedium Hv-YPC wurde bisher in der Literatur nicht charakterisiert. Die Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1424 und H1895 im Schüttelkolben im Komplexmedium Hv-YPC offenbarte eine Biotrockenmassekonzentration von $2,0 \text{ g L}^{-1}$. Aufgrund des identischen Wachstums von *Haloferax volcanii* H1424 und H1895, konnte die getroffene Arbeitshypothese, dass die Gendelektion keinen Einfluss auf die Biomassebildung ausübt, bestätigt werden. Somit könne

auch Vergleiche zwischen der Satzkultivierung von H1424 im Schüttelkolben und der Satzkultivierung von H1895 im Rührkesselreaktor gezogen werden.

Satzverfahren im Rührkesselreaktor

Im Komplexmedium Hv-YPC konnte eine Biotrockenmassekonzentration von $3,5 \text{ g L}^{-1}$ bei einer maximalen Nebenproduktbildung von $0,12 \text{ g L}^{-1}$ Acetat erreicht werden. Hingegen zeigte die Satzkultivierung in den Minimalmedien Hv-Min mit $0,3 \text{ g L}^{-1}$ Glycerin, $4,0 \text{ g L}^{-1}$ Succinat und $3,0 \text{ g L}^{-1}$ Laktat als Kohlenstoffquelle oder CDM mit $0,5\%$ (v/v) Laktat eine Biotrockenmassekonzentration von $1,8 \text{ g L}^{-1}$ - $2,0 \text{ g L}^{-1}$. In beiden Satzprozessen wurde Acetat als Nebenprodukt gebildet. Im Medium CDM zeigten sich $1,0 \text{ g L}^{-1}$ und im Medium Hv-Min $0,12 \text{ g L}^{-1}$ Acetat. Gegenüber der Satzkultivierung im Schüttelkolben entspricht das einer Verdopplung der Biotrockenmassekonzentration in den definierten Medien. Bei der Satzkultivierung im Rührkesselreaktor unter Verwendung des Komplexmediums Hv-YPC konnte eine Steigerung der Biomassekonzentration um den Faktor 1,8 erreicht werden. Gründe für die höhere Biomassekonzentration im Rührkesselreaktor können in den Nachteilen einer Satzkultivierung im Schüttelkolben begründet sein. Die Satzkultivierungen von *Haloferax volcanii* bei wachsender Zellkonzentration im Schüttelkolben könnte sauerstofflimitiert gewesen sein. Aufgrund der hohen Salinität und der hohen Temperaturen von 45°C kann nur noch eine maximale Sauerstoffkonzentration von 4 mg L^{-1} im Medium gelöst werden (Schneegurt 2012). Aufgrund der Sekretion von Acetat ins Medium verschiebt sich der pH aus dem optimalen, neutralen Bereich in einen wachstumshemmenden sauren Bereich. Durch das Satzverfahren im Rührkesselreaktor kann einerseits durch eine Begasung mit Luft Sauerstoff in das Medium eingetragen werden. Des Weiteren kann der pH kontrolliert und geregelt werden. Somit können die höheren Biotrockenmassekonzentrationen in den definierten Medien und im Komplexmedium im Rührkesselreaktor erklärt werden. Da das Ziel eine hohe Biotrockenmassekonzentration war, um eine hohe Proteinkonzentration realisieren zu können, wurden die Minimalmedien als ungeeignet bewertet. Aufgrund möglicher Limitierungen und der übermäßigen Acetatproduktion konnten keine ausreichenden Biotrockenmassekonzentrationen erreicht werden.

Acetatproduktion

Acetat kann als Nebenprodukt eines Überschussmetabolismus mit Hilfe einer Acetyl-CoA Synthetase aus Acetyl-CoA gebildet werden (Bräsen and Schönheit 2001, Zaigler, Schuster et al. 2003, Wolfe 2005). Die Bildung von Acetat ist dabei, nach den Ergebnissen zu urteilen, abhängig vom Medium und der gewählten Kohlenstoffquelle. So wurden im definierten Medium CDM mit 0,5% (v/v) Laktat oder 0,3% (w/v) Glukose $1,2 \text{ g L}^{-1}$ Acetat gebildet, im definierten Medium Hv-Min oder im Komplexmedium Hv-YPC wurden hingegen $0,12 \text{ g L}^{-1}$ Acetat gemessen. Unter Verwendung von Glycerin und Succinat als Substrate in CDM wurde eine Acetat Konzentration von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ im Medium gemessen. Hingegen konnte keine Unterschiede der Acetatbildung bei Satzkultivierungen im Schüttelkolben oder im Rührkesselreaktor beobachtet werden. Die Menge an gebildeten Acetat im definierten Medium CDM mit 0,5% (v/v) Laktat ist im Schüttelkolben und im Rührkesselreaktor gleich. Dies lässt den Schluss zu, dass limitierende Bedingungen im Schüttelkolben nicht zu einer höheren Nebenproduktbildung führen. Jedoch zeigte sich im Rührkesselreaktor der, auch in der Literatur beschriebene, Katabolismus von Acetat in der stationären Phase zur Bereitstellung von Acetyl-CoA (Wolfe 2005). Bei der Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* im Komplexmedium Hv-YPC wurden die gebildeten $0,12 \text{ g L}^{-1}$ Acetat vollständig metabolisiert. Eine Metabolisierung des Acetats in Schüttelkolbenversuchen konnte hingegen nicht beobachtet werden. Eine detaillierte Untersuchung des Einflusses von Acetat auf das Wachstum von *Haloferax volcanii* wurde noch nicht durchgeführt. Nach Wolfe (2005) ist jedoch eine negative Auswirkung auf das Wachstum nicht ausgeschlossen. So wurde bei der Satzkultivierung mit kontinuierlichen Medienaustausch bis zum Beginn des Medienaustausches $0,08 \text{ g L}^{-1}$ Acetat im Medium nachgewiesen. Im folgenden Prozessverlauf konnte kein Acetat mehr im Medium gemessen werden, da es entweder aus dem Reaktor ausgetragen oder in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze vorlag.

Variation der Medienbestandteile

Ausgehend von der erreichten Biotrockenmassekonzentration von $3,5 \text{ g L}^{-1}$ im Komplexmedium Hv-YPC wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, um die Biotrockenmassekonzentrationen noch steigern zu können. Im Angleich an das Medium von Sehgal and Gibson (1960), das $10,0 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt und $7,5 \text{ g L}^{-1}$ Casamminosäure (Sehgal

and Gibson 1960) aufweist, wurde, um Limitierungen ausschließen zu können, die Menge der Komplexbestandteile Hefeextrakt und Casaminsäure ebenfalls angehoben. Die höchste Biomassekonzentration wurde bei $15,0 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt und $3,0 \text{ g L}^{-1}$ Casaminsäure bestimmt. *Haloferax volcanii* weist, mit etwa 18 Genomkopien während der exponentiellen Wachstumsphase, ein polyploides Genom auf (Breuert, Allers et al. 2006). Dadurch entsteht ein hoher Bedarf an Stickstoff und Phosphat. Somit konnte durch die Zugabe der zusätzlichen Ammoniumquelle NH_4Cl ($5,0 \text{ mM}$) und der Phosphatquelle Kaliumphosphatpuffer ($2,0 \text{ mM}$) (Forsynth and Kushner 1970, Kauri, Wallace et al. 1990) eine Steigerung der Biomassekonzentration erreicht werden. Da Laktat in den definierten Medium CDM zu höheren Biotrockenmassekonzentrationen geführt hat, wurde dem Komplexmedium ebenfalls $0,5\%$ (v/v) Laktat hinzugegeben. Durch die genannten Veränderungen konnte eine Steigerung der Biotrockenmassekonzentration auf $10,5 \text{ g L}^{-1}$ im Satzverfahren erreicht werden. Das entspricht einer Steigerung um den Faktor 2,5 zu der vorher beobachteten Biotrockenmassenkonzentration von $4,0 \text{ g L}^{-1}$. Jedoch konnte im Reaktor nach 16 – 20 h ein Stagnieren der Biomassebildung beobachtet werden. Da von den zum Medium Hv-YPC zugegebenen $5,0 \text{ g L}^{-1}$ Laktat eine restliche Menge von $1,0 \text{ g L}^{-1}$ im Medium verblieb, kann keine Limitierung der Kohlenstoffquelle für eine Stagnation des Wachstums verantwortlich sein. Auch hatte die Zugabe verschiedener B-Vitamine, Aminosäuren und Nukleotidbasen keinen Einfluss auf das Wachstum. Damit kann eine Limitierung des Wachstums von *Haloferax volcanii* im Komplexmedium Hv-YPC ausgeschlossen werden. Unter Annahme eines Kohlenstoffgehalts von 45% in der Biomasse und in den Komplexbestandteilen sowie unter Berücksichtigung des gebildeten Acetats von $0,12 \text{ g L}^{-1}$ und des gebildeten CO_2 von $15,4 \text{ g L}^{-1}$ wurde eine Kohlenstoffbilanz abgeschätzt. Es konnten 89% wiedergefunden werden. Mögliche Ursachen dafür, dass die Bilanz nicht ganz geschlossen werden konnte, sind, dass es sich hier einerseits nur um eine Abschätzung handelt. Die genauen Kohlenstoffanteile in der Biomasse und in den Komplexbestandteilen wurden nur angenommen. Andererseits konnten keine Angaben über die Konzentration der Komplexbestandteile am Ende der Satzkultivierung getroffen werden.

Durch die Akkumulation von K^+ , Cl^- oder Na^+ Ionen im Cytoplasma wirken halophilen Archaeen dem osmotischen Druck in saliner Umgebung entgegen (Oren 1999b). Des Weiteren weist das natürliche Habitat, das Tote Meer, eine sehr viel höhere Konzentration an MgCl_2 (50% (w/v)) beziehungsweise KCl ($4,4\%$ (w/v)) auf, als im Komplexmedium Hv-YPC Medium

(9,9% (w/v) MgCl_2 und 2,2% (w/v) KCl) vorhanden ist. Eine Erhöhung der ursprünglichen MgCl_2 und KCl Konzentration auf maximal 42% (w/v) (400 mM) bzw. 14% (w/v) (500 mM) resultierte jedoch nicht in einer Verbesserung des Wachstums, sondern führte zu einer Verminderung der Biomasse Konzentration um 30% bei 300 mM MgCl_2 und 500 mM KCl. Damit kann eine osmotisch bedingte Wachstumslimitierung von *Haloferax volcanii* ausgeschlossen werden. Im natürlichen Habitat dem Toten Meer liegt eine Salinität von 28% (w/v) vor (Wisniack 2002). Eine Kultivierung bei 28% (w/v) bzw. 30% (w/v) Salzgehalt führte zu einer Verminderung der Biotrockenmassekonzentration. Somit ist für *Haloferax volcanii* die Salinität von 18% (w/v) und die Salzzusammensetzung im Komplexmedium Hv-YPC gut geeignet.

Bei der Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1895 im Membranreaktor mit kontinuierlichem Medienaustausch und vollständiger Zellrückhaltung konnte bei einer Medienaustauschrates von $0,1 \text{ h}^{-1}$ nach 48 h, in der stationären Phase, eine Biotrockenmassekonzentration von $21,7 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden. Eine niedrigere Austauschrate von $0,075 \text{ h}^{-1}$ hatte eine geringere Biomasseausbeute ($13,1 \text{ g L}^{-1}$) zur Folge. Nach etwa 45 h ist bei beiden Kultivierungen die stationäre Wachstumsphase erreicht. Mit der geringeren Medienaustauschrates wurde während der Kultivierung auch weniger Substrat in den Rührkesselreaktor eingetragen, als es mit der höheren Austauschrate von $0,1 \text{ h}^{-1}$ möglich war. Aufgrund des stetigen Wachstums der Zellen könnte das zur Verfügung gestellte Substrat nicht mehr ausreichend gewesen sein, um Zellwachstum und Erhaltungsstoffwechsel zu ermöglichen. Somit war nach 45 h das zur Verfügung gestellte Substrat nur noch für den Erhaltungsstoffwechsel ausreichend, weshalb der Übergang in die stationäre Wachstumsphase zu beobachten war. Die geringere Biotrockenmassekonzentration von $13,1 \text{ g L}^{-1}$, die bei der geringen Medienaustauschrates ($0,075 \text{ h}^{-1}$) zu beobachten war, resultiert aus der geringeren Substratmenge, die in das Medium eingetragen wurde. Bei der höheren Medienaustauschrates konnte eine höhere Biomassekonzentration erreicht werden, bevor auch hier die Substratkonzentration zu gering wurde, um neben dem Erhaltungsstoffwechsel noch eine Zunahme der Biomassekonzentration ermöglichen zu können. Neben dieser Theorie könnte auch *Quorum Sensing* als möglicher Faktor für die Wachstumslimitierung in Betracht gezogen werden. Durch den Medienaustausch würden die Botenstoffe aus dem Kultivierungsmedium ausgetragen oder verdünnt werden, was eine höhere Biomassekonzentration zur Folge hätte. Durch das Wachstum der Zellen nimmt

auch die Konzentration an sekretierten Botenstoffen zu. Ab einem gewissen Zeitpunkt könnte die medienaustauschrate zu gering gewesen sein, um einen Austrag der Botenstoffe zu gewährleisten. Damit könnten sich die Botenstoffe im Medium akkumulieren, was sich negativ auf das Wachstum von *Haloferax volcanii* auswirken und zu niedrigeren Biomasseausbeuten führen könnte. *Quorum Sensing*, das Phänomen, das die Interaktion zwischen Zellen beschreibt, konnte bisher nur für die halophile Archaea *Natronococcus occultus* nachgewiesen werden (Paggi, Martone et al. 2003). Bei Kultivierungen von *Natronococcus occultus* im Schüttelkolben konnte in der späten exponentiellen Wachstumsphase bei einer $OD_{600} \sim 2,0$ im Medium akkumuliertes *N*-Acyl-Homoserin-Laktone (AHL) nachgewiesen werden (Paggi, Martone et al. 2003). AHL gilt als Autoinduktor, der für die Kommunikation zwischen Zellen und für die Expression proteolytischer Enzyme verantwortlich ist (McClellan, Winson et al. 1997, Maupin-Furlow, Gil et al. 2005). Für *Haloferax volcanii* wurden bisher keine detaillierten Untersuchungen unternommen, um *Quorum Sensing* zu diagnostizieren. Jedoch konnte bei der Ausbildung von Biofilm oder beim Wachstum von *Haloferax volcanii* auf festen Oberflächen eine Zellinteraktion beobachtet werden (Soppa 2005). Somit könnte *Haloferax volcanii* auch in der Lage sein durch *Quorum Sensing* das Wachstum zu steuern.

Durch die weitere Supplementierung des Komplexmediums Hv-YPC konnte die Biomassekonzentration im Rührkesselreaktor von $3,5 \text{ g L}^{-1}$ auf $10,5 \text{ g L}^{-1}$ gesteigert werden. Eine weitere Verdopplung der Biotrockenmassekonzentration auf $21,7 \text{ g L}^{-1}$ wurde im Membranreaktor durch einen kontinuierlichen Medienaustausch mit Zellrückhaltung erreicht. Damit konnte zur Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* im Schüttelkolben und zu den publizierten Kultivierungen eine Steigerung der Biotrockenmassekonzentration um das 10-fache erreicht werden. Mit Hilfe einer detaillierten Untersuchung eines möglichen *Quorum Sensing* und einer Optimierung des Medienaustausches mit Zellrückhaltung im Membranreaktor könnte eine weitere Steigerung der erzielbaren Biomassekonzentration möglich sein.

7 Expression und Aufreinigung von halophilen Enzymen¹

7.1 Entwicklung eines Expressionsprotokolls

Die Bedingungen aus der Literatur zur Genexpression (siehe Tabelle 4.6) kontrolliert durch den *p.tna* Promotor, wurden in Schüttelkolbenversuchen untersucht. Hierfür wurde die halophile β -Galaktosidase BGAH in *Haloferax volcanii* H1895 exprimiert. Die gemessene Aktivität des Enzyms bei der Umsetzung von ortho-Nitrophenyl- β -Galaktopyranosid (ONPG) zu ortho-Nitrophenol (ONP), wurde zur Evaluierung der Expressionsstärke herangezogen. In Abbildung 7.1 ist die spezifische Aktivität dieser β -Galaktosidase bei den verschiedenen Bedingungen dargestellt. Die Induktionsprotokolle 1 – 4 zeigen eine positive lineare Korrelation zwischen der einmalig zugegebenen L-Tryptophan Menge ($14,7 \times 10^{-3}$ bis 5 mM L-Tryptophan), der BGAH Aktivität und der Inkubationszeit (1 – 48 h). So zeigt sich die höchste Aktivität von $50 \text{ mU}_{\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}}$ bei einer Induktorkonzentration von 5 mM und einer anschließenden Inkubation von 48 h. Die gleiche Korrelation konnte bei den Protokollen 5 – 7 beobachtet werden. Statt einer einmaligen Zugabe des Induktors wurde hier die zugegebene Menge auf zwei Dosierungen verteilt. So erhielt man bei einer Zugabe von 1 + 3 mM L-Tryptophan und einer gesamten Inkubation von 9 – 10 h eine spezifische Aktivität von $32 \text{ mU}_{\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}}$. Durch die Verlängerung der Inkubationsperiode auf 16 + 4 h bei gleicher Induktor Konzentration konnte eine spezifische Aktivität von $80 \text{ mU}_{\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}}$ erreicht werden (Protokoll 6). Erhöhte man die L-Tryptophan Konzentration auf 6 + 3 mM, wurde eine spezifische Aktivität von $120 \text{ mU}_{\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}}$ erreicht.

¹Teile des Kapitels sind bereits publiziert in: Strillinger E, Grötzinger SW, Allers T, Groll M, Eppinger J, Weuster-Botz D (2016): Production of halophilic proteins with *Haloferax volcanii* H1895 in a stirred tank bioreactor. *App Microbiol Biotechnol* **100**: 1183–1195.

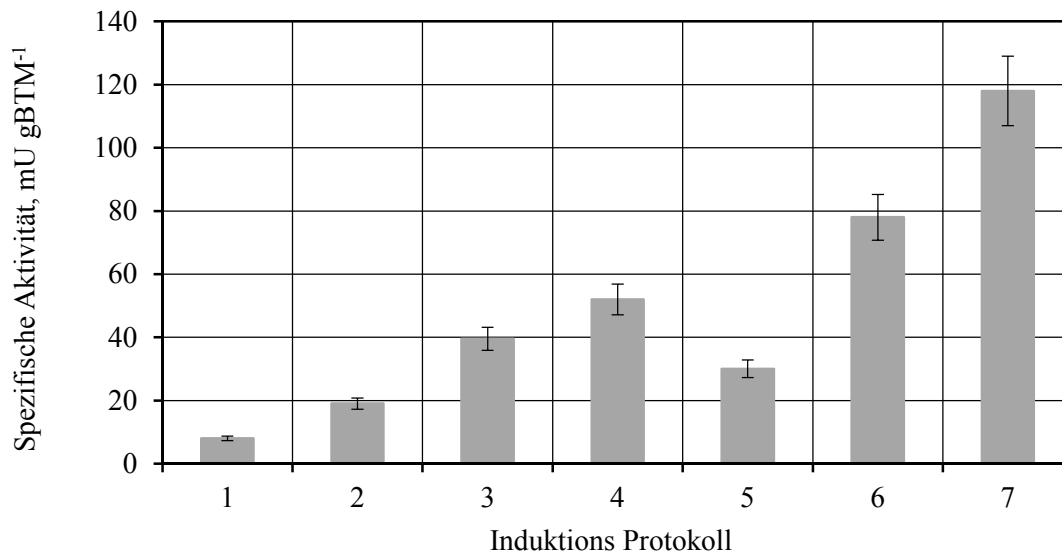


Abbildung 7.1: Spezifische β -Galaktosidase Aktivität von *Haloferax volcanii* H895_pTA1228-bgaH bei verschiedenen Expressionsbedingungen, untersucht in Schüttelkolbenexperimenten. Induktionsprotokoll 1: Induktion mit $14,7 \times 10^{-3}$ mM L-Tryptophan, Inkubation für 1 h bei 45°C (Tripepi, You et al. 2012). Protokoll 2: Induktion mit 5 mM L-tryptophan, Inkubation für 5 h bei 45°C (Lestini, Laptanok et al. 2013). Protokoll 3: Induktion mit 5 mM L-Tryptophan, Inkubation für 7 h bei 45°C (Timpson, Alsafadi et al. 2012). Protokoll 4: Induktion mit 5 mM L-Tryptophan, Inkubation 48 h bei 45°C (Liliensiek, Cassidy et al. 2013). Protokoll 5: zwei-stufig Induktion mit 1 mM L-Tryptophan, Inkubation für 5 – 6 h bei 42°C (Allers, Barak et al. 2010). Anschließend, zweite Induktion mit 1 mM L-Tryptophan, Inkubation 1 h bei 42°C. Protokoll 6: zwei-stufige Induktion mit 3 mM L-Tryptophan, Inkubation 16 h bei 45°C. Anschließend, zweite Induktion mit 1 mM L-Tryptophan, Inkubation für 4 h bei 45°C. Protokoll 7 wurde aus Protokoll 6 entwickelt: zwei-stufige Induktion mit 6 mM L-Tryptophan, Inkubation für 16 h bei 45°C. Anschließend zweite Induktion mit 3 mM L-Tryptophan. Inkubation 4 h bei 45°C.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden die weiteren Versuche zur Untersuchung des Einflusses der Induktorkonzentration und der Inkubationszeit im parallelen Bioreaktorblock durchgeführt.

7.1.1 Einfluss von L-Tryptophan

In Abbildung 7.2 A ist die spezifische Aktivität der exprimierten BGAH dargestellt, resultierend aus einer einmaligen Zugabe von L-Tryptophan (1 – 9 mM) zum Medium und einer folgenden Inkubationszeit von 20 h. Des Weiteren wurde die verbleibende Menge an L-Tryptophan nach 20 h im Medium analytisch bestimmt.

Durch eine ansteigende Konzentration des Induktors bis 7 mM ist ein Anstieg der spezifischen Aktivität der halophilen β -Galaktosidase auf $23 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ zu erkennen. Eine Induktorkonzentration, die 7 mM übersteigt, führte zu einer Verringerung der Genexpression. So wurden bei einer Zugabe von 9 mM L-Tryptophan nur eine spezifische Aktivität von $15 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bestimmt. Die Analyse der verbleibenden Induktormenge im Medium zeigte, dass bis zu einer L-Tryptophan Konzentration von 5 mM nur ein vernachlässigbarer Abbau des Induktors erfolgte. Hingegen resultiert aus einer höheren zugegebenen Induktormenge eine verbleibende Konzentration von etwa 5 mM L-Tryptophan im Medium nach Ablauf der Inkubationszeit.

Um eine höhere Induktormenge zugeben zu können ohne eine daraus resultierende Inhibierung der Genexpression zu erhalten, wurde die Induktorkonzentration (2 – 10 mM) auf zwei Portionen aufgeteilt und ins Kultivierungsmedium gegeben (Abbildung 7.2 B). Die Inkubationszeit nach der ersten Zugabe betrug 16 h, nach der zweiten Zugabe 4 h. Korrespondierend zu den Ergebnissen aus der einmaligen Induktorkonzentration hatte eine Erhöhung der L-Tryptophan Konzentration einen Anstieg der Genexpression zur Folge. Die höchste spezifische Aktivität von $73 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ konnte bei einer Zugabe von insgesamt 9 mM (aufgeteilt auf zwei Dosierungen mit 6 und 3 mM) L-Tryptophan erreicht werden. Eine weitere Erhöhung der Induktorkonzentration auf 10 mM (7 + 3 mM) zeigte einen Abfall der spezifischen Aktivität auf $45 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Die verbleibende L-Tryptophan Konzentration im Medium nach 20 h Inkubation zeigte ab einer Zugabe von $>6 \text{ mM}$ L-Tryptophan eine Plateaubildung. Größere Mengen an zugegebenem L-Tryptophan wurden auf 6 mM L-Tryptophan reduziert.

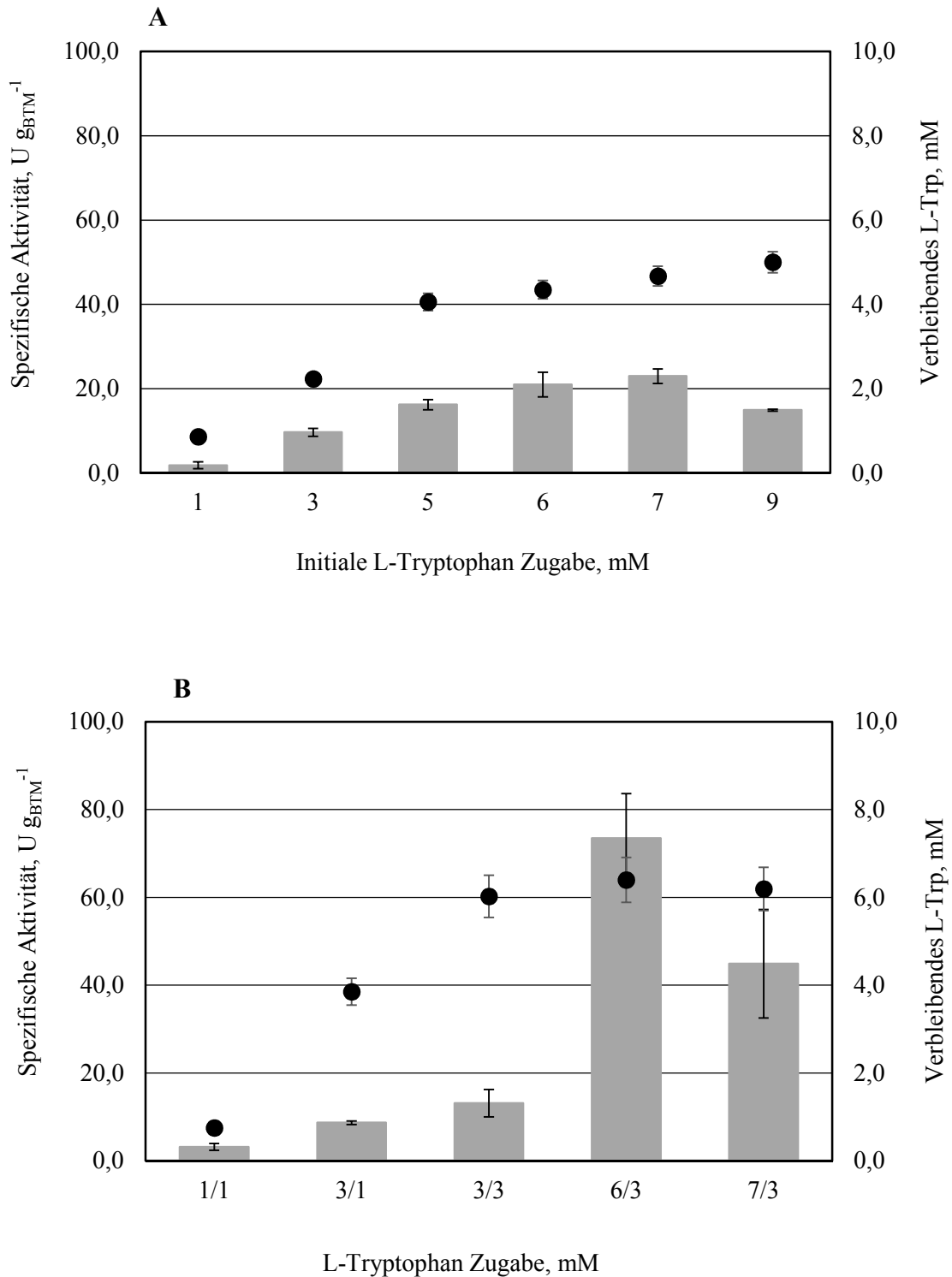
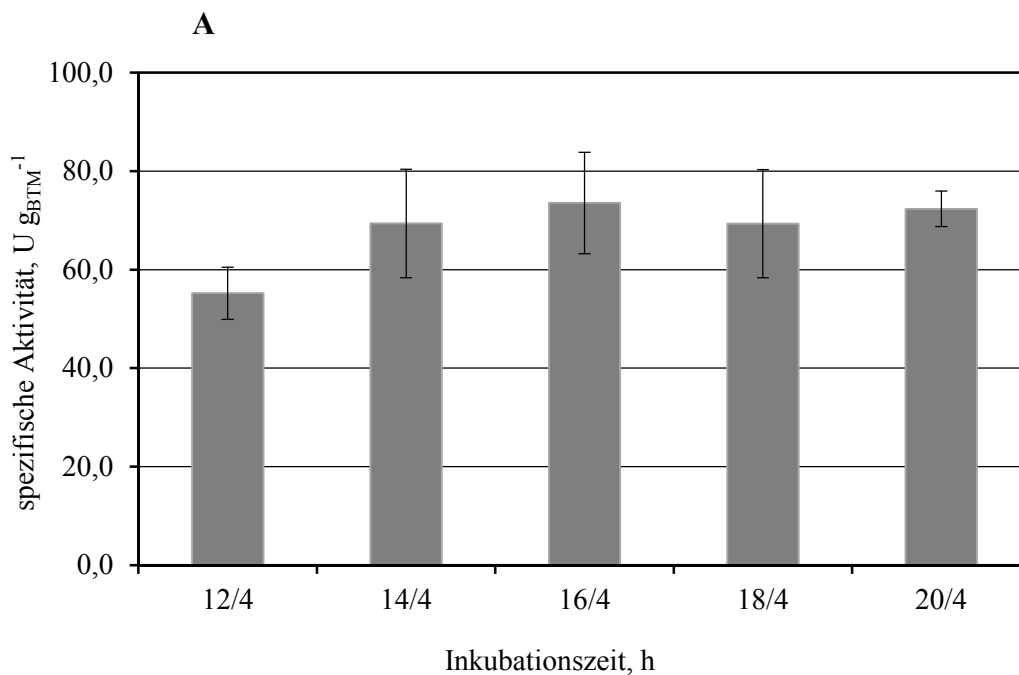


Abbildung 7.2: Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (—) von *Haloferax volcanii* H1895_pTA1228-bgaH und verbleibenden L-Tryptophan Mengen im Medium (●) bei verschiedenen Induktorkonzentrationen. Kultivierungen im parallelen Bioreaktorblock (bioREAKTOR 48) bei 45°C; pH 7,5, Begasungsrate 0,1 L min⁻¹ und 2500 U min⁻¹. A Zugabe von L-Tryptophan erfolgte in einem Schritt. B Zugabe von L-Tryptophan erfolgte in zwei Schritten.

7.1.2 Einfluss der Inkubationszeit

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Expression beeinflussen kann ist die Inkubationszeit. Die Inkubationszeit wurde bei einer zwei-stufigen Induktion mit 6 + 3 mM L-Tryptophan untersucht. In einer ersten Versuchsreihe wurde die erste Inkubationszeit in einem Bereich von 12 – 20 h variiert, wohingegen die zweite Inkubationszeit konstant bei 4 h blieb (Abbildung 7.3 A). In einer zweiten Versuchsreihe wurde für die Variation der zweiten Inkubationszeit ein Bereich von 1 – 6 h untersucht. Die erste Inkubationszeit blieb konstant bei 16 h (Abbildung 7.3 B).

Eine Inkubation von 14 h nach der ersten Zugabe von L-Tryptophan mit folgenden 4 h nach der zweiten Induktorzugabe war nötig, um die maximale Aktivität von 70 U min^{-1} zu erreichen. Nach einer vorausgegangenen Inkubationszeit von 16 h, konnte die zweite Inkubationsperiode nach 2 h beendet werden, da dort bereits die maximale spezifische Aktivität von BGAH erreicht war. Damit war eine gesamte Inkubationszeit von 18 h, aufgeteilt in 14 + 4 h oder 16 + 2 h ausreichend, um die maximal mögliche Genexpression zu erhalten.



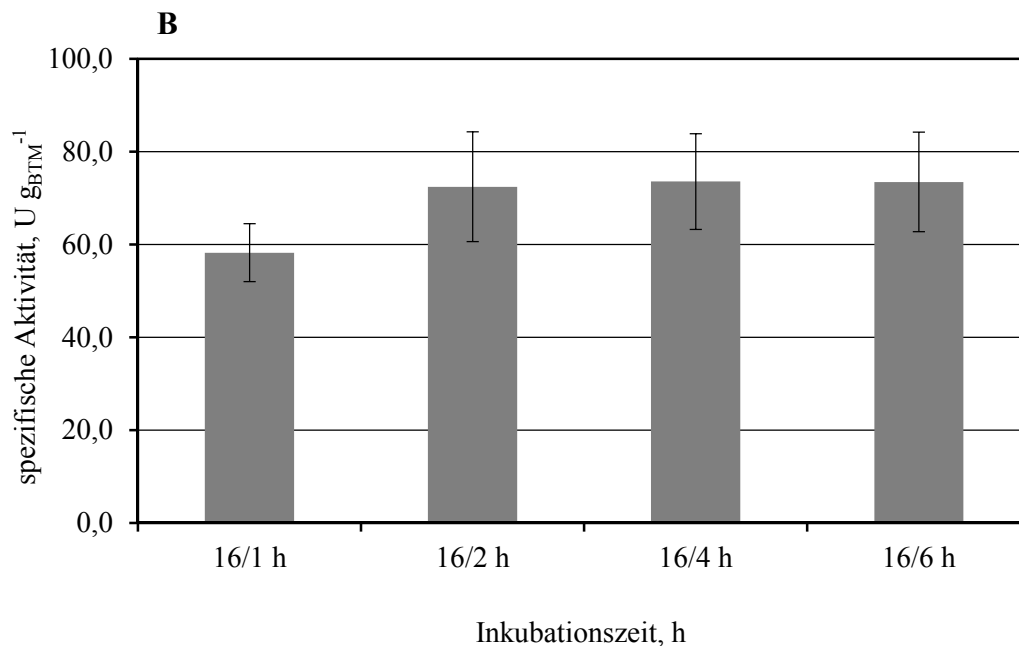


Abbildung 7.3: Darstellung der spezifischen β -Galaktosidase Aktivität von *Haloferax volcanii* H1895_pTA1228-bgaH induziert mit 6 + 3 mM L-Tryptophan. A Variation der Inkubationszeit von 12 – 20 h nach der ersten Zugabe von L-Tryptophan und konstanten 4 h nach der zweiten Zugabe von L-Tryptophan. B Konstante Inkubationszeit von 16 h nach der ersten L-Tryptophan Zugabe und Variation der zweiten Inkubationsperiode von 1 – 6 h nach der Zugabe von 3 mM L-Tryptophan. Durchführung der Experimente im parallelen Bioreaktorblock (bioREAKTOR 48) in 13 mL Hv-YPC bei 45°C, 2500 U min⁻¹, pH 7,5 und einer Begasungsrate von 0,1 L min⁻¹.

7.1.3 Diskussion

In Holmes et al. (2008) wurde das Gen *bgaH*, das für eine halophile β -Galaktosidase codiert, als Reporter gen zur Untersuchung von halophilen Genexpressionen vorgestellt (Holmes, Scopes et al. 1996, Holmes and Dyall-Smith 2000, Holmes, Kamekura et al. 2008). Erstens wird das Gen in Archaeen gut exprimiert und zweitens korreliert die Expressionsstärke linear mit der enzymatischen Aktivität bei der katalytischen Umsetzung von ortho-Nitrophenyl- β -Galaktopyranosid (ONPG) zu ortho-Nitrophenol (ONP). Daher eignete sich die Expression des Genes gut zur Untersuchung und Evaluierung der Expressionsstärke bei unterschiedlichen Bedingungen.

Bei der Durchführung der Expressionsversuche im parallelen Bioreaktorblock konnte im Vergleich zu den Schüttelkolbenexperimenten höhere Expressionsraten festgestellt werden. Dies ist vermutlich einer höheren Gelöstsauerstoffkonzentration und einem auf pH 7,4

geregeltem pH geschuldet. Beide Faktoren können sich, wenn sie nicht optimal eingestellt sind, negativ auf das Wachstum und die Genexpression auswirken (Schneegurt 2012).

Bei der Auswertung der verschiedenen Expressionsmustern lassen sich folgende Zusammenhänge beobachten:

- Längere Inkubationszeiten wirken sich positiv auf die Genexpression aus. In dieser Studie konnte eine maximale Proteinausbeute nach 18 h beobachtet werden. Eine weitere Erhöhung der Inkubationszeit hat jedoch auf die Genexpression keinen positiven Einfluss mehr.
- Die Erhöhung der Induktorkonzentration führte zu höheren Proteinausbeuten. Die maximale Ausbeute konnte bei einer Zugabe von 6 mM L-Tryptophan erreicht werden.
- Durch eine weitere Erhöhung der Induktormenge war ein Einbruch in der Genexpression und somit ein Rückgang der BGAH Konzentration zu beobachten.
- Darüber hinaus führte eine Zugabe von L-Tryptophan mit einer Schwellenkonzentration von 6 mM zur Expression der intrinsische L-Tryptophanase, was zu einem Rückgang des L-Tryptophans im Medium führte. Dies beruht möglicherweise auf der Toxizität von L-Tryptophan (Gross et al. 1999).
- Somit wird bei einer zweistufigen Induktion eine effizientere Genexpression erreicht, da durch die zweimalige Zugabe von L-Tryptophan eine größere Gesamtmenge zum Kultivierungsmedium gegeben werden kann. Die höchste Expressionsstärke konnte so bei einer Zugabe von insgesamt 9 mM L-Tryptophan, aufgeteilt auf zwei Dosierungen mit 6 und 3 mM Induktor erreicht werden. Nach der ersten Zugabe folgt eine Inkubationszeit von 16 h, wohingegen die Zellernte nach 2 – 4 h Inkubation nach der zweiten Induktion ausgeführt werden kann.

7.2 Alkoholdehydrogenasen aus den Pools Discovery und Atlantis II

Die beiden exprimierten Alkoholdehydrogenasen ADH/D1 und ADH/A1 stammen aus dem Metagenom der beiden Solebecken Discovery (ADH/D1) und Atlantis II (ADH/A1). Die Genexpression erfolgte zuerst mit *Haloferax volcanii* H1424 im 1 L Schüttelkolben und anschließend mit *Haloferax volcanii* H1895 im 7,5 L Rührkesselreaktor. Zum Vergleich wurde

die Expression der beiden Gene in *E. coli* CondonPlus(DE3) RIPL im 1 L Schüttelkolben herangezogen.

7.2.1 Proteinausbeute im Schüttelkolben

Expression von ADH/D1 und ADH/A1 in *E. coli* CondonPlus(DE3) RIPL

Aufgrund des hohen GC Anteils in den halophilen Gensequenzen und des damit verbundenen anderen Codongebrauchs, wurde *E. coli* CondonPlus(DE3) RIPL Stamm zur heterologen Expression der beiden Gene ausgewählt. Die Gene der halophilen Alkoholdehydrogenasen wurden in den Vektor pET3a integriert. Trotz der Verwendung des für halophile Expressionen speziellen Expressionssystems, konnte keine Genexpression beobachtet werden.

Expression von ADH/D1 und ADH/A1 in *Haloferax volcanii* H1424

Für die Expression von ADH/D1 und ADH/A1 wurden die Expressionssysteme H1424_pTA963-ADH/D1 und H1424_pTA963-ADH/A1 verwendet. Die Induktion der Expression erfolgte unter Verwendung des in Kapitel 7.1 vorgestellten zweistufigen Protokolls. Nach der Proteinaufreinigung mit Hilfe einer Nickel-Affinitätschromatographie wurden aus 1 L Kultur 3,53 mg Protein pro Gramm Biotrockenmassekonzentration ($\text{mg}_{\text{gBTM}^{-1}}$) gereinigtes ADH/D1 und 0,44 $\text{mg}_{\text{gBTM}^{-1}}$ ADH/A1 erhalten.

7.2.2 Proteinausbeute im Rührkesselreaktor

Die Expression der Alkoholdehydrogenasen im Rührkesselreaktor wurde unter Verwendung der Expressionssysteme H1895_pTA963-ADH/D1 und H1895_pTA963-ADH/A1 durchgeführt. Die Satzkultivierung der Stämme erfolgte im Rührkesselreaktor im angereicherten Hv-YPC Medium. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 6,0 mM L-Tryptophan nach 12 h während der exponentiellen Wachstumsphase (s. Abbildung 7.4). Für die folgenden 12 h blieb die Konzentration des Induktors im Medium konstant. Anschließend war innerhalb von 4 h ein Rückgang der L-Tryptophan Konzentration auf 3,5 mM im Medium zu beobachten. Durch die zweite Induktion mit 3,0 mM L-Tryptophan erhöhte sich die Konzentration auf 7,8 mM im Medium. Innerhalb der folgenden zwei Stunden wurde L-Tryptophan auf 5,8 mM abgebaut. Bis zur Zellernte nach weiteren zwei Stunden blieb die Konzentration des Induktors konstant.

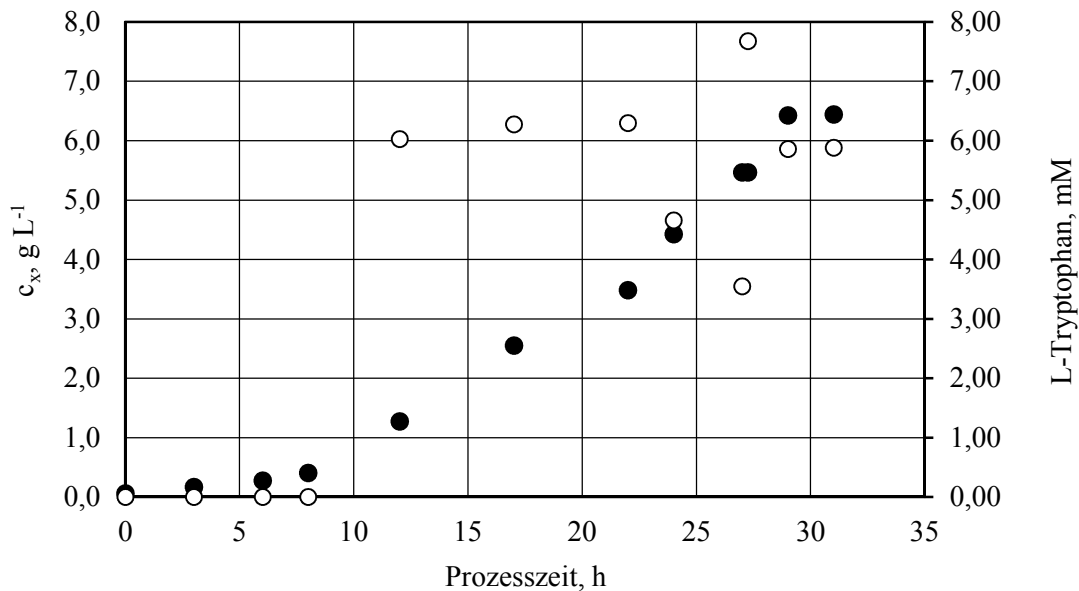


Abbildung 7.4: Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-ADH/D1 im Rührkesselreaktor in 2 L angereichertem Hv-YPC Medium bei 45°C, pH 7,5, 2 vvm und pO₂ > 50%. Darstellung der Biotrockenmassekonzentration (●) und der L-Tryptophan Konzentration im Medium (○).

Abbildung 7.5 vergleicht den Verlauf der Biotrockenmasse (A), die Laktatkonzentration im Medium (B), die Konzentration des gebildeten Nebenprodukts Acetat (C) und die Konzentration von Ammonium (D) für die Expression von ADH/D1 mit H1895_pTA963-ADH/D1 und ADH/A1 mit H1895_pTA963-ADH/A1. Bei der Expression von ADH/D1 konnte eine Biotrockenmassekonzentration von 6,5 g L⁻¹ erreicht werden, wohingegen bei der Expression von ADH/A1 nur eine Biotrockenmassekonzentration von 5,3 g L⁻¹ erreicht werden konnte. In beiden Satzverfahren verbrauchte *Haloferax volcanii* H1895 das im Medium vorhandene Laktat bis zu einer verbleibenden Konzentration von 1,0 g L⁻¹. Im Satzverfahren von H1895_pTA963-ADH/D1 wurde Acetat als Nebenprodukt in der exponentiellen Wachstumsphase gebildet, das sich bis zu einer maximalen Konzentration von 0,15 g L⁻¹ im Medium anreicherte. Anschließend wurde Acetat bis zu einer verbleibenden Konzentration von 0,05 g L⁻¹ metabolisiert. Während der Expression von ADH/A1 konnte eine stetige Akkumulation von Acetat im Medium beobachtet werden, bis am Ende des Satzverfahrens 0,26 g L⁻¹ Acetat im Medium bestimmt wurden. Die Ammoniumkonzentration blieb, während

der Expression von ADH/D1 konstant bei $0,4 \text{ g L}^{-1}$. Nach 24 h war bis zum Ende des Satzverfahrens ein Anstieg auf $0,55 \text{ g L}^{-1}$ zu beobachten. Hingegen zeigte sich bei der Expression von ADH/A1 eine Reduktion der Ammoniumkonzentration auf $0,25 \text{ g L}^{-1}$ innerhalb der ersten 10 h gefolgt von einem Anstieg auf $0,7 \text{ g L}^{-1}$ bis zum Ende des Satzverfahrens.

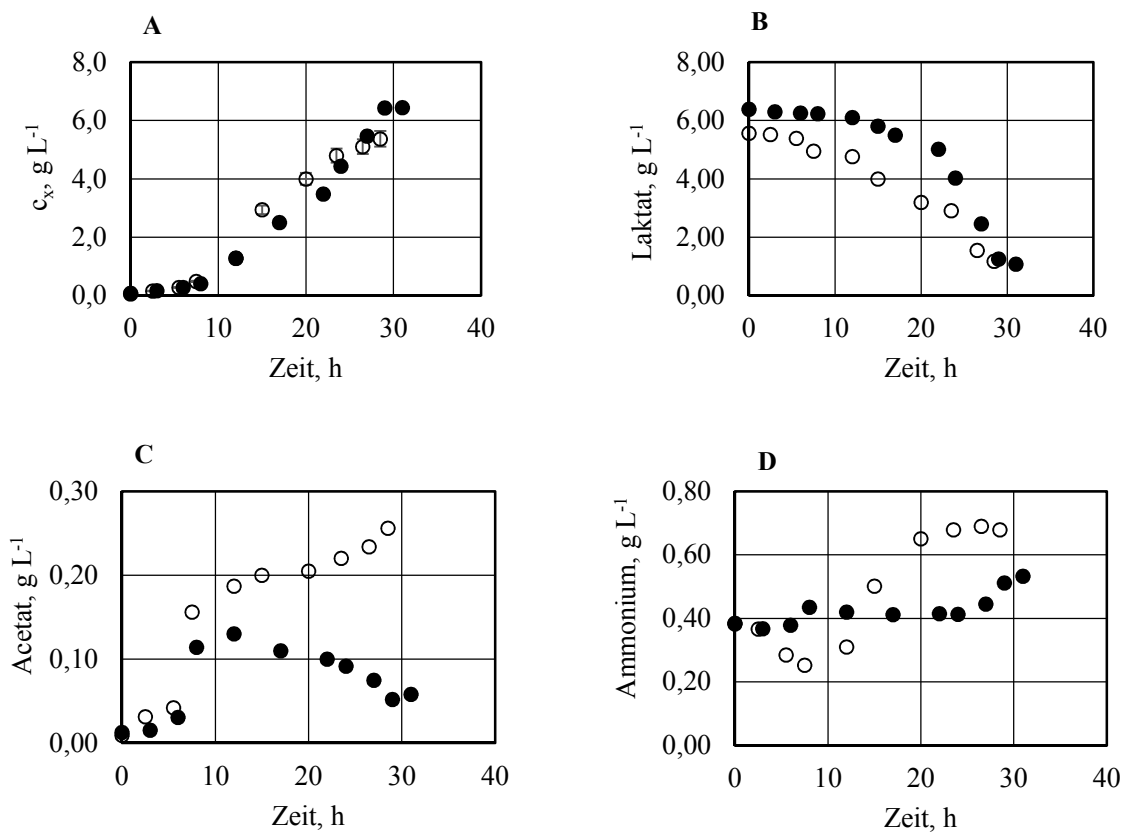


Abbildung 7.5: Satz Kultivierung von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-ADH/D1 (●) und H1895_pTA963-ADH/A1 (○) im Rührkesselreaktor in 1 L angereichertem Hv-YPC Medium bei 45°C , pH 7,5, 2 vvm und $\text{pO}_2 > 50\%$. Induktion der Genexpression nach 12 h durch Zugabe von 6 mM L-Tryptophan, mit einer anschließenden Inkubation von 16 h. Danach erfolgte der zweite Induktionsschritt mit 3 mM L-Tryptophan. Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurden die Zellen geerntet. Darstellung der A) Biotrockenmassekonzentration, B) der Laktatkonzentration, C) der Acetatkonzentration und D) der Ammoniumkonzentration.

Beide Alkoholdehydrogenasen wurden isoliert und aufgereinigt. Wie bereits in den Schüttelkolbenexperimenten festgestellt wurde, ist die Ausbeute von ADH/D1 höher. So konnten von ADH/D1 $16,8 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ und von ADH/A1 $3,9 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ isoliert werden. In

Abbildung 7.6 ist die SDS-PAGE mit den beiden Enzymen ADH/D1 (A) und ADH/A1 (B) gezeigt.

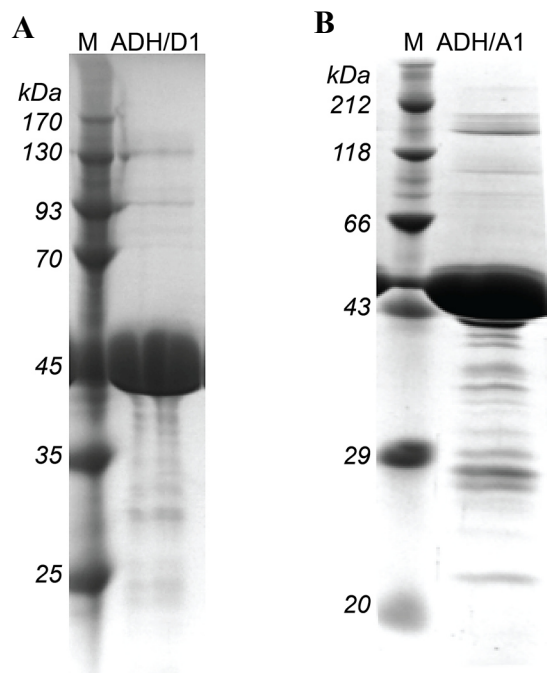


Abbildung 7.6 SDS-PAGE Analyse der gereinigten Alkoholdehydrogenasen A) ADH/D1 (44,3 kDa) mit Marker Prestained Protein Ladder (Page Ruler, Thermo Fischer Scientific) und B) ADH/A1 (40,2 kDa) mit Marker Prestained Protein Ladder, (Colour Plus, New England Biolabs)

7.2.3 Diskussion

In *E. coli* CodonPlus(DE3)-RIPL konnte keine Expression von ADH/D1 und ADH/A1 beobachtet werden. Halophile Mikroorganismen verfügen im Gegensatz zu mesophilen Stamm *E. coli* über hohe Salzkonzentrationen im Zytoplasma. Daher sind halophile Proteine durch spezielle Mechanismen an die halophilen Bedingungen in der Zelle angepasst. Um mehr Stabilität zu erhalten weisen Sequenzen von halophilen Proteinen einen hohen GC Anteil von > 60% auf (Oren 2008), wodurch sich der Codongebrauch deutlich von dem von mesophilen Organismen unterscheidet. Des Weiteren haben halophile Proteine einen höheren Anteil geladener und polarer Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche, um die Hydrophobizität zu reduzieren. Die halophilen Proteine sind so in der Lage eine Hydratationsschicht auszubilden und hydratisierte Salzionen zu binden (Danson and Hough 1998, Hough and Danson 1999, Madern,

Ebel et al. 2000, Mevarech, Frolow et al. 2000, Oren 2008). Daher ist der mesophile Stamm *E. coli* oft nicht zur halophilen Proteinexpression geeignet. Meist kann eine Expression mit aktiven Enzymen in *E. coli* nur durch anschließende Renaturierung realisiert werden (Connaris, Chaudhuri et al. 1998, Cao, Liao et al. 2008). Das halophile Enzym kann jedoch auch inaktiv bleiben (Timpson, Alsafadi et al. 2012). Dies unterstreicht die Notwendigkeit eines alternativen halophilen Expressionssystems.

Unter Verwendung des angereicherten Hv-YPC Mediums und des Expressionsprotokolls konnten $16,8 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ADH/D1 und $3,9 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ADH/A1 bei $6,5 \text{ g L}^{-1}$ beziehungsweise $5,8 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse erreicht werden. Im Schüttelkolben hingegen, konnten nur $3,53 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ gereinigtes ADH/D1 und $0,44 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ gereinigtes ADH/A1 bei 2,1 und $1,7 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmassekonzentration realisiert werden (Abbildung 7.7). Pro Liter Kultur ergaben sich dann für die Expression im Rührkesselreaktor folgende Konzentrationen 109 mg L^{-1} ADH/D1 und $20,6 \text{ mg L}^{-1}$ ADH/A1. Im Schüttelkolben wurde eine Konzentration der beiden Enzyme von $7,4 \text{ mg L}^{-1}$ (ADH/D1) und $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ (ADH/A1) erreicht. Somit konnte durch die Herstellung im Rührkesselreaktor eine Steigerung der Ausbeute von ADH/D1 um das 15 fache und von ADH/A1 um das 28 fache gegenüber der Herstellung im Schüttelkolben erreicht werden. Aufgrund des besseren Sauerstoffeintrags im Rührkesselreaktor und der Möglichkeit den pH zu regeln, war eine höhere Genexpression bei gleichzeitig höhere Biotrockenmasse möglich.

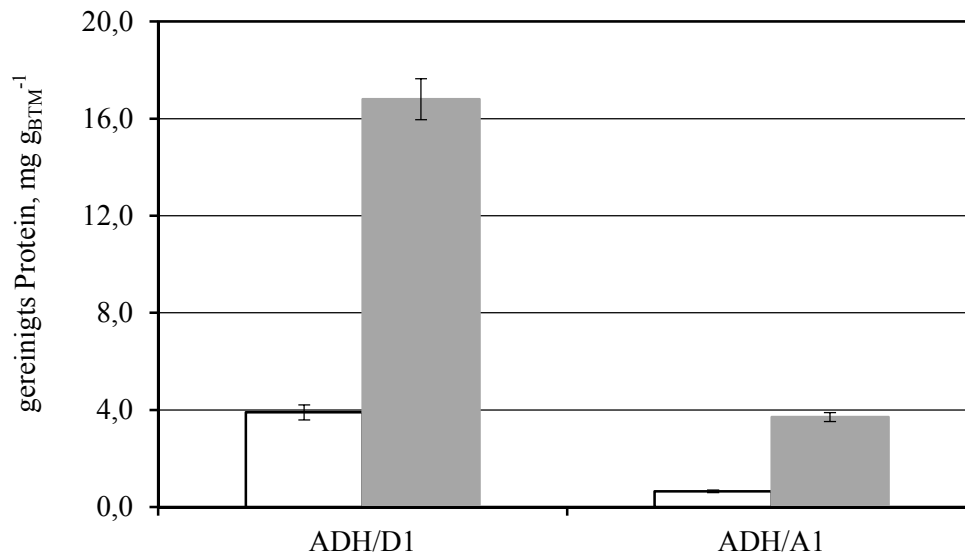


Abbildung 7.7: Gereinigtes ADH/D1 und ADH/A1, die im Schüttelkolben (□) (45°C, 170 U min⁻¹, 1 L optimiertes Hv-YPC) und im Rührkesselreaktor (■) (45°C; pH 7,5, 200 - 1000 U min⁻¹, pO₂ > 50%, 1 L optimiertes Hv-YPC) exprimiert wurden.

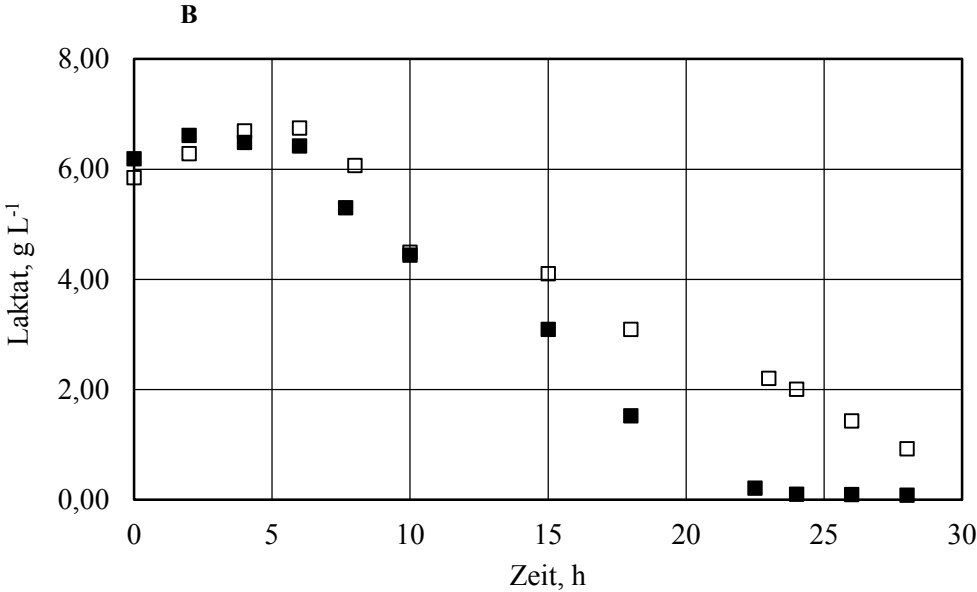
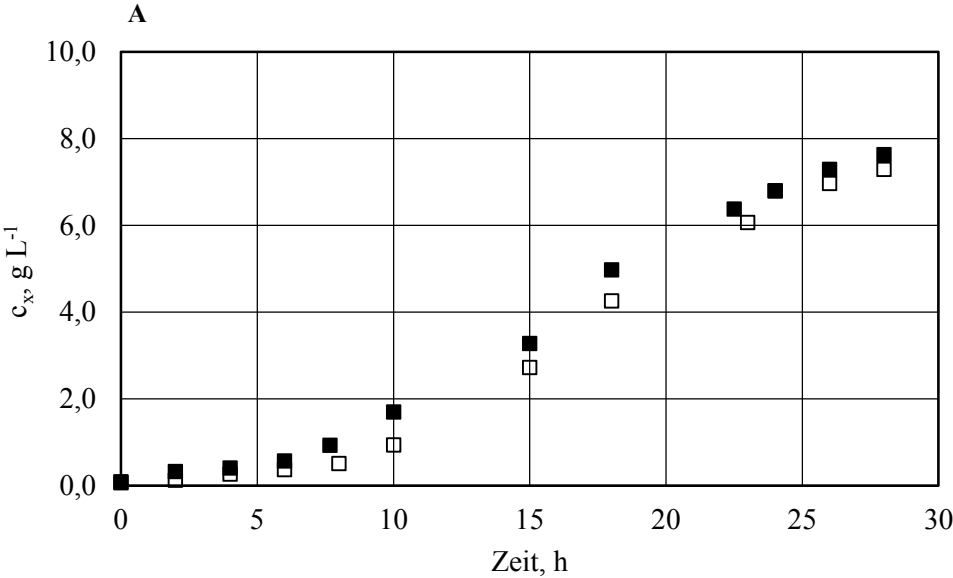
Die Herstellung von ADH/A1 im Satzverfahren mit nur 3,9 mg g_{BTM}⁻¹, entspricht 25% der Ausbeute von ADH/D1, hergestellt unter gleichen Bedingungen. Auch wurden nur 80% der maximale Biotrockenmassekonzentration im Satzverfahren von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-ADH/A1 (5,3 g L⁻¹) erreicht, die während des Satzverfahrens von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-ADH/D1 erreicht wurde (6,5 g L⁻¹). Aufgrund der Tatsache, dass am Ende des Satzverfahrens noch 1,0 g L⁻¹ Laktat im Medium vorlag, kann nicht von einer Limitierung des Wachstums ausgegangen werden. Die Medienbestandteile bei der Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-ADH/A1 wurden weniger für Proteinaufbau genutzt, als bei der Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-ADH/D1. Dies zeigt sich deutlich in der höheren Nebenproduktbildung. Während der beiden Satzverfahren wurde Acetat als Nebenprodukt gebildet, was einen negativen Effekt auf das Wachstum und die Genexpression haben kann (Wolfe 2005). Bei der Expression von ADH/D1 wurde eine maximale Acetatkonzentration von 0,12 g L⁻¹ bestimmt, die jedoch bis zum Ende des Satzverfahrens auf 0,05 g L⁻¹ gefallen war. Hingegen wurde neben der Expression von ADH/A1 0,26 g L⁻¹ Acetat gebildet.

7.3 Dihydrodipicolinat Reduktasen aus den Pools Discovery und Atlantis II

7.3.1 Proteinausbeuten im Rührkesselreaktor

Zur Expression der beiden Dihydrodipicolinat Reduktasen DR_A1 und DR_D wurden die Expressionssysteme *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-DR/A1 und *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-DR/D1 verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Rührkesselreaktor im Satzverfahren unter Verwendung des angereicherten Hv-YPC Mediums. Die Induktion der Genexpression erfolgte mit dem entwickelten zweistufigen Expressionsprotokoll (siehe Kapitel 7.1).

Bei den Expressionen von DR/D1 und DR/A1 konnte eine Biotrockenmasse von 7,8 bzw. 7,1 g L⁻¹ erreicht werden (siehe Abbildung 7.8 A). Während der Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-DR/D1 wurde das im Medium vorgelehte Laktat fast vollständig aufgebraucht. Nach 28 h lagen noch 0,2 g L⁻¹ im Medium vor. Hingegen konnte bei der Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-DR/A1 nach 28 h noch 1,0 g L⁻¹ Laktat im Medium nachgewiesen werden (B). In beiden Satzverfahren wurde Acetat als Nebenprodukt gebildet. Bei der Expression von DR/D1 konnten 0,22 g L⁻¹ Acetat nach 15 h im Medium bestimmt werden. Anschließend wurde Acetat bis auf 0,04 g L⁻¹ abgebaut. Während des Satzverfahrens von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-DR/A1 wurde Acetat innerhalb von 8 h bis zu einer maximalen Konzentration von 0,16 g L⁻¹ gebildet. Nach insgesamt 22 h war das Acetat vollständig im Medium abgebaut (C).



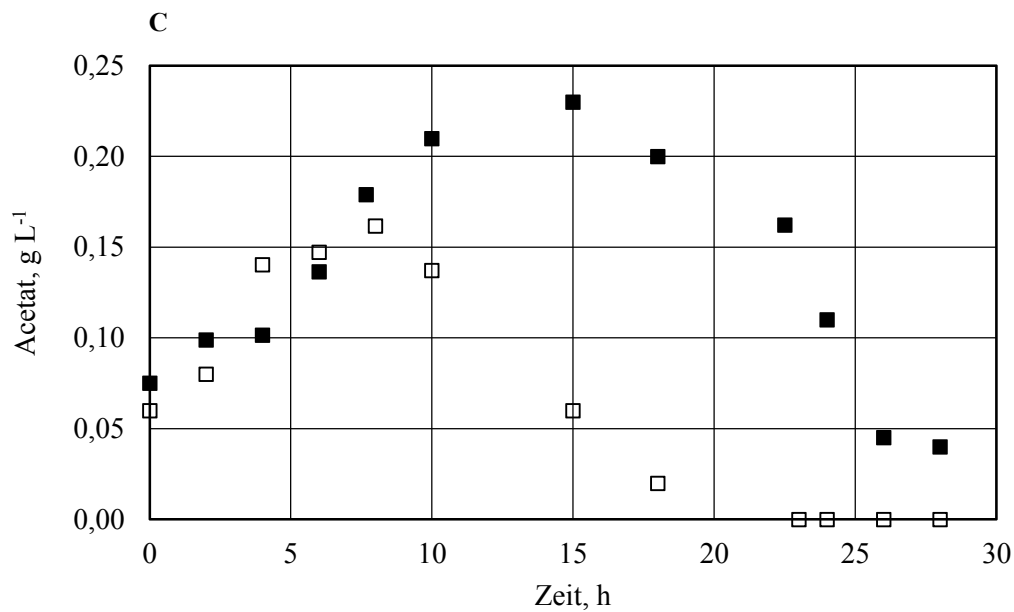


Abbildung 7.8: Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-DR/D1(■) und H1895_pTA963-DR/A1 (□) im Rührkesselreaktor in 2 L angereichertem Hv-YPG Medium bei 45°C, pH 7,5 und $pO_2 > 50\%$ und einer Rührerdrehzahl von 200 – 1000 U min⁻¹. Induktion der Genexpression nach 12 h durch Zugabe von 6 mM L-Tryptophan, mit einer anschließenden Inkubation von 16 h. Danach erfolgte der zweite Induktionsschritt mit 3 mM L-Tryptophan. Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurden die Zellen geerntet. Darstellung der A) Biotrockenmassekonzentration, B) der Laktatkonzentration, C) der Acetatkonzentration.

Da DR/D1 und DR/A1 einen „His-tag“ aufwiesen, erfolgte die Aufreinigung beider Proteine mit Hilfe einer Nickel-Affinitätschromatographie. So konnten 17,3 mg g_{BTM}⁻¹ gereinigtes DR/D1 (siehe Abbildung 7.9 A) und 8,9 mg g_{BTM}⁻¹ gereinigtes DR/A1 (siehe Abbildung 7.9 B) isoliert werden.

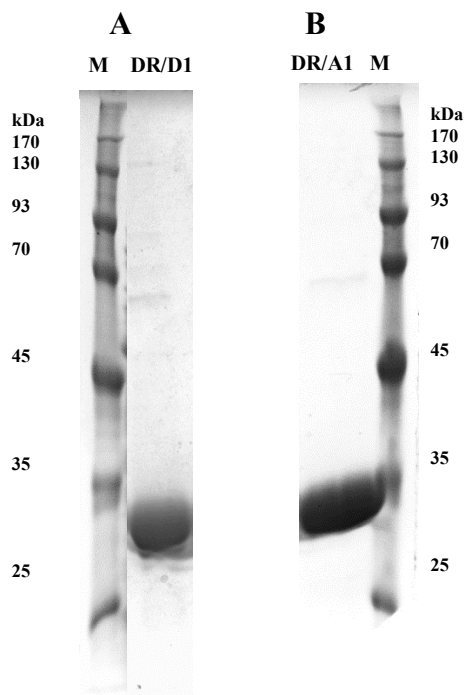


Abbildung 7.9: SDS-PAGE Analyse der gereinigten Dihydrodipicolinat Reduktasen DR/D1 (30,7 kDa) (A) und DR/A1 (30,7 kDa) (B) mit Just Blue Prestained Marker (Nippon Genetics Europe GmbH)

7.3.2 Diskussion

Das Enzym Dihydrodipicolinat Reduktase ist aus dem Lysin Biosyntheseweg und katalysiert die Reduktion von Dihydrodipicolinat zu Tetrahydrodipicolinat unter Verbrauch von NAD(P)H (Cirillo, Weisbrod et al. 1994, Pavelka, Weisbrod et al. 1997, Paiva, Vanderwall et al. 2001). Im Archaeon *Haloferax volcanii* wird Lysin ebenfalls mit Hilfe dieses Biosynthesewegs, unter Verwendung einer Dihydrodipicolinat Reduktase (Hvo_1100) gebildet. Somit könnte durch die Expression von DR/D oder DR/A1 ein Vorteil für die Zelle entstehen, was sich in der Biotrockenmasseausbeute und Enzymkonzentration im Satzverfahren von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-DR/D1 und *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-DR/A1 gegenüber H1895_pTA963-ADH/D1 und H1895_pTA963-ADH/A1 zeigt. Es wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $7,8 \text{ g L}^{-1}$ beziehungsweise $7,1 \text{ g L}^{-1}$ erreicht mit einer exprimierten Proteinkonzentration von $17,3 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ beziehungsweise $8,9 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (Gesamtmenge: $134,94 \text{ mg L}^{-1}$ und $63,19 \text{ mg L}^{-1}$). Im Vergleich dazu konnte bei der Herstellung von ADH/D1 und ADH/A1 im Satzverfahren nur eine

Biotrockenmassekonzentration von $6,5 \text{ g L}^{-1}$ und $5,8 \text{ g L}^{-1}$ mit $16,5$ und $3,9 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ an exprimierten Proteinen, erreicht werden.

Vergleicht man die Expressionsstärke der Enzyme aus dem Solebecken Discovery mit der aus dem Solebecken Atlantis II, zeigt sich, dass die Expression von DR/A1 und ADH/A1 aus dem Brine Pool Atlantis II allgemein schwächer ist, als die der Gene aus dem Brine Pool Discovery (ADH/D1 und DR/D1). Die hier verwendeten Expressionsbedingungen (45°C , $2,5 \text{ M}$ Salz) stellen dabei einen möglichen Faktor dar. Die Temperatur im Brine Pool Discovery entspricht mit einer durchschnittlichen Temperatur von $44,8^\circ\text{C}$ der Expressionstemperatur im Satzverfahren, wohingegen im Brine Pool Atlantis II eine durchschnittliche Temperatur von $68,4^\circ\text{C}$ vorliegt (Antunes, Ngugi et al. 2011, Wang, Cao et al. 2013). Diese Temperaturdifferenz zum Betriebspunkt bei 45°C könnte die Genexpression negativ beeinflusst haben. Die mRNA kann temperaturabhängige Loops ausbilden, die einen negativen Einfluss auf die Translation haben (Gaspar, Moura et al. 2013). Übertragen auf die hier gemachten Beobachtungen würden unter den natürlichen Bedingungen ($68,4^\circ\text{C}$) in Atlantis II die mRNA der Proteine DR/A1 und ADH/A1 keine Loops ausgebildet, da die Schmelztemperatur der Loops unterhalb der Umgebungstemperatur liegt. Wird die Expression jedoch bei 45°C durchgeführt, ist es möglich, dass die mRNA Loops ausbilden und somit die Translation einschränken wird, was die Expression von Enzymen aus dem Solebecken Atlantis II, unter Verwendung des Standard Expressionsprotokolls limitiert.

8 Charakterisierung der Enzyme

8.1 Alkoholdehydrogenase ADH/D1

8.1.1 Substratspektrum und Cofaktorspezifität

Um das Substratspektrum zu ermitteln, wurde die katalytische Aktivität von ADH/D1 mit verschiedenen primären, sekundären und tertiären Alkoholen getestet. Die verwendeten Substrate sind in Tabelle 12.1 im Anhang aufgelistet. ADH/D1 setzt nur primäre Alkohole um (siehe Abbildung 8.1). Als Cofaktor wurde ausschließlich NAD^+ verwendet, der bei den durchgeführten Reaktionen zu NADH reduziert wurde.

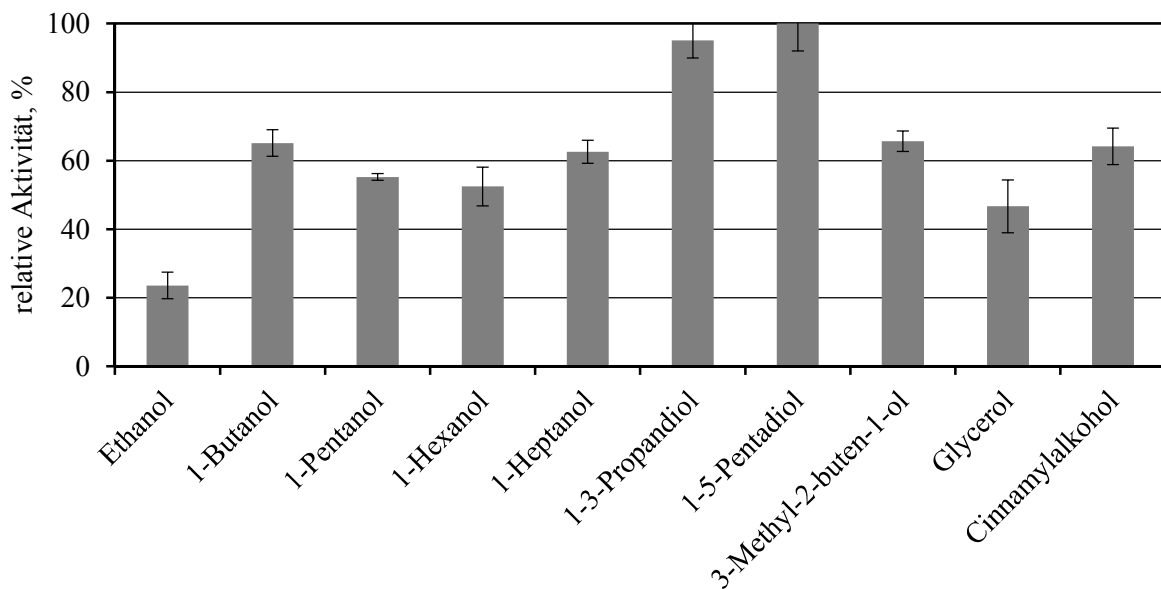


Abbildung 8.1: Substratspektrum von ADH/D1 dargestellt in relativer Aktivität, %. Gemessen in 3 M KCl, 50 mM Glycin, pH 10, 0,35 μM ADH/D1 inkubiert mit 10 μM ZnCl_2 bei 70°C mit 12,5 mM NAD^+ . Bedingungen nach (Timpson, Alsafadi et al. 2012, Timpson, Liliensiek et al. 2013)

Der Reaktionsweg ist in Abbildung 8.2 dargestellt.

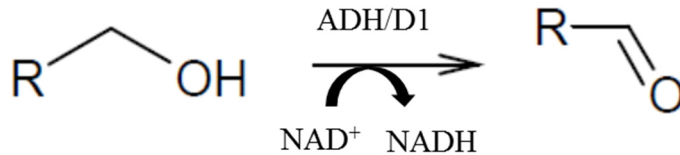


Abbildung 8.2: Reaktionsweg der Alkoholdehydrogenase: Katalytische Umsetzung des Alkohols zum Aldehyd unter Reduktion des Cofaktors NADH zu NAD⁺.

Das Substratspektrum der ADH/D1 umfasst nur primäre Alkohole, die zu Aldehyden oxidiert werden. Die Größe der Substrate reicht von C2-Körpern, wie Ethanol bis zu C8-Körpern wie Cinnamylalkohol. Die höchsten relativen Aktivitäten sind für die Substrate, bis auf Ethanol, sehr ähnlich. Die hohe spezifische Aktivität bei 1-3-Propandiol und 1-5-Pentandiol resultiert aus der Tatsache, dass beide Substrate zwei Alkoholgruppen tragen und somit die Alkoholdehydrogenase ADH/D1 beide Gruppen zu Aldehyden umsetzen kann. Kleinere Moleküle wie Ethanol führten zu geringeren Aktivitäten. Mit Methanol konnte keine Umsetzung gemessen werden.

8.1.2 Metallabhängigkeit

Alkoholdehydrogenasen können in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Bakterielle NAD⁺ bzw. NADP⁺ abhängige Alkoholdehydrogenasen unterteilen sich in *short-chain*, zinkunabhängige (Sun and Plapp 1992, Moon, Lee et al. 2011) und *long-chain*, zinkabhängige Enzyme (Jörnvall, Persson et al. 1987). Die dritte Gruppe der Alkoholdehydrogenasen ist Fe²⁺ abhängig (Scopes 1983). Der entwickelte Algorithmus PPMA (*Profile Pattern Matching Algorithm*), welcher zur Annotation der isolierten Gene aus den Solebecken im Roten Meer entwickelte wurde, sagt für die halophile Alkoholdehydrogenase ADH/D1 eine Eisenabhängigkeit voraus (Grötzinger, Alam et al. 2014).

Aufgrund der durchgeführten Dialyse mit dem Komplexbildner EDTA war das ADH/D1 metallfrei. Zur Aufnahme der verschiedenen Metallionen, wurde das Enzym jeweils mit 10 mM Salzlösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität des

Enzyms mit Cinnamylalkohol als Substrat bestimmt. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Metallabhängigkeit von ADH/D1 sind in Abbildung 8.3 dargestellt. Die höchste spezifische Aktivität von 2,1 U mg⁻¹ wurde in Verbindung mit Mn²⁺ bestimmt. Die spezifische Aktivität mit Zn²⁺ als gebundenes Metallion liegt bei 0,6 U mg⁻¹. Damit handelt es sich bei ADH/D1 um keine Fe²⁺ abhängige Alkoholdehydrogenase, da hier nur eine spezifische Aktivität von 0,08 U mg⁻¹ bestimmt werden konnte.

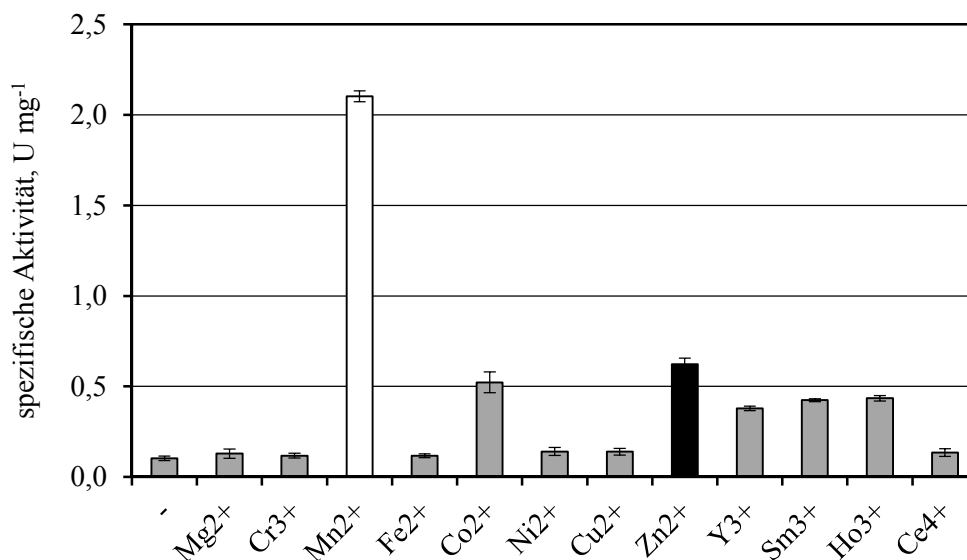


Abbildung 8.3: spezifische Aktivität von ADH/D1 mit verschiedenen Metallionen. Zugabe der Ionen im 20 fachen Überschuss zu 0,35 µM ADH/D1. Durchführung der Reaktion im 1 mL Ansatz in 3 M KCl, 50 mM Glycin, pH 10 bei 70°C, 12,5 mM NAD⁺ und 30 mM Cinnamylalkohol als Substrat.

Aufgrund der hohen Aktivität, die mit Mn²⁺ inkubiertem ADH/D1 erreicht wurde, wurden alle weiteren Charakterisierungen von ADH/D1 unter der Zugabe von Mn²⁺ und zum Vergleich unter Zugabe von Zn²⁺ durchgeführt.

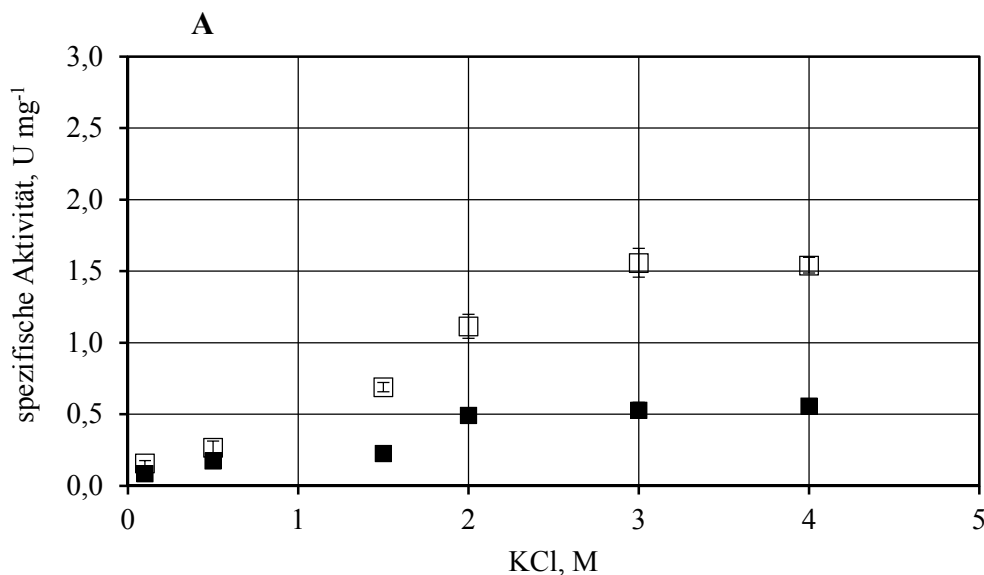
8.1.3 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

Bei der Charakterisierung der optimalen Reaktionsbedingungen wurde die Salz-, Temperatur- und pH Abhängigkeit untersucht (siehe Abbildung 8.4). Durch die Zunahme der Salzkonzentration von 0 – 4 M KCl konnte ein linearer Anstieg in der spezifischen Aktivität von ADH/D1 mit Mn²⁺ bei der katalytischen Umsetzung von 1-5-Pentandiol bis zu einer

Salzkonzentration von 3 M beobachtet werden. Es konnte eine maximale spezifische Aktivität von $1,55 \text{ U mg}^{-1}$ erreicht werden. Wurde das Enzym mit Zn^{2+} inkubiert, zeigte sich eine spezifische Aktivität von $0,5 \text{ U mg}^{-1}$ in einem Konzentrationsbereich von 2 – 4 M KCl (siehe Abbildung 8.4 A).

Das Temperaturoptimum für ADH/D1, inkubiert mit Mn^{2+} , lag mit einer maximalen spezifischen Aktivität von $2,5 \text{ U mg}^{-1}$ bei 75°C . Es konnte eine Aktivierungsenergie von $20,11 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet werden. Eine weitere Erhöhung der Temperatur führte, aufgrund der beginnenden Hitzedenaturierung des Enzyms, zu einer Verringerung der spezifischen Aktivität. Durch die Zugabe von Zn^{2+} zu ADH/D1 konnte ein Temperaturoptimum bei 70°C mit einer maximalen Aktivität von $0,52 \text{ U mg}^{-1}$ bestimmt werden (siehe Abbildung 8.4 B). Durch eine Aktivierung mit Zn^{2+} wurde die Aktivierungsenergie zu $151,27 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet.

Das pH Optimum für ADH/D1 inkubiert mit Mn^{2+} konnte zwischen pH 9,6 und pH 10,0 identifiziert werden. Durch eine Inkubation des Enzyms mit Zn^{2+} ist eine Verschiebung des Optimums zu einem pH Bereich von pH 10 – pH 10,2 zu beobachten (siehe Abbildung 8.4 C).



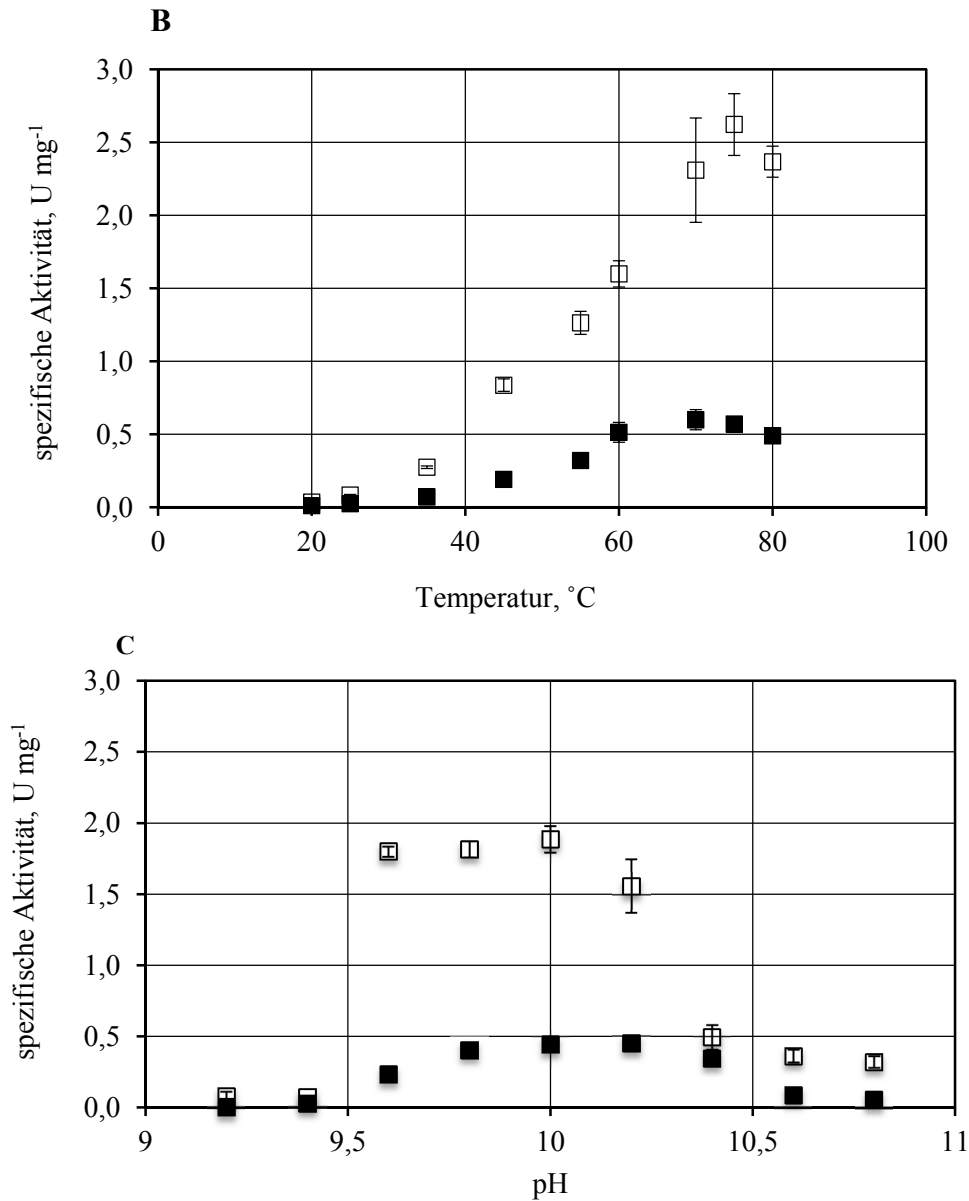


Abbildung 8.4: Darstellung der spezifischen Aktivität von $0,35 \mu\text{M}$ AHD/D1 inkubiert in $10 \mu\text{M}$ Mn^{2+} (□) oder $10 \mu\text{M}$ Zn^{2+} (■) bei RT für 30 min. Katalytischen Umsetzung von $30 \mu\text{M}$ 1-5-Pentandiol bei A) variierenden KCl Konzentrationen von $0,1 - 4 \text{ M}$, 60°C in Glycinpuffer (50 mM , pH 10), B) variierenden Temperaturen von $20 - 80^\circ\text{C}$ in einem Glycin Puffer (50 mM , pH 10) mit 3 M KCl und C) variierender pH von pH 9,2 – pH 10,8 in 50 mM Glycin und 3 M KCl und 60°C .

8.1.4 Bestimmung der kinetischen Parameter

In Tabelle 8.1 sind die Michaelis-Menten Konstanten für die katalytische Umsetzung der drei Substrate Cinnamylalkohol, 1-3-Propandiol und 1-5-Pentandiol gezeigt. Die katalytischen Umsetzungen wurden mit ADH/D1 durchgeführt, das mit Zn^{2+} oder Mn^{2+} inkubiert wurde. Die Reaktionsgeschwindigkeiten sind mit Mn^{2+} inkubiertem Enzym für alle drei Substrate

höher als für Zn^{2+} inkubiertes Enzym. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit für ADH/D1 (Mn^{2+}) mit $4,11 \text{ U mg}^{-1}$ wurde für das Substrat 1-5-Pentanal bestimmt. Die Michaelis-Menten Konstante (K_M) gibt die Substratkonzentration an, die nötig ist, um die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Werden bei der katalytischen Umsetzung mit Zn^{2+} inkubierte Enzyme eingesetzt, ist der K_M von Cinnamylalkohol und 1-3-Propandiol niedriger als mit Mn^{2+} inkubiertem Enzym. Bei 1-5-Pentandiol liegt der K_M mit $7,55 \text{ mM}$ (Zn^{2+} ADH/D1) und $5,53 \text{ mM}$ (Mn^{2+} ADH/D1) in der gleichen Größenordnung. Der niedrigste K_M von $0,56 \text{ mM}$ (Zn^{2+} ADH/D1) wurde für das Substrat Cinnamylalkohol gemessen. 1-3-Propandiol hat, geteigt durch den K_M von $55,00$ (Zn^{2+} ADH/D1) oder $171,81$ (Mn^{2+} ADH/D1) die geringste Affinität zu ADH/D1. Die Wechselzahl k_{cat} beschreibt den Umsatz an Substratmoleküle pro Sekunde. Für alle Substrate ist die Wechselzahl k_{cat} bei Mn^{2+} inkubiertem Enzym höher. Die höchste Wechselzahl mit $231,40 \text{ s}^{-1}$ wurde bei der Umsetzung von Cinnamylalkohol gemessen.

Tabelle 8.1: Darstellung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten v_{max} bei der Umsetzung der drei Substrate Cinnamylalkohol, 1-3-Propandiol und 1,5-Pentandiol mit $0,35 \mu\text{M}$ ADH/D1 bei 70°C , 3 M KCl in 50 mM Glycin pH 10 und 100 mM NAD^+ . Das Enzym wurde vor der Reaktion in 10 mM Zn^{2+} bzw. Mn^{2+} bei RT für 30 min inkubiert. Aus v_{max} wurde die Wechselzahl k_{cat} berechnet.

Substrat	Metall	v_{max} , U mg^{-1}	K_M , mM	k_{cat} , s^{-1}
Cinnamylalkohol	Zn^{2+}	$0,45 \pm 0,05$	$0,56 \pm 0,16$	$11,70 \pm 0,72$
	Mn^{2+}	$2,20 \pm 0,30$	$0,81 \pm 0,16$	$231,40 \pm 10,97$
1-3-Propandiol	Zn^{2+}	$0,45 \pm 0,02$	$55,00 \pm 4,15$	$12,9 \pm 0,34$
	Mn^{2+}	$0,85 \pm 0,15$	$171,81 \pm 25,61$	$110,34 \pm 8,40$
1-5-Pentandiol	Zn^{2+}	$0,63 \pm 0,18$	$7,51 \pm 2,93$	$12,18 \pm 1,65$
	Mn^{2+}	$4,11 \pm 0,68$	$5,53 \pm 1,52$	$77,32 \pm 5,31$

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, sowie K_M und die Wechselzahl k_{cat} wurde mit dem Cofaktor NAD^+ bestimmt (siehe Tabelle 8.2). In Übereinstimmung mit den oben gemachten Beobachtungen wurde hier die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $5,53 \text{ U mg}^{-1}$ sowie die größte Wechselzahl von $224,23 \text{ s}^{-1}$ mit Mn^{2+} inkubierten Enzymen erreicht. Hingegen ist der K_M bei mit Zn^{2+} inkubierten Enzymen etwas geringer.

Tabelle 8.2: Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, der Michaelis-Menten Konstante und der Wechselzahl k_{cat} mit 5 μM ADH/D1 bei 70°C, 3 M KCl in 50 mM Glycin pH 10 und 40 mM 1-5-Pentandiol. Das Enzym wurde vor der Reaktion in 10 mM Zn^{2+} bzw. Mn^{2+} bei RT für 30 min inkubiert.

Substrat	Metall	v_{max} , U mg^{-1}	K_{M} , mM	k_{cat} , s^{-1}
NAD ⁺	Zn^{2+}	$0,14 \pm 0,07$	$4,87 \pm 0,32$	$5,6 \pm 0,89$
	Mn^{2+}	$5,53 \pm 0,89$	$5,25 \pm 0,46$	$224,23 \pm 25,36$

8.1.5 Einfluss des Lösemittels DMSO

Durch die hohe Salzkonzentration von 3 M KCl im Puffer, steht dem Enzym zur Solubilisierung wenig freies Wasser zur Verfügung. Es ist daher möglich, dass halophile Enzyme generell in Umgebungen mit geringer Wasseraktivität stabil sind. Organische Lösemittel haben ebenfalls die Eigenschaft die Wasseraktivität zu verringern (Sellek and Chaudhuri 1999, Fukushima, Mizuki et al. 2004). Die Verwendung lösungsmittelstabiler Biokatalysatoren kann verschiedene Vorteile besitzen. Hier seien die höhere Löslichkeit hydrophober Substrate genannt sowie die Möglichkeit das Enzym ohne zusätzliche Stabilisierungsmaßnahmen wie Immobilisierung direkt verwenden zu können (Gupta and Roy 2004). Daher wurde die Aktivität von ADH/D1 im Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) (0 – 20%) gemessen.

In Abbildung 8.5 A ist die spezifische Aktivität der Alkoholdehydrogenase, die mit Zn^{2+} inkubiert wurde, bei verschiedenen DMSO und Salzkonzentrationen gezeigt. Ohne DMSO ist eine positive lineare Korrelation zwischen der spezifischen Aktivität und der Salzkonzentration zu beobachten. In Gegenwart von 5% (v/v) DMSO war ebenfalls eine positive lineare Korrelation zu beobachten, jedoch wurde die Aktivität im Vergleich zur spezifischen Aktivität ohne DMSO verringert. Enthält der Reaktionsansatz 10% DMSO war eine Steigerung der Aktivität gegenüber 0% DMSO bei den verschiedenen Salzkonzentrationen von 0,1 – 2 M bemerkbar. Die spezifische Aktivität von 0,48 U mg^{-1} bei 10% DMSO und 2 KCl entsprach bei 0% DMSO und 3 M KCl dem gleichen Wert. Dies resultiert aus dem Aussalzeffekt von DMSO, wodurch die Zugabe von DMSO eine Verringerung der Salzkonzentration in der Lösung kompensieren kann. Bei 3 M KCl und 10% DMSO ist die Konzentration an freiem Wasser vermutlich zu gering, wodurch die spezifische Aktivität auf 0,25 U mg^{-1} verringert wurde. Mit 20% DMSO war die spezifische Aktivität bei allen untersuchten Salzkonzentrationen geringer als ohne DMSO.

Wird die Alkoholdehydrogenase mit MnCl_2 inkubiert (siehe Abbildung 8.5 B), zeigten sich in Gegenwart von DMSO einige Unterschiede. Die höchste Aktivität von $1,4 \text{ U mg}^{-1}$ wurde bei 0% DMSO und 3 M KCl erreicht. DMSO zeigte keinen positiven Effekt auf die Steigerung der Aktivität bei geringeren Salzkonzentrationen, da bei allen dargestellten Salzkonzentrationen die spezifische Aktivität ohne DMSO größer oder zumindest gleich zur gemessenen Aktivität in Gegenwart des Lösungsmittels war.

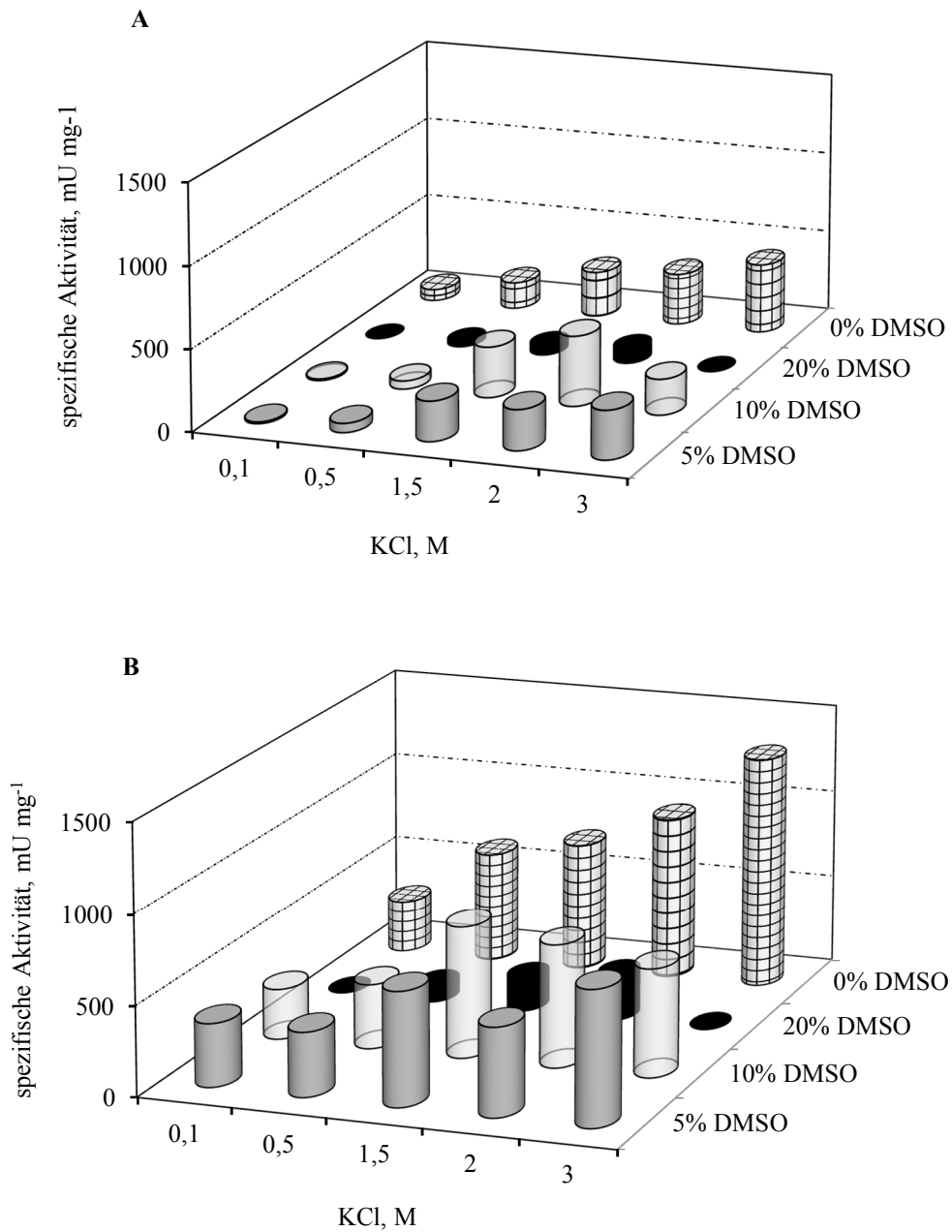


Abbildung 8.5: spezifische Aktivität bei verschiedenen DMSO Konzentrationen im Versuchsansatz 0% (□), 5% (■), 10% (▨), und 20% (▩). Durchführung der Aktivitätsbestimmung von 5 μM ADH/D1 mit 12 mM NAD^+ und 40 mM 1-5-Pentandiol bei verschiedenen KCl Konzentrationen und 70°C. Inkubation des Enzyms mit 10 μM ZnCl_2 (A) und 10 μM MnCl_2 (B) bei RT für 30 min.

8.1.6 Lagerstabilität

Zur Ermittlung der Lagerstabilität wurde frisch aufgereinigtes Enzym zu 200 μL in frische 2 mL Eppendorf-Reagenzgefäße gefüllt und bei -20°C , 4°C , 25°C und bei 50°C gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde die Aktivität des Enzyms überprüft. Für die Bestimmung der Aktivität wurde nur frisch aufgereinigtes und eingefrorenes Protein aus der gleichen Aufreinigungscharge verwendet. Es wurde kein Protein verwendet, das bereits mehrmals aufgetaut und eingefroren wurde. Zur Evaluierung der Lagerstabilität bei den verschiedenen Temperaturen wurde die Halbwertszeit aus den spezifischen Aktivitäten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8.6 dargestellt. Die längste Halbwertszeit von 985 h (41,01 d) zeigte sich bei 4°C . Bei -20°C war die Halbwertszeit mit 587,8 h etwas kürzer. Durch die Erhöhung der Temperatur auf 25°C beziehungsweise 50°C verringerte sich die Halbwertszeit auf $212,64\text{ h}^{-1}$ beziehungsweise $6,3\text{ h}^{-1}$.

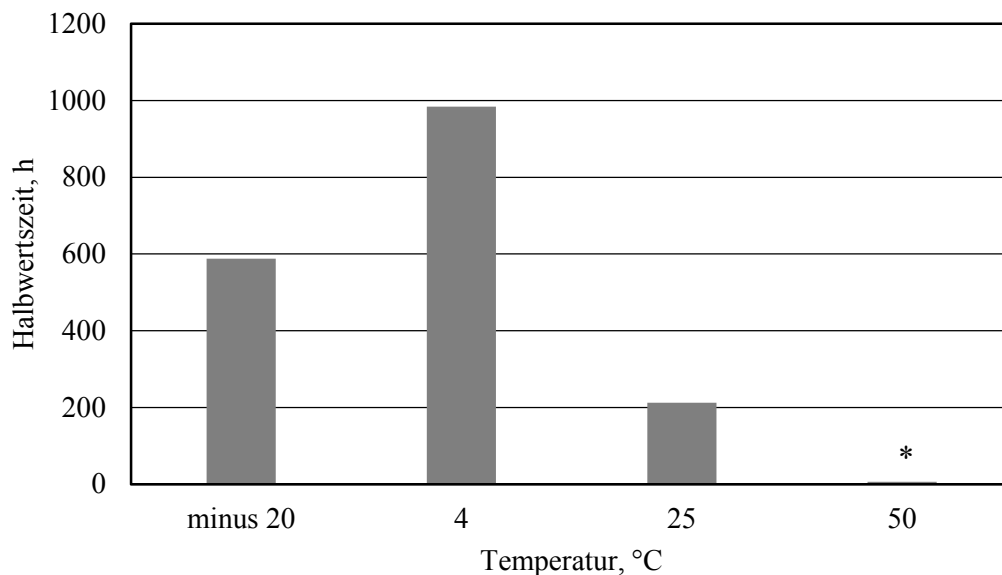


Abbildung 8.6: Temperaturstabilität der ADH/D1. Halbwertszeit bei -20°C , 4°C , 25°C und 50°C (Halbwertszeit: 6,3 h)

8.1.7 Diskussion

Enzyme weisen allgemein eine höhere Regio- und Stereoselektivität bei der Katalyse von Reaktionen auf als chemische Katalysatoren. Dies hat auch eine verminderte Bildung von

Nebenprodukten zur Folge (Rozzell 1999, Hollmann, Arends et al. 2011, Gurung, Ray et al. 2013). Des Weiteren ist die Umweltbelastung durch geringere CO₂ Emissionen in die Atmosphäre kleiner als bei herkömmlicher chemischer Industrie (van den Burg 2003, Arends, Sheldon et al. 2007). Obwohl bisher ungefähr 3000 Enzyme charakterisiert wurden, können nicht alle industriellen und biotechnologischen Anforderungen erfüllt werden. Hauptsächlich deshalb, da die mesophilen Enzyme bei den industriell geforderten Bedingungen instabil sind (Hough and Danson 1999). Daher werden extreme Habitats als Möglichkeit gesehen, neue Biokatalysatoren zu isolieren, die aufgrund ihrer natürlichen Adaption extremophile Charakteristika aufweisen und eine hohe Stabilität gegenüber extremen Temperaturen, Salzkonzentrationen oder pH aufweisen (van den Burg 2003, Egorova and Antranikian 2005, Elleuche, Schroder et al. 2014). In dieser Arbeit wurden extremophile Enzyme aus den Solebecken *Discovery* und *Atlantis II* im Roten Meer charakterisiert.

Ein Ausschnitt der Sequenz der Alkoholdehydrogenase ADH/D1 ist in Abbildung 8.7 dargestellt. Sie umfasst insgesamt 401 Aminosäuren. Weister zeigt Abbildung 8.7 den Vergleich der Sequenz von ADH/D1 mit dem Ausschnitt zweier Aminosäuresequenzen von zwei weiteren Alkoholdehydrogenasen, die mit 37% Homologie (ADH1) und 36% Homologie (ADH2) die größte Ähnlichkeit mit der Sequenz von ADH/D1 aufweisen. Das Alignment wurde mit Hilfe des *Basic local alignment search tool (BLAST)* der *National Center for Biotechnology Information databank (NCBI)* durchgeführt. Die Alkoholdehydrogenase ADH1 ist aus dem Organismus *Thermotoga maritima*, ADH2 stammt aus dem Organismus *Peptoclostridium difficile* (Nelson, Clayton et al. 1999, Monot, Boursaux-Eude et al. 2011). Die beiden Alkoholdehydrogenasen ADH1 und ADH2 sind Fe²⁺ abhängige. Das Fe²⁺ Ion wird im Enzym durch drei Histidine und ein Aspartat koordiniert (Montella, Bellolell et al. 2005). In ADH1 sind es die Aminosäure His200, His263, His277 und Asp196. In der Alkoholdehydrogenase ADH2 koordinieren His197, His260, His274 und Asp193 das Fe²⁺ Ion. Die Gensequenz adh/d1 wurde ebenfalls als Fe²⁺ abhängige Alkoholdehydrogenase annotiert, da ebenfalls das charakteristische Aminosäuremotiv zur Koordination des Fe²⁺ Ions in der Sequenz entdeckt werden konnte.

ADH/D1	11	[-----]DIIFGSGTLEKIGEETKKWGDKAILVTGKSNMKGFLADDAIDYLESAGVETVHYGEIEPNPTTTVVDE	79
ADH1	11	-----TEIIFRVGAVDELEERAKKLGKKALIVTGRSSTKKTGLLQRVVDLLKKAGVESFVFDKIVPNPISDHVDE	79
ADH2	11	-----VNILFGRGRINDVGKEVSKYKVKVLIIVTGKNSKKTGLLDKTDLLKDSKIEYEVFDRVEQNPLITTIYS	78
ADH/D1	80	[-----]ERdisVWDFAPEGDKETkpITEKTLPVIAATSTSGTGSHTVTPY	159
ADH1	80	AAEIVRKEKIDFIIGLGGGSPIDSAKAISITAPNEGK----FWDYVPVGGGK---IPEKSI PVVAIPTHTGTGTEADPF	151
ADH2	79	GVEI IKSTGCDCVLGLGGGSIMDAAKSIAFYSKYNPGDLN----DYI-FGIRQG---EELPIILVPTTSGTSEGNCF	148
ADH/D1	160	AVITNPETKKGKPGFNGKHSFPKVSIVDIDILKEMPPRLTAITGYDVFVSHVSENLTAK [-----]239	
ADH1	152	AVITNPQTKEKVGIGYRNTFPVLSLVDPVEMKTLPKDQTAYTSMDFYHAI EAFLNVNANPYSVDVLALDAMKRIVTYLPV	231
ADH2	149	AVLTNSETKDKKSIKNSMYAKASIIDPELMVTMPKHIIASVGFDA LAHNMEAYLSNGRNPLADVQAIYGIELISENLIK	228
ADH/D1	240	AVEDGEDIKAREKMAVADTYAGLSNTISGTTLRHAMAHPI SGYPDISHGQALASISVPIMEHNIENGDE [4] RYSRIAV	320
ADH1	232	AYENGEDMEARTNLAWASTEAGITETLTGVIANHALEHGLSGFYPEITHGLGLGCITGPYLFYIFDHA-- -YERLAI	305
ADH2	229	VYNDVNDLEAWEKITLASTIGGMTIGTAGTALPHGMEHPVSGLR-DVMHGKGLAALTPTIIESSWSDSIE RFGNISK	304
ADH/D1	321	ALDASKPVDNT-RQAASKAVDGLKNLLRSLDLKPLSELGVEEEKIPEMTEGAFIYMGGGIE-----	398
ADH1	306	VGREVFVGYETDGRKAGRLAIKKLRDFQEMFGLNKRLSELGVKKE DIPKMAETGYRI LINGVV-----	385
ADH2	305	VLGGTCAEDCSD-----AIRNFLKKIDLDIKLSDLGIEKSDIDWLTDCMKISVANI-----	374
ADH/D1	399	--- 401	
ADH1	386	--- 387	
ADH2	375	--- 376	

Abbildung 8.7: Darstellung der Aminosäuresequenz der Alkoholdehydrogenase ADH/D1. Vergleich dieser Sequenz mit den Aminosäuresequenzen zweier weiterer Alkoholdehydrogenasen von *Thermogata maritima* (ADH1) und *Peptoclostridium difficile* Stamm 630 (ADH2). Die farbig hinterlegten Aminosäure in der Sequenz zeigen die zur Koordination des Fe²⁺ Ions wichtigen Aminosäuren. Die Sequenz wurde vom Computational Bioscience Resaerch Center (CBRC), vom Red Sea Resaerch Center (RSRC) sowie vom KAUST Catalysis Center zur Verfügung gestellt.

Ein halophiles und thermophiles Enzym kann als solches bezeichnet werden, wenn katalytische Umsetzungen in einem Bereich von 2 – 5 M NaCl oder KCl bei einer Temperatur von 60 – 80°C stattfinden können (van den Burg 2003). Somit kann, die in dieser Arbeit charakterisierte, ADH/D1 als halophil und thermophil bezeichnet werden, da sie eine maximale spezifische Aktivität von 2,5 U mg⁻¹ mit Cinnamylalkohol als Substrat bei 3 – 4 M KCl, 75°C und pH 10 aufweist. Zur Evaluierung der ADH/D1 werden in Tabelle 8.3 die maximalen spezifischen Aktivitäten verschiedener, in der Literatur publizierter extremophiler Alkoholdehydrogenasen miteinander verglichen. Alle genannten Enzyme katalysieren die Umsetzung primärer Alkohole zu Aldehyden. Alle dargestellten Enzyme sind bei Salzkonzentrationen von 2 – 4 M und einem pH von pH 10 – pH 11 stabil. Der optimale Temperaturbereich liegt zwischen 60

und 85°C. Die höchste spezifische Aktivität von 9,85 U mg⁻¹ (pH 9, 4 M KCl) kann bei NpADH aus *Natronomas pharaonis* beobachtet werden (Cao, Liao et al. 2008). Die geringste spezifische Aktivität von 0,27 U mg⁻¹ (60°C, pH 10, 2 M KCl) weist ADH12 aus *Haloarcula marismortui* auf (Timpson, Alsafadi et al. 2012). Die für die Alkoholdehydrogenase ADH/D1 berechnete maximale spezifische Aktivität von 2,5 U mg⁻¹ befindet sich daher in der gleichen Größenordnung der bereits publizierten extremophilen Alkoholdehydrogenasen.

In Tabelle 8.4 sind die Alkoholdehydrogenasen, die Cinnamylalkohol katalytisch zu Cinnamaldehyd umsetzen, dargestellt. Die bisher publizierten Cinnamyl-Alkoholdehydrogenasen zeigen alle mesophile Optima. Die katalytische Umsetzung von Cinnamylalkohol zu Cinnamaldehyd erfolgt im Durchschnitt in einem pH Bereich von 7,5 – 8,8. Jedoch weisen die hier aufgeführten mesophilen Enzyme, im Gegensatz zu ADH/D1 keine Salztoleranz auf. Um die in der Tabelle dargestellten maximalen spezifischen Aktivität der einzelnen Enzyme zu erreichen (0,02 bis 26,1 U mg⁻¹ (Vidal, Lopez-Maury et al. 2009, Pandey, Pandey et al. 2011)), wurden alle Reaktionen im salzfreien Medium durchgeführt. Die optimale Temperatur liegt bei allen aufgeführten mesophilen Enzymen bei 37°C. ADH/D1 zeigt im Vergleich zu den mesophilen Cinnamylalkoholdehydrogenasen keine höhere maximale spezifische Aktivität (2,5 U mg⁻¹). Jedoch zeigen sie in Bezug auf die charakterisierten Salz-, Temperatur- und pH-Optima ein Alleinstellungsmerkmal, da die bereits publizierten mesophilen Cinnamylalkoholdehydrogenasen keine Aktivität bei 3 – 4 M KCl, 60 – 75°C und pH 10 aufweisen.

Eine Besonderheit ergibt sich bei der Metallabhängigkeit der Enzyme. Die in Tabelle 8.3 und 8.4 dargestellten Enzyme sind Fe²⁺ bzw. Zn²⁺ abhängig. ADH/A1 wurde durch den PPM Algorithmus als Fe²⁺ Alkoholdehydrogenase annotiert (Grötzinger, Alam et al. 2014). Jedoch konnte bei der Überprüfung der Metallabhängigkeit keine Aktivität mit Fe²⁺ inkubiertem ADH/D1 beobachtet werden. Eine moderate Aktivität von 0,5 U mg⁻¹ konnte in Verbindung mit Zn²⁺ beobachtet werden. Durch die Inkubation des ADH/D1 mit einer Mn²⁺ Salzlösung konnte die maximale spezifische Aktivität um das Fünffache auf 2,5 U mg⁻¹ gesteigert werden. Ein Indiz, dass es sich bei ADH/D1 natürlicherweise um eine Zn²⁺ und nicht um eine Mn²⁺ abhängige Alkoholdehydrogenase handelt, stellen die ermittelten Michaelis-Menten Konstanten (K_M Werte) dar. Die Michaelis-Menten-Konstanten für die Substrate

Cinnamylalkohol (0,56 mM) und 1-3-Propanediol (55,00 mM) sind bei Zn^{2+} inkubiertem Enzym deutlich kleiner als bei Mn^{2+} inkubiertem Enzym (0,81 mM und 171,81 mM). Damit ist die Bindungsaffinität der Substrate zum Zn -ADH/D1 inkubierten Enzym deutlich höhere als zu Mn -ADH/D1. Eine Veränderung der Aktivität von Alkoholdehydrogenasen durch eine Metallsubstitution wurde bereits in verschiedenen Literaturquellen diskutiert. Durch die Substitution von Zn^{2+} mit Co^{2+} wurde eine Verminderung der Aktivität beobachtet (Maret, Andersson et al. 1979). Hingegen konnte bei der Substitution mit Mn^{2+} eine Erhöhung um 400% der Aktivität einer ADH, isoliert aus Hefe, erreicht werden (Dickenson and Dickenson 1976). Coleman und Weiner (1973) erreichten durch die Substitution von Zn^{2+} mit Mn^{2+} in einer Alkoholdehydrogenase von *Saccharomyces cerevisiae* eine Verdreifachung der Aktivität (Coleman and Weiner 1973). Das Zn^{2+} Kation in Alkoholdehydrogenase ist im katalytischen Zentrum lokalisiert und im Tetramer mit Cys-46, Cys-174, His67 und einem Wassermolekül gebunden. Des Weiteren stabilisiert das Kation die Tertiär- oder Quartärstruktur des Enzyms (Makinen and Moon 1981). Durch den Austausch der Zn^{2+} Ionen und der Substitution mit anderen Ionen können sich daher Unterschiede in der katalytischen und sterischen Beschaffenheit des Enzyms ergeben. Möglicherweise veränderte das substituierte Mn^{2+} durch ihren zum Zn^{2+} differierenden Ionenradius den Abstand der für die katalytische Umsetzung benötigten Aminosäurereste, wodurch die Aktivitätssteigerung der ADH/D1 erklärt werden könnte. Eine abschließende und detaillierte Erklärung zu diesem Phänomen und die finale Klärung der Metallabhängigkeit kann jedoch nur durch eine Strukturaufklärung realisiert werden.

Tabelle 8.3: Vergleich der heterolog exprimierten Alkoholdehydrogenase ADH/D1 mit anderen extremophilen Alkoholdehydrogenasen

Enzym	Stamm	Temperatur- optimum	pH- Optimum	Salz- optimum	Max. Aktivität	Substrat	Quelle
HvADH1	<i>Haloferax volcanii</i>	80°C	10,0 – 11,0	3 – 4 M KCl	3,65 U mg ⁻¹	1-Propanol/Ethanol	(Timpson, Liliensiek et al. 2013)
HvADH2	<i>Haloferax volcanii</i>	85°C	10,0 – 11,0	2 – 4 M KCl	5,01 U mg ⁻¹	1-Propanol	(Timpson, Liliensiek et al. 2013)
ADH12	<i>Haloarcula marismortui</i>	60°C	10,0	2 M KCl	0,27 U mg ⁻¹	Ethanol	(Timpson, Alsafadi et al. 2012)
NpADH	<i>Natronomas pharaonis</i>	70°C	9,0	4 M KCl	9,85 U mg ⁻¹	Ethanol	(Cao, et al., 2008)
ADH/D1	---	75°C	10,0	3 M KCl	2,5 U mg ⁻¹	Cinnamylalkohol	-----

Tabelle 8.4: Vergleich der heterolog exprimierten Alkoholdehydrogenase ADH/D1 mit anderen Alkoholdehydrogenasen (Cinnamylalkohol Dehydrogenasen CAD), die ebenfalls Cinnamylalkohol als Substrat nutzen.

Enzym	Stamm	Temperatur- optimum	pH- Optimum	Salz- optimum	Max. Aktivität	Substrat	Quelle
CAD	<i>Leucaena leucocephala</i>	37°C	8,8	---	0,02 U mg ⁻¹	Cinnamylalkohol	(Pandey, Pandey et al. 2011)
CAD	<i>Heliobacter pylori</i>	37°C	7,5	---	3,56 U mg ⁻¹	Cinnamylalkohol	(Mee, Kelleher et al. 2005)
CAD	<i>Saccharomyces cerevesiae</i>	37°C	8,0	---	26,1 U mg ⁻¹	Cinnamylalkohol	(Vidal, Lopez-Maury et al. 2009)
ADH/A1	---	60°C	10,0	4 M KCl	0,26 U mg ⁻¹	Cinnamylalkohol	Anastassja Akal
ADH/D1	---	75°C	10,0	3 M KCl	2,5 U mg ⁻¹	Cinnamylalkohol	-----

8.2 Dihydrodipicolinat Reduktasen

Im Folgenden werden die beiden Dihydrodipicolinat Reduktasen aus dem Metagenom der Solebecken Atlantis II (DR/A1) und Discovery (DR/D1) charakterisiert.

8.2.1 Substratspektrum und Cofaktorspezifität

Das natürliche Substrat von Dihydrodipicolinat-Reduktasen ist 2,3-Dihydropyridin-2,6-dicarboxylsäure. Das Substrat konnte nicht käuflich erworben werden. Auch eine Synthese ist sehr aufwändig und kostenintensiv. Daher wurde mit den Substraten, aufgeführt in Tabelle 12.2 und mit NAD(P)H als Cofaktor die Aktivität des Enzyms bestimmt. Eine katalytische Umsetzung von Citraconsäureanhydrid zu Methylsuccinat Anhydrid (siehe Abbildung 8.8) mit NADH als Cofaktor konnte beobachtet werden. Generell konnte mit NADPH keine Umsetzung festgestellt werden

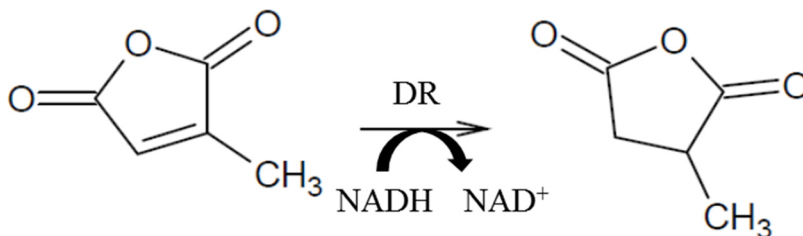


Abbildung 8.8: Reaktion des Substrates Citraconsäure Anhydrid zum Produkt Methylsuccinat Anhydrid

8.2.2 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

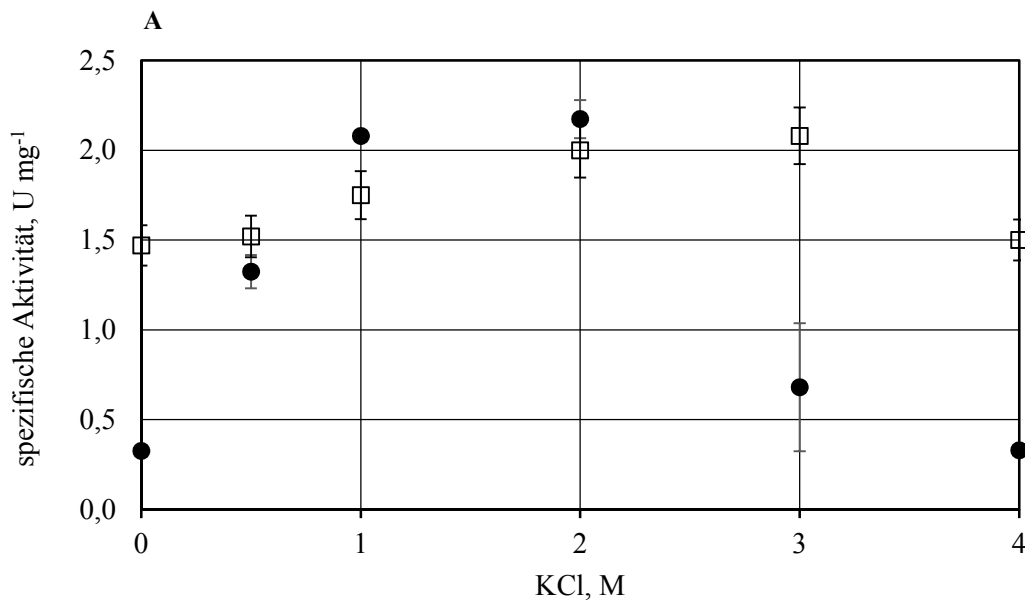
Dihydrodipicolinat Reduktase DR/A1

In Abbildung 8.9 sind die Ergebnisse zur Charakterisierung der Dihydrodipicolinat Reduktase DR/A1 hinsichtlich Temperatur, Salz und pH dargestellt. Die Bestimmung des Salz- und Temperaturoptimums erfolgte für zwei unterschiedliche Bedingungen: bei pH 7,5 und 35°C, sowie bei pH 9,0 und 30°C. Eine deutliche Abhängigkeit von der Salzkonzentration ist bei pH 7,5 und 35°C zu beobachten (A). Die höchste spezifische Aktivität von 2,2 U mg⁻¹ wurde bei 1

– 2 M KCl bestimmt. Eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 3 M oder 4 M KCl vermindert die spezifische Aktivität auf $0,75 \text{ U mg}^{-1}$ beziehungsweise $0,45 \text{ U mg}^{-1}$. Durch die Änderung des pH auf pH 9,0 und die Verminderung der Temperatur auf 30°C ist ein Anstieg der spezifischen Aktivität von 0 M KCl ($1,5 \text{ U mg}^{-1}$) bis 3 M KCl ($2,15 \text{ U mg}^{-1}$) zu beobachten. Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration auf 4 M KCl reduziert die spezifische Aktivität auf $1,5 \text{ U mg}^{-1}$.

DR/A1 wies bei pH 7,5 ein breites Temperaturoptimum zwischen 35 und 45°C auf. Bei pH 9 liegt das Optimum bei 30°C . Eine zunehmende Temperatur bis 50°C führt zur Abnahme der Aktivität auf $0,5 \text{ U mg}^{-1}$ (Abbildung 8.9 B). Es konnte eine Aktivierungsenergie von $254,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ errechnet werden.

Bei einer Reaktionstemperatur von 35°C liegt das pH Optimum bei pH 7,5. Bei pH 8 und pH 9 konnte eine Reduktion der spezifischen Aktivität auf $0,5 \text{ U mg}^{-1}$ beobachtet werden (siehe Abbildung 8.9 C).



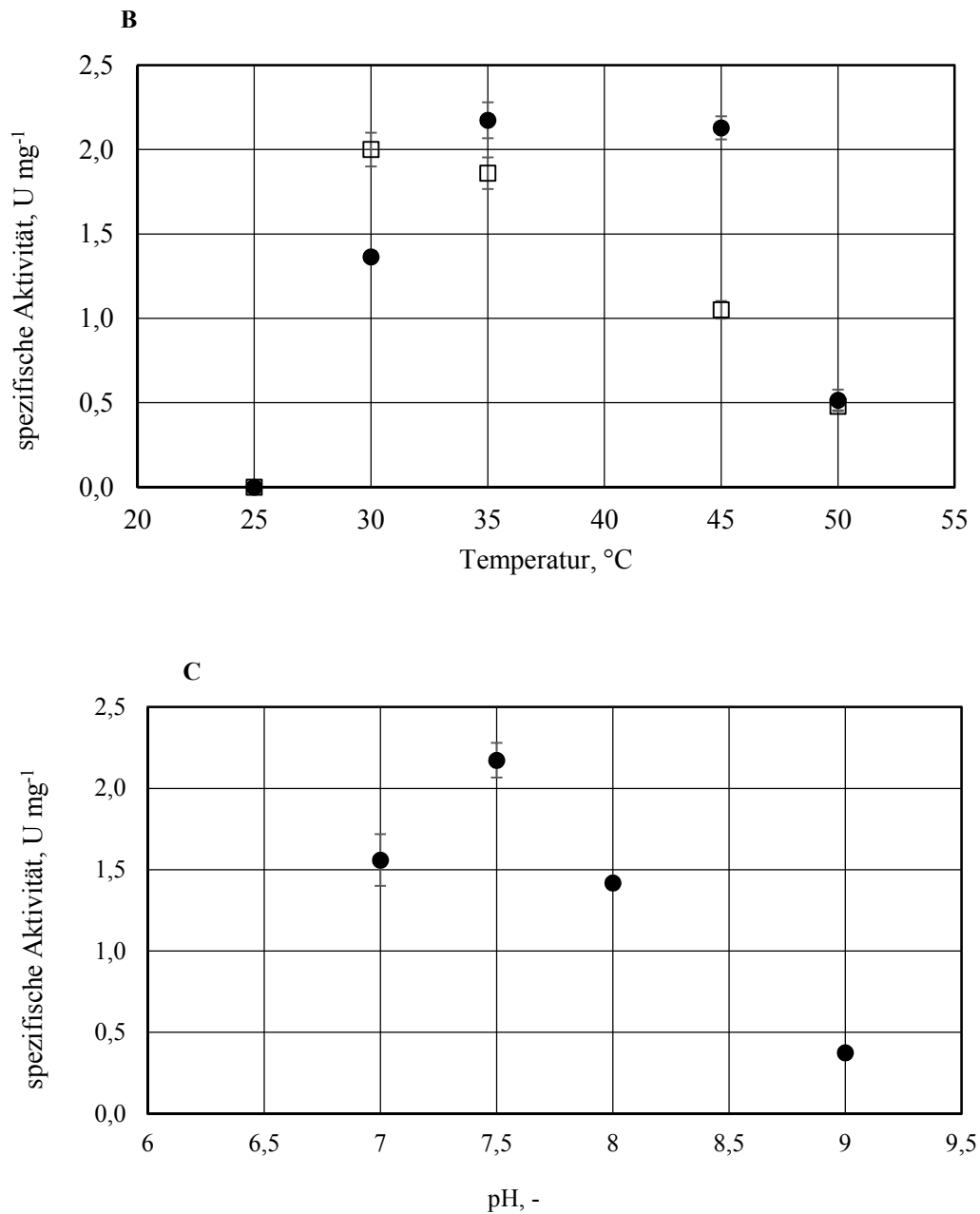
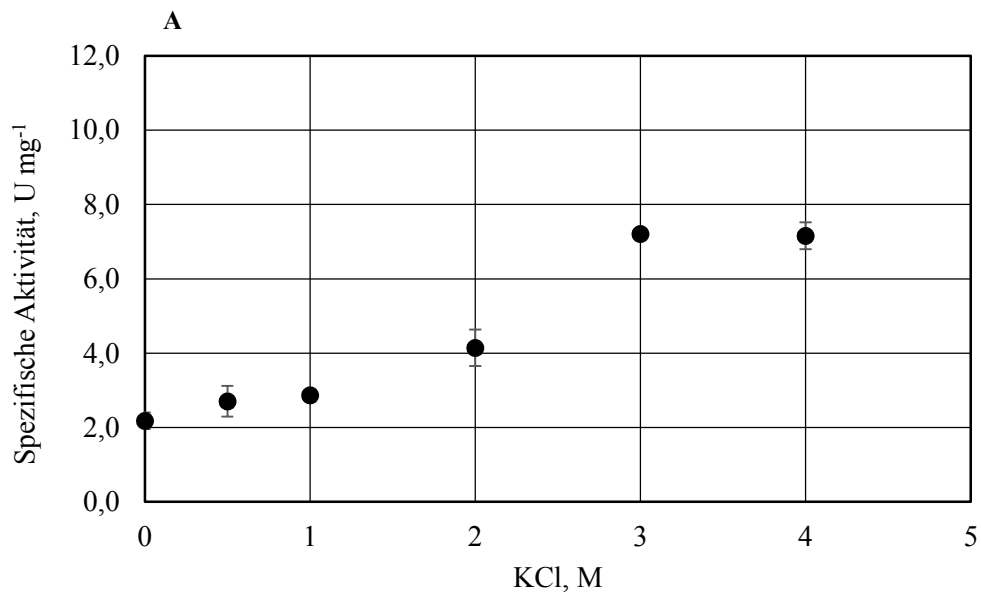


Abbildung 8.9: Darstellung der spezifischen Aktivität von 3 μ M DR/A1. Katalytischen Umsetzung von 30 μ M Citraconsäureanhydrid mit 5 mM NADH bei A) variierenden KCl Konzentrationen von 0 – 4 M, 35°C in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) (●) 30°C in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 9) (□), B) variierenden Temperaturen von 25 – 50°C 35°C in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) (●) 30°C in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 9) (□) und C) variierender pH von 7 – 9 35°C in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5).

Dihydrodipicolinat Reduktase DR/D1

Die Dihydrodipicolinat Reduktase DR/D1 zeigt im Vergleich zu DR/A1 höhere spezifische Aktivitäten. Die höchste spezifische Aktivität von $7,55 \text{ U mg}^{-1}$ wurde bei einer optimalen KCl Konzentration von 3 M und einer optimalen Reaktionstemperatur von 40°C beobachtet (siehe Abbildung 8.10 A und B). Unter der Benutzung der Arrhenius Gleichung konnte eine Aktivierungsenergie von $57,63 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet werden. Durch die Erhöhung des pH auf 7,8 konnte eine spezifische Aktivität von $9,12 \text{ U mg}^{-1}$ erreicht werden (siehe Abbildung 8.10 C).



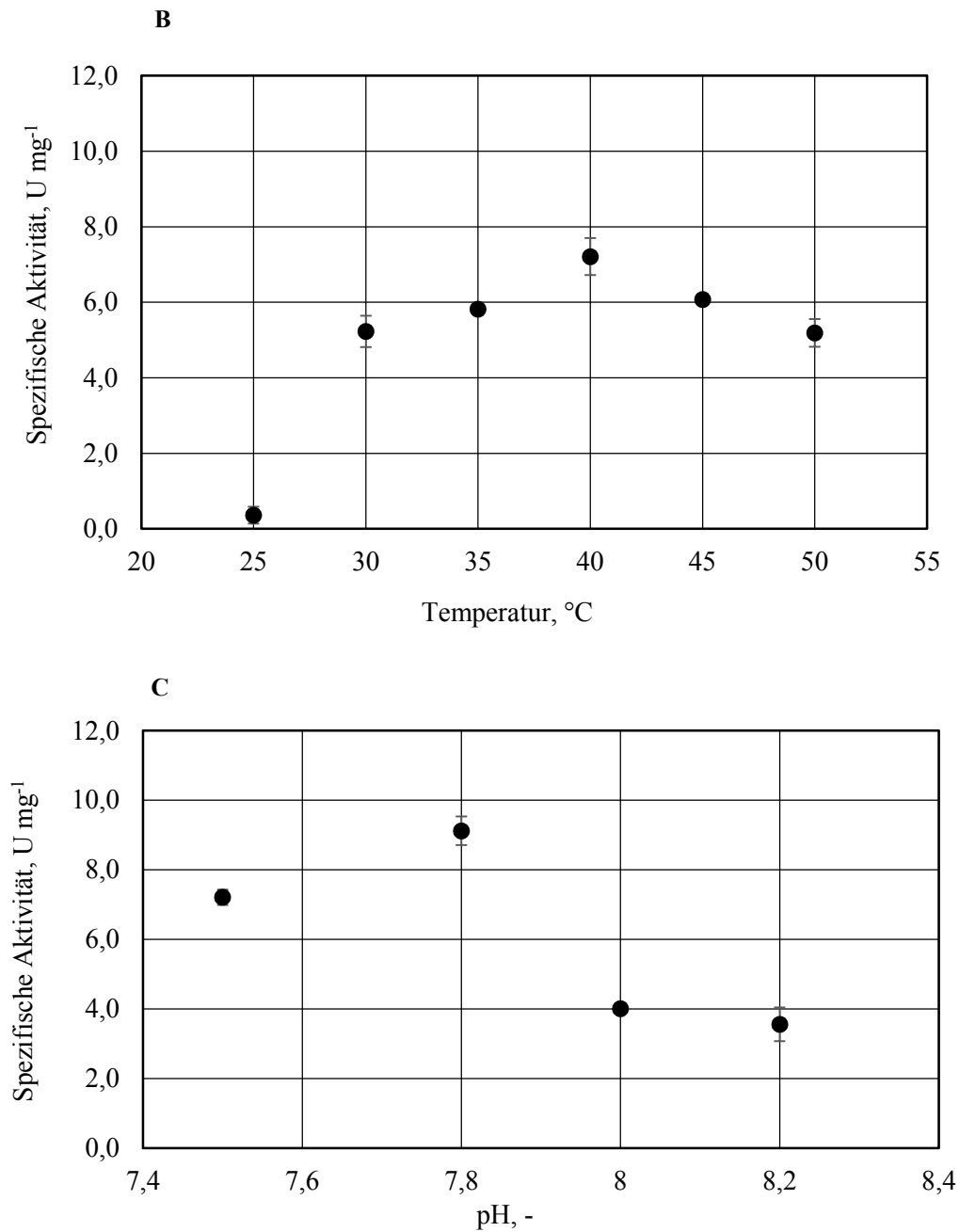


Abbildung 8.10: Darstellung der spezifischen Aktivität von 3 μM DR/D1. Katalytische Umsetzung von 30 μM Citraconsäureanhydrid mit 5 mM NADH bei A) variierenden KCl Konzentrationen von 0 – 4 M, 40°C in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5), B) variierenden Temperaturen von 25 – 50°C in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) und C) variierendem pH von pH 7,5 bis pH 8,2 bei 40°C in Kaliumphosphatpuffer (50 mM).

8.2.3 Bestimmung kinetischer Parameter

Die Michaelis-Menten Konstanten (siehe Tabelle 8.5) des Substrats Citraconsäureanhydrid wurden für beide Enzymen mit 190,16 mM (DR/A1) und 97,33 mM (DR/D1) bestimmt. Die, für den Cofaktor NADH, berechneten Michaelis-Menten Konstanten lagen für DR/A1 bei 10,22 mM und für DR/D1 bei 21,73 mM. Aufgrund der höheren spezifischen Aktivität von DR/D1 wiesen die Wechselzahlen zur Umsetzung von NADH ($50,70 \text{ s}^{-1}$) und Citraconsäureanhydrid ($83,34 \text{ s}^{-1}$) höhere Werte auf, als bei DR/A1.

Tabelle 8.5: maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} , Michaelis-Menten-Konstante K_M und Wechselzahl k_{cat} für die Dihydrodipicolinat Reduktasen DR/A1 (Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH9) mit 2 M KCl, 30°C) und DR/D1 (Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5), mit 3 M KCl 35°C) mit den Substraten 500 mM NADH und 300 mM Citraconsäureanhydrid.

Enzym	Substrat	v_{\max} , U mg^{-1}	K_M , mM	k_{cat} , s^{-1}
DR/A1	NADH	$3,55 \pm 0,47$	$10,22 \pm 1,31$	$39,40 \pm 3,52$
	Citraconic Anhydrid	$2,65 \pm 0,35$	$190,16 \pm 26,31$	$29,40 \pm 1,42$
DR/D1	NADH	$4,52 \pm 0,45$	$21,73 \pm 0,31$	$50,70 \pm 6,74$
	Citraconic Anhydrid	$7,54 \pm 0,95$	$97,33 \pm 15,61$	$83,34 \pm 8,40$

8.2.4 Lagerstabilität

Zur Evaluation der Lagerstabilität wurde frisch aufgereinigtes Protein zu 200 μL Anteilen in 2 mL Reagenzgefäße gegeben und bei -20°C , 4°C und 25°C gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde die Aktivität von DR/D1 und DR/A1 bestimmt. Für die Aktivitätsbestimmung bei -20°C wurde nur frisch aufgereinigtes und eingefrorenes Enzym verwendet. Generell sind die Halbwertszeiten bei allen drei Lagertemperaturen für DR/A1 geringer als für DR/D1 (s. Abbildung 8.11). Bei einer Lagertemperatur von -20°C konnten für DR/D1 und DR/A1 die höchsten Halbwertszeiten von 610 h und 500 h bestimmt werden. Durch die Erhöhung der Lagertemperatur auf 25°C wurde die Halbwertszeit der Enzyme bis auf ein Minimum von 102 h (DR/D1) und 88,3 h (DR/A1) reduziert.

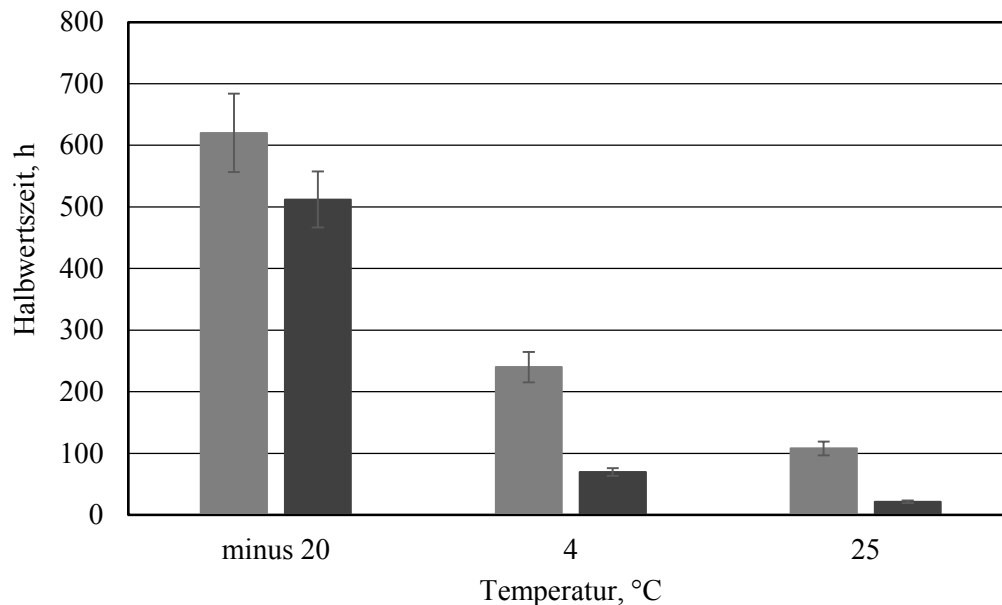


Abbildung 8.11: Halbwertszeiten des Aktivitätsverlusts von DR/A1 (■) und DR/D1 (▒) bei einer Lagertemperatur von -20°C, 4°C und 25°C.

8.2.5 Diskussion

Enreduktasen sind für die Generierung chiraler Moleküle durch die asymmetrische Reduktion von Alkenen sehr wichtig. Durch die Reduktion einer Kohlenstoffdoppelbindung können bis zu zwei Stereozentren entstehen. Für die Industrie ist eine selektive Umsetzung des Substrats mit einer hohen Stereoselektivität unerlässlich. Die aus den Solebecken Discovery und Atlantis II isolierten Dihydrodipicolinat Reduktasen sollten somit hinsichtlich Stereoselektivität und Regioselektivität gegenüber verschiedenen Alkenen (Fu, Hoelsch et al. 2012) charakterisiert werden. Von allen getesteten Substraten konnte jedoch nur mit Citraconsäureanhydrid eine katalytische Umsetzung beobachtet werden. Aktivitätsmessungen mit dem natürlichen Substrat Dihydrodipicolinat konnten nicht durchgeführt werden, da Dihydrodipicolinat nicht käuflich zu erwerben war.

Die ermittelten Michaelis-Menten Konstanten für Citraconsäureanhydrid sind für beide Enzyme mit 190,17 mM (DR/A1) und 97,33 mM (DR/D1) höher als der ermittelte K_M für das natürliche Substrat (0,031 – 0,77 mM (Kimura and Goto 1975, Scapin, Reddy et al. 1997)).

Dies resultiert aus der Tatsache, dass es sich bei Citraconsäureanhydrid nicht um das natürliche Substrat handelt und somit die Bindungsaffinität geringer ist.

In Abbildung 8.12 ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz von DR/D1 dargestellt. Des Weiteren ist ein Vergleich dieser Sequenz mit zwei weiteren Aminosäuresequenzen von zwei Dihydrodipicolinat Reduktasen (DR1 und DR2) gezeigt. Diese Dihydrodipicolinat Reduktasen zeigen mit DR/D1 die größte Sequenzhomologie 51% (DR1) und 35% (DR2). DR1 ist eine Dihydrodipicolinat Reduktase aus *Methanothermobacter*, wohingegen DR2 aus *Shewanella oneidensis* MR-1.

DR/D1	10	-----GACGRMGQRITKTVSNQEDMKIAAAIDKPGTPRAGEDIGKIASVEKLGVEVRGADEIEDVLTEANPDVLV	79
DR1	10	-----GACGRMGSGIIRRVLEEDMELVAAIEAPGTPLRGRDIGEFTGRGSGVGEVTDASNLADTLAETEPDVLV	77
DR2	10	-----GAGGRMGRTLIESAYHQEHIRLGAAIERPGSSLVGVDAGELAGVGKLNIMIMDSLDY----ATDDFDVLI	76
DR/D1	80	DFTIAKAAVENVKAAANAGLPVVVGTGTFSDQMKEMEKSIQEAETPAIIASNMSLGVNVFFKMVEEVAEKLGEY-DMEL	158
DR1	78	DFTVASAAVETIKTSTEAGVNLVVGTGTFSEEMQTVRDCIERSGVRAVIAPNMAVGVNVFFKVLRLDAPILSDY-DVEI	156
DR2	77	DFTAPEASIVHLDWCVRHKKAMVIGTTGFNHAQKEQINAFAEQT--PVVMAPNMSVGVNLMWKLLELAAEVMGDYtDIEI	154
DR/D1	159	IETHHNQKIDAPSGTALTAAKIAAEASGKDLEKVAKFGRKkGELGKRPKDEIGIHSVRAGDITGEHSFMFAGPSEERVEVS	238
DR1	157	IEAHRHKKDAPSGTAVRALEVISEATGRRASEVAVHGRS-GLTGERSRDEIGVHAVRGGDIVGDHIVLFAGDGERLEIV	235
DR2	155	IEGHHRYKKDAPSGTALKMGEVIAKTLGRDLEKCAVYGRE-GITGERDRETIGFATVTRAGDLVGEHTAMFADIGERLEIT	233
DR/D1	239	-----	277
DR1	236	-----	273
DR2	234	-----	270

Abbildung 8.12: Darstellung eines Ausschnitts der Aminosäuresequenz der Dihydrodipicolinat Reduktase DR/D1. Vergleich dieser Sequenz mit den Aminosäuresequenzen zweier weiterer Dihydrodipicolinat Reduktasen von *Methanothermobacter* (DR1) und *Shewanella oneidensis* MR-1 (DR2). Die Sequenz wurde vom Computational Bioscience Research Center (CBRC), vom Red Sea Research Center (RSRC) sowie vom KAUST Catalysis Center zur Verfügung gestellt.

Abbildung 8.13 zeigt ein Ausschnitt der Sequenz der Dihydrodipicolinat Reduktase DR/A1. Die größte Übereinstimmung dieser Sequenz ist ebenfalls mit den oben genannten Dihydrodipicolinat Reduktasen DR1 (52%) und DR2 (44%) gegeben.

DR/A1	10	-----ACGRMGRRIIKTISAQEDMKVVAIEAPDSPQIGEDAGKTAGIGKIGVKVIGSDKLEELKSKADVLV	79
DR1	7	-----ACGRMGSGIIRRVLEEDMELVAAIEAPGTPLRGRDIGEFTGRGSVGVVEVTDASNLADTLAETEPDVLV	77
DR2	12	-----AGGRMGRTLIESAYHQEHIRLGAAIERPGSSLVGVDAGELAGVGKLNIMIMDSLDYATD----DFDVLII	76
DR/A1	80	DFTVAEAAVKNVEVGAKAGVAIVVGGTTFSEEQKNRMEKAIQNAEVPAAIAPNMSVGVNVFFKLAEQAALLLKNY--DVEL	158
DR1	78	DFTVASAAVETIKTSTEAGVNLVGGTTFSEEEEMQTVRDCIERSGVRAVIAPNMAVGVNVFFKVLRLDAPILSDY--DVEI	156
DR2	77	DFTAPEASIVHLDWCVRHKKAMVIGTTGFNHAQKEQINAFAEQTPV--VMAFNMSVGVNLMWKLLELAAEVMGDYtDIEI	154
DR/A1	159	VETHHDKKLDAPSGTAMKAAEIVAKSTDRELDKVAKFGRpKGELGERPKDEIGIHSVRAGDVTGEHELIFAGPSEERLELI	238
DR1	157	IEAHHRHKKDAPSGTAVRALEVI SEATGRRASEVAVHGR--SGLTGERSRDEIGVHAVRGGDIVGDHIVLDFAGDGERLEIV	235
DR2	155	IEGHHRYYKKDAPSGTALKMGEVIAKTLGRDLEKCAVYGR--EGITGERDRETIGFATVRAGDLVGEHTAMFADIGERLEIT	233
DR/A1	239	-----	277
DR1	236	-----	273
DR2	234	-----	270

Abbildung 8.13: Darstellung eines Ausschnitts der Aminosäuresequenz der Dihydrodipicolinat Reduktase DR/A1. Vergleich dieser Sequenz mit den Aminosäuresequenzen zweier weiterer Dihydrodipicolinat Reduktasen von *Methanothermobacter* (DR1) und *Shewanella oneidensis* MR-1 (DR2). Die Sequenz wurde vom Computational Bioscience Resaerch Center (CBRC), vom Red Sea Resaerch Center (RSRC) sowie vom KAUST Catalysis Center zur Verfügung gestellt.

In Tabelle 8.6 sind die maximalen spezifischen Aktivitäten für einige in der Literatur publizierte Dihydrodipicolinat Reduktasen dargestellt und mit den Dihydrodipicolinat Reduktasen aus den Solebecken verglichen. Bisherige in der Literatur publizierte Arbeiten konzentrierten sich auf die Inaktivierung der Dihydrodipicolinat Reduktase zum Beispiel im Mikroorganismus *Mycobacterium tuberculosis*, um neue Ansätze zur Bekämpfung der Tuberkulose zu erlangen (Paiva, Vanderwall et al. 2001, Mdluli and Spigelman 2006, Zhang, Post-Martens et al. 2006).

Die Enzyme erreichen bei der katalytischen Umsetzung von Dihydrodipicolinat spezifische Aktivitäten von 1,15 – 1,39 U mg⁻¹ (Temperatur 25 – 30°C, pH 7,5 – 7,8). Die Enzyme weisen keine bzw. nur eine sehr geringe Salztoleranz auf. Die maximalen spezifischen Aktivitäten der aus den Solebecken isolierten Enzyme liegen mit 7,1 (DR/D1) beziehungsweise 2,2 U mg⁻¹ (DR/A1) höher als die der publizierten Biokatalysatoren. Im Gegensatz zu den mesophilen Bedingungen der publizierten Dihydrodipicolinat Reduktasen sind DR/D1 und DR/A1 bei Salzgehalten von 3 – 4 M KCl und einer Temperatur von 35 – 45°C aktiv. An den beiden Dihydrodipicolinat Reduktasen aus den Solebecken kann der Vorteil von neuen Biokatalysatoren aus entlegenen und extremen Habitaten ausgemacht werden. Durch den

Einsatz extremophiler Biokatalysatoren können die Reaktionsbedingungen für die katalytische Umsetzung eines Substrats erweitert werden. In diesem Fall könnte die Reaktion in einem Temperaturbereich von 25 – 45°C, einem Salzgehalt von 0 – 4 M KCl und einem pH Bereich von pH 7,5 – pH 9,0 durchgeführt werden. Durch die weitere Etablierung passender extremophiler Biokatalysatoren müssen industrielle Prozesse nicht den Bedingungen des Enzyms angepasst werden, sondern ein passendes Enzym kann für einen bestimmten Prozess ausgesucht werden.

Tabelle 8.6 Vergleich der heterolog exprimierten Dihydrodipicolinat Reduktasen DR/D1 und DR/A1 mit anderen Dihydrodipicolinat Reduktasen aus der Literatur.

Enzym	Stamm	Temperatur- optimum	pH- Optimum	Salz- optimum	Max. Aktivität	Substrat	Quelle
Dihydrodipicolinat-reduktase	<i>Escherichia coli</i>	25°C	7,8	---	1,39 U mg ⁻¹	Dihydrodipicolinat	(Reddy, Sacchettini et al. 1995)
Dihydrodipicolinat-reduktase	<i>Lactobacillus plantarum</i>	30°C	7,5	---	1,15 U mg ⁻¹	Dihydrodipicolinat	(Cahyanto, Kawasaki et al. 2006)
Dihydrodipicolinat-reduktase	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	30°C	7,5	---	1,33 U mg ⁻¹	Dihydrodipicolinat	(Cremer, Eggeling et al. 1991)
DR/D1	---	40°C	7,5	3 – 4 M KCl	7,1 U mg ⁻¹	Citraconsäureanhydrid	---
DR/A1	---	35 – 45°C	9,0	3 M KCl	2,2 U mg ⁻¹	Citraconsäureanhydrid	---

9 Ganzzellbiokatalyse mit *Haloferax volcanii* H1895

Die bisher betrachteten Umsetzungen vom Alkohol zum Aldehyd, charakterisiert durch die Alkoholdehydrogenase ADH/D1, konnten bei pH 10 und nicht im neutralen Bereich beobachtet werden. Die für die Ganzzellbiokatalyse eingesetzten Zellen, sind jedoch im alkalischen Bereich nicht stabil. Bei längerer Inkubation der Zellen in pH 10 konnte eine Lyse der Zellen beobachtet werden. Somit wurde für die Untersuchung der Ganzzellbiokatalyse die Reaktion von Aldehyd zum Alkohol betrachtet, da Vorversuche zeigten, dass diese Reaktion bei pH 7 bis pH 8 stattfindet.

9.1 Einfluss von 1-Pentanal, 1-Heptanal und Cinnamaldehyd

Als mögliche Substrate für die Ganzzell-Biotransformation wurden 1-Pentanal, 1-Heptanal und Cinnamaldehyd gewählt. Um die Auswirkung der Substrate auf *Haloferax volcanii* H1895 zu untersuchen, wurde *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-ADH/D1 im Schüttelkolben im Komplexmedium Hv-YPC kultiviert und die Substrate einzeln im Konzentrationsbereich 1 – 10 mM hinzugegeben. Cinnamaldehyd führte in jeder Konzentration zur Zellyse. Bei der Zugabe von >1 mM 1-Heptanal wurde eine ausgeprägte Biofilmbildung an der Glaswand des Schüttelkolbens beobachtet, sodass im Medium objektiv kein Wachstum mehr zu verzeichnen war. Im Konzentrationsbereich von 1 – 10 mM beeinflusste 1-Pentanal das Wachstum von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-ADH/D1 nicht (siehe Abbildung 9.1). Somit wurden die weiteren Versuche zur Ganzzell-Biotransformation mit 1-Pentanal durchgeführt.

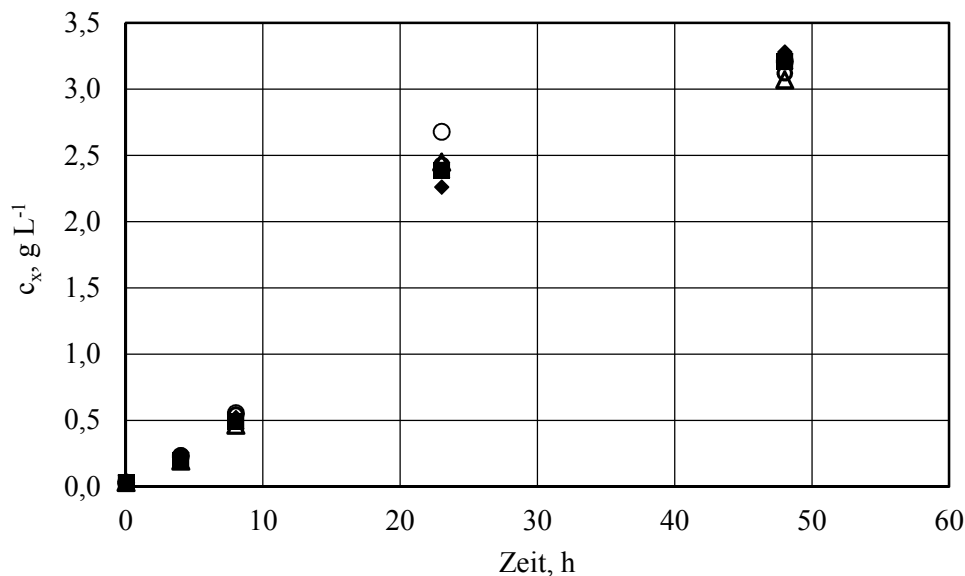


Abbildung 9.1: Biotrockenmasskonzentration bei der Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-ADH/D1 im 250 mL Schüttelkolben in 50 mL sterilem Hv-YPC Medium (○), mit 1 mM (■), 5 mM (▲) und 10 mM (◆) 1-Pentanal.

9.2 Parameterstudien

Die Expression von ADH/D1 in *Haloferax volcanii* H1895 erfolgte unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 7.1). Die Zellen wurden nach der Satzkultivierung geerntet und in frischem Hv-YPC Medium resuspendiert. Je nach Bedarf wurden Biomassekonzentrationen von 0,25 – 27 g L⁻¹ eingestellt. Die durchgeführte Ganzzellbiokatalyse zur Umsetzung von 1-Pentanal zu 1-Pentanol wurde im Hinblick auf Zellkonzentration und Substratkonzentration genauer untersucht.

In Abbildung 9.2 ist die gebildete 1-Pentanol Konzentration bei unterschiedlicher Biokatalysatorkonzentrationen dargestellt. Mit Zunahme der Biokatalysatorkonzentration ist ein Anstieg in der umgesetzten Menge von 1 g L⁻¹ 1-Pentanal zu 1-Pentanol zu beobachten. Nach einer Stunde Inkubation bei 45°C konnte mit einer Biotrockenmasskonzentration von 20 g L⁻¹ 0,81 g L⁻¹ 1-Pentanol im Medium nachgewiesen werden. Wohingegen bei einer Zellkonzentration von 0,25 g L⁻¹ nach einer Stunde erst eine Konzentration von 0,18 g L⁻¹ 1-Pentanol nachgewiesen werden konnte. Nach einer Inkubationszeit von insgesamt 3 h konnte bei einer Biotrockenmasskonzentration ab 10 g L⁻¹ eine vollständige Umsetzung des Substrats beobachtet werden.

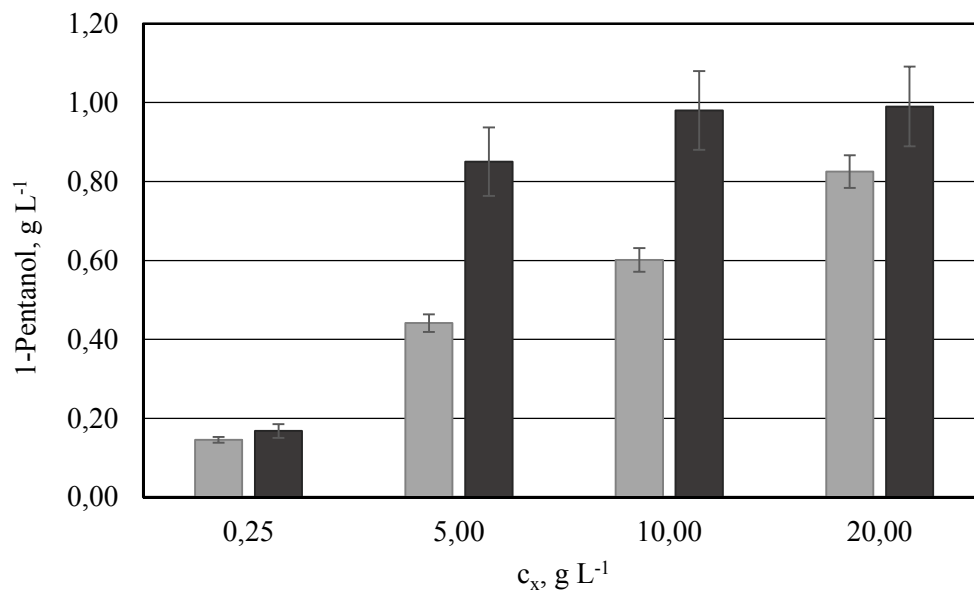


Abbildung 9.2: Gemessene Produktkonzentration (1-Pentanol) beim Umsatz von 1,0 g L⁻¹ 1-Pentanal mit *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-ADH/D1 mit verschiedenen Zellkonzentrationen (0,25 – 20,00 g L⁻¹) nach 1 h (■) und 3 h (■). Inkubation bei 45°C und 220 U min⁻¹. Als Cosubstrat wurde 200 mM Formiat verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von 0,5 h konnten etwa 0,4 g L⁻¹ 1-Pentanol im Medium bestimmt werden, unabhängig von der eingesetzten Substratmenge (siehe Abbildung 9.3). Nach einer gesamten Inkubationszeit von einer Stunde wurde die eingesetzte Substratmenge von 1,0 g L⁻¹ 1-Pentanal in 0,9 g L⁻¹ 1-Pentanol katalytisch umgesetzt und konnte im Medium nachgewiesen werden. Bei einer anfänglichen Substratkonzentration von 2,0 g L⁻¹ im Medium war ein geringerer Umsatz als bei der Startkonzentration von 1,0 g L⁻¹ zu beobachten. Nach einer Inkubationsperiode von 1 h konnten 0,8 g L⁻¹ 1-Pentanol im Medium bestimmt werden. Nach einer Inkubationszeit von 2 h ist eine Plateaubildung bei einer Produktkonzentration von 0,95 g L⁻¹ 1-Pentanol zu beobachten. Das Substrat wurde dabei nicht vollständig umgesetzt.

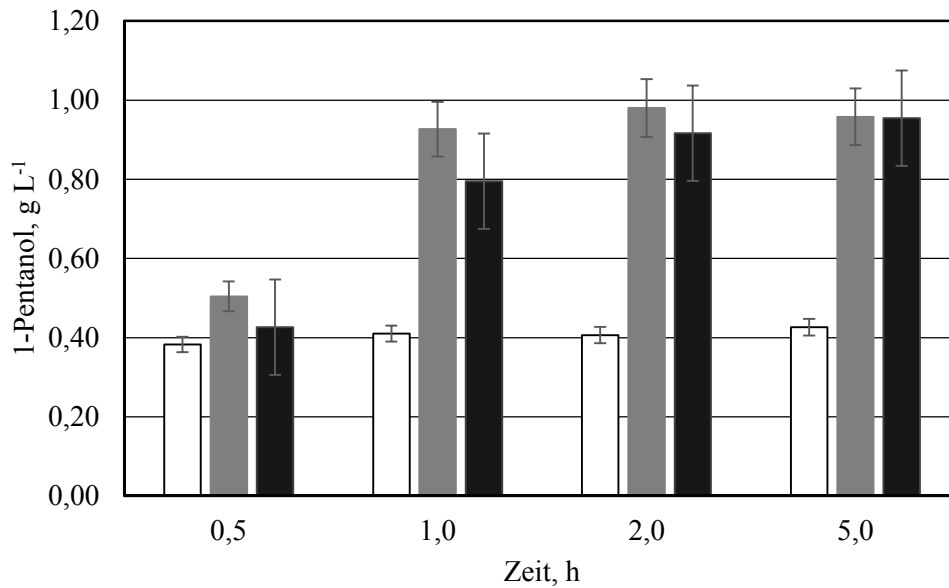


Abbildung 9.3: Gemessene Produktkonzentration (1-Pentanol) beim Umsatz von 0,4 (□), 1,0 (■) und 2,0 g L⁻¹ 1-Pentanal mit *Haloferax volcanii* H1895_pTA963-ADH/D1 bei einer Zellkonzentration von 20 g L⁻¹ nach 0,5 h, 1 h, 2 h und 5 h. Inkubation bei 45°C und 220 U min⁻¹. Als Cosubstrat wurden 200 mM Formiat verwendet.

Die Reduktion von 1-Pentanal zu 1-Pentanol wurde ohne sowie mit den Cosubstraten Formiat und Glukose untersucht. Mit 200 mM Formiat konnte nach einer Stunde ein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Wurde auf ein Cosubstrat im Reaktionsansatz verzichtet, konnte nach einer Stunde ein Umsatz von 89% detektiert werden. Wurden 200 mM Glukose dem Medium zugegeben, verringerte sich der Umsatz auf 86% (siehe Abbildung 9.4). Eine Erhöhung der Cosubstratkonzentration auf 400 mM Glukose im Reaktionsansatz führte zu einer Verringerung des Umsatzes auf 50%.

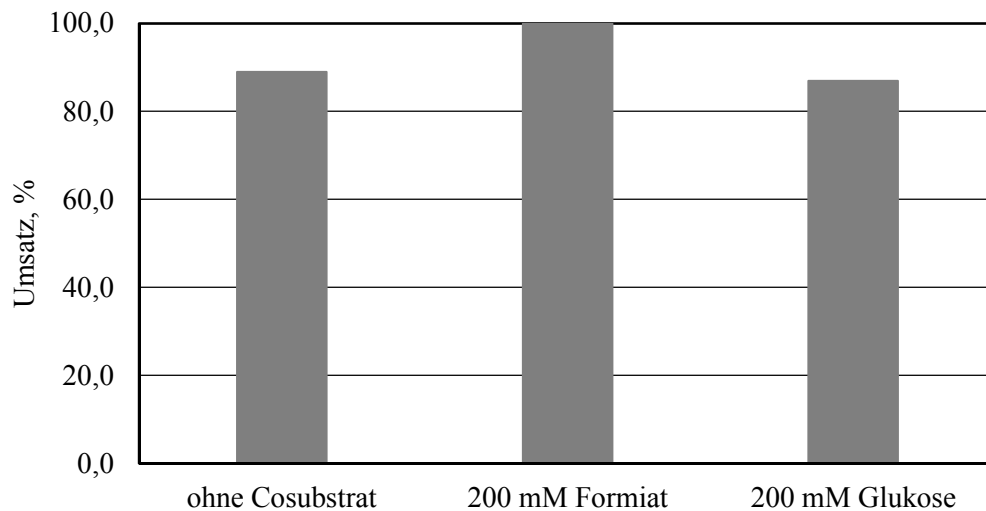


Abbildung 9.4: Umsatz von $1,0 \text{ g L}^{-1}$ 1-Pentanal zu 1-Pentanol ohne Cosubstrat, mit 200 mM Formiat oder 200 mM Glukose bei 45°C , 220 U min^{-1} , einer Inkubationsperiode von einer Stunde und einer Biomassekonzentration von 20 g L^{-1} .

9.3 Diskussion

Die Durchführung von katalytischen Umsetzungen mit Ganzzellbiokatalysatoren anstelle von aufgereinigten Enzymen bietet mehrere Vorteile. Vor allem sei hier genannt, dass heterolog exprimierte Enzyme nicht aufgereinigt werden müssen und keine Cofaktoren wie NAD(P)H zum Reaktionsansatz hinzugegeben werden müssen. Somit ist diese Variante kostengünstiger und daher für industrielle Anwendungen interessant. Hier wurde gezeigt, dass *Haloferax volcanii* H1895 mit der heterolog exprimierten Alkoholdehydrogenase ADH/D1 als Ganzzell-Biokatalysator zur Umsetzung von 1-Pentanal zu 1-Pentanol verwendet werden kann.

1-Pentanol ist ein wichtiges Lösemittel für die Herstellung von Farbstoffen, Pharmazeutika und Kosmetika. Aufgrund der höheren Energiedichte (28 MJ L^{-1}) gegenüber Ethanol (21 MJ L^{-1}) bietet sich eine Verwendung als Biokraftstoff an (Cann and Liao 2010). Die aerobe biotechnologische Produktion von 1-Pentanol wurde mit *Escherichia coli* (Zhang, Sawaya et al. 2008, Cann and Liao 2010) oder *Saccharomyces cerevisiae* (Eden, Van Nedervele et al. 2001) publiziert. Die höchste Ausbeute von 1-Pentanol aus dem Fermentationsüberstand betrug 750 mg L^{-1} (Zhang, Sawaya et al. 2008).

Bei Betrachtung der Ergebnisse ist eine lineare Korrelation zwischen Umsatz und Zellmasse zu beobachten. Durch den ansteigenden Einsatz an Biomasse, erhöht sich die Biokatalysatorkonzentration im Reaktionsansatz, daher konnte mit 20 g L^{-1} Zellmasse ein Umsatz von 95% nach einer Stunde erreicht werden, wohingegen bei einer Zellkonzentration von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ nach einer Stunde erst 0,15% Umsatz beobachtet werden konnte. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit konnte der Umsatz ebenfalls erhöht werden. Bei einer Inkubationszeit von 0,5 h konnten 40% des Substrates zum Produkt umgesetzt werden. Eine Verdopplung dieser Zeit führt zu einer 100%igen Umsetzung. Eine Umsetzung von 1-Pentanal durch die intrinsischen Alkoholdehydrogenasen von *Haloferax volcanii* kann ausgeschlossen werden, da im Kontrollansatz mit *Haloferax volcanii* H1895 keine Umsetzung von 1-Pentanal zu 1-Pentanol gemessen werden konnte.

Eine Erhöhung der Substratkonzentrationen auf 2 g L^{-1} führte nach einer Stunde Inkubation zu einer Produktkonzentration von 1 g L^{-1} 1-Pentanol. Eine Verlängerung der Inkubationszeit zeigte keinen weiteren Umsatz mehr. Für den unvollständigen Substratumsatz könnte möglicherweise die Hydrophobizität des Substrats oder des Produkts verantwortlich sein. Wie in Abbildung 8.4 zu sehen ist, weist das Enzym ADH/D1 eine geringe Toleranz gegenüber hydrophoben Lösemitteln auf. Die Toxizität von 1-Pentanol und 1-Pentanal resultiert aus dem hydrophoben Charakter beider Lösemitteln, wodurch sie sich in lipophile Bereiche in der Zelle einlagern können (Okolo, Johnston et al. 1987, Aono, Kobayashi et al. 2014). Eine Möglichkeit diese Inhibierung zu umgehen, sind zwei-phasige Reaktionsansätze, bestehend aus einer organischen (zum Beispiel ionische Flüssigkeiten) und einer wässrigen Phase. Das Substrat und das entstandene Produkt liegen hier in der organischen Phase vor, wohingegen der Biokatalysator in der wässrigen Phase gelöst wird. So kann die inhibierende Substratkonzentration am Biokatalysator reduziert werden (León, Fernandes et al. 1998, Schmid, Dordick et al. 2001, Pfruender, Jones et al. 2006).

Haloferax volcanii besitzt zwei Formiatdehydrogenasen und eine Glucosedehydrogenase (KEGG). Für die interne Cofaktorregenerierung wurde den Versuchsansätzen die Cosubstrate Formiat und Glucose zugegeben. Bei einer Formiatkonzentration von 200 mM im Versuchsansatz konnte der höchste Umsatz ermittelt werden. Wurde dem Reaktionsansatz kein Cosubstrat hinzugegeben, konnte, im Vergleich zum Ansatz mit 200 mM Formiat, ein Umsatz

von 86% verzeichnet werden. Natürlicherweise besitzt *Haloferax volcanii* den Cofaktor NADH in der Zelle. Durch die Zugabe von 200 mM Glukose als alternatives Cosubstrat war ein niedrigerer Substratumsatz zu verzeichnen (84%). Durch die katalytische Umsetzung von Glukose mit Hilfe der Glukosedehydrogenase wird Glukonsäure gebildet, die ins Medium abgegeben wird und das Medium somit ansäuert. Formiat hingegen hat, aufgrund des entweichenden CO₂, einen Anstieg des pH zur Folge (Kaup, Bringer-Meyer et al. 2004, Ernst, Kaup et al. 2005). Mit dem aufgereinigten Enzym konnte in verschiedenen Vorversuchen gezeigt werden, dass eine Umsetzung von 1-Pentanal zu 1-Pentanol bevorzugt bei einem pH zwischen pH 7,5 und pH 8,0 stattfindet. Somit ist ein Umsatz von 1-Pentanal zu 1-Pentanol im neutralen beziehungsweise leicht basischen Milieu bevorzugt gegenüber einer Umsetzung im sauren pH Bereich.

An der Umsetzung von 1-Pentanal zu 1-Pentanol konnte gezeigt werden, dass sich *Haloferax volcanii* H1895 ebenfalls zur Ganzzell-Biokatalyse eignet. Zur Etablierung des Systems müssen weiterführende Charakterisierungen hinsichtlich pH- und Temperaturoptimum vorgenommen werden. Anschließend kann eine Maßstabsvergrößerung erfolgen, um eine höhere Produktmenge erhalten zu können.

10 Zusammenfassung und Ausblick

Aufgrund der großen Toleranz gegenüber hohen Salzkonzentrationen, extremen Temperaturen oder pH Bereichen weist die Verwendung extremophiler Enzyme ein großes biotechnologisches Potential auf (Adams, Perler et al. 1995, Niehaus, Bertoldo et al. 1999, Demirjian, Moris-Varas et al. 2001, Fujiwara 2002, Gomes and Steiner 2004, Podar and Reysenbach 2006). Im Rahmen des Forschungsprojekts „Discovery, Design and Computationally Guided Evolution of novel Oxidoreductase Biocatalysts“, ein Kooperationsprojekt zwischen der Technische Universität München und der King Abdullah University of Science and Technology, wurden verschiedene halophile Enzyme aus den Solebecken im Roten Meer untersucht. Die Isolierung und Annotation der Gene erfolgte an der KAUST (Grötzinger, Alam et al. 2014). Eine Expression dieser thermo-halophilen Gene in mesophilen Organismen wie *Escherichia coli* ist jedoch schwierig. Daher wurde in dieser vorliegenden Arbeit die Herstellung thermo-halophiler Proteine im alternativen Expressionssystem *Haloferax volcanii* H1424 und H1895 untersucht. Eine Kultivierung im Rührkesselreaktor war aufgrund der Biofilmbildung von *Haloferax volcanii* zuerst nicht möglich. Ziel dieser Arbeit war es daher durch eine Deletion der Biofilm-bildenden Gene in *Haloferax volcanii* H1424 ein Satzverfahren im Rührkesselreaktor zu realisieren, um mit einem erarbeiteten Expressionsprotokolls, eine hohe Konzentration der thermo-halophilen Enzyme aus dem Metagenom der Solebecken des Roten Meeres zu realisieren.

Bei der Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1424 im Schüttelkolben konnte im definierten Medium CDM mit 0,5% (v/v) Laktat eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $1,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden. Im Komplexmedium Hv-YPC betrug die maximale Biotrockenmassekonzentration $2,0 \text{ g L}^{-1}$. Aufgrund des geringen Sauerstoffübergangs und der fehlenden Möglichkeit den pH zu regeln, ist das Zellwachstum im Schüttelkolben in der Regel geringer als im Rührkesselreaktor. Um die Biotrockenmasseausbeute zu steigern, sollte daher *Haloferax volcanii* auch im Rührkesselreaktor kultiviert werden. Jedoch konnte dies, aufgrund

der Biofilmbildung von *Haloferax volcanii* H1424, zuerst nicht durchgeführt werden. Mit Hilfe der Deletion der beiden Gene Hvo_1033 und Hvo_1034, die eine ATPase und ein Membranprotein des Pili Assemblierungssystems codieren, konnte ein neuer Stamm hergestellt werden, der motil ist, jedoch keinen Biofilm mehr ausbilden kann. Des Weiteren konnte, im Vergleich zum Ausgangsstamm *Haloferax volcanii* H1424, keine Veränderung beim Zellwachstum festgestellt werden. Somit war es möglich den Deletionsstamm H1895 im Rührkesselreaktor im Satzverfahren zu kultivieren. Im Komplexmedium Hv-YPC konnte eine Biotrockenmassekonzentration von $3,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden. Bei der Satzkultivierung im definierten Medium CDM mit 0,5% (v/v) Laktat konnte eine Biotrockenmassekonzentration von $2,0 \text{ g L}^{-1}$ realisiert werden.

Das Ziel war eine hohe Biotrockenmassekonzentration von *Haloferax volcanii* um eine hohe Proteinkonzentration zu erreichen. Daher wurde ausgehend von den Kultivierungsergebnissen im Komplexmedium, der Einfluss der verschiedenen Bestandteile des Hv-YPC Mediums genauer untersucht. Durch die Zugabe von 0,5% (v/v) Laktat sowie durch eine Verdreifachung der Casaminsäure auf 3 g L^{-1} und des Hefeextrakts auf 15 g L^{-1} im Medium, und der Zugabe von 5 mM NH_4Cl und 2 mM Kaliumphosphatpuffer zum Komplexmedium Hv-YPC konnte eine Biotrockenmassekonzentration von $10,5 \text{ g L}^{-1}$ im Satzverfahren realisiert werden. Trotzdem konnte nach 16 h Kultivierungszeit ein Abbruch der exponentiellen Wachstumsphase und ein Übergang in die stationäre Wachstumsphase beobachtet werden, obwohl sich noch $1,0 \text{ g L}^{-1}$ Laktat im Medium befanden. Da Limitierungen für eine Stagnation des Wachstums ausgeschlossen werden konnten, erfolgte ein kontinuierlicher Medienaustausch ($D = 0,1 \text{ h}^{-1}$) im Membranreaktor mit vollständiger Zellrückhaltung. Damit konnte eine weitere Verdopplung der Biotrockenmassekonzentration auf $21,7 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden.

Die Expression der halophilen Gene integriert in den Vektor pTA963 ist durch den Promotor *ptna.A* kontrolliert und durch die Zugabe von L-Tryptophan induzierbar (Large, Stamme et al. 2007). In der Literatur gibt es für die Genexpression kontrolliert durch diesen Promotor mehrere Protokolle (Lestini, Laptanok et al. 2013, Liliensiek, Cassidy et al. 2013, Timpson, Liliensiek et al. 2013). Um eine hohe Proteinkonzentration zu erreichen, wurde auf Basis der publizierten Protokolle ein neues Expressionsprotokoll erarbeitet. Es wurde festgestellt, dass die hergestellte Proteinmenge mit der Menge an zugegebenen Induktor L-Tryptophan positiv linear korreliert.

Jedoch führt eine zu hohe Konzentration an L-Tryptophan ($> 6 \text{ mM}$) zum Abbau von L-Tryptophan durch *Haloferax volcanii* im Medium. Dies resultiert vermutlich aus der dosisabhängigen Toxizität von L-Tryptophan. Damit ist auch eine Reduktion der heterolog exprimierten Proteinkonzentration zu verzeichnen. Somit erwies sich ein zweistufiges Induktionsprotokoll mit insgesamt 9 mM L-Tryptophan als am geeignetsten. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurden zum Reaktionsansatz 6 mM L-Tryptophan hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 16 h wurden erneut 3 mM L-Tryptophan zur zweiten Induktion hinzugegeben. Nach weiteren 4 h Inkubation wurden die Zellen geerntet. Das zweistufige Protokoll bietet sich an, da eine hohe Menge an L-Tryptophan (hier 9 mM) zum Medium gegeben werden kann, ohne dass ein Abbau des Induktors im Medium beobachtet werden konnte. Die führte zu einer höheren Proteinkonzentration.

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt zwei Alkoholdehydrogenasen (ADH/D1 und ADH/A1) und zwei Dihydrodipicolinat Reduktasen (DR/D1 und DR/A1) aus den Solebecken Discovery und Atlantis II des Roten Meers exprimiert. Bei der Expression der Alkoholdehydrogenasen ADH/D1 und ADH/A1 im Schüttelkolben konnte eine Proteinkonzentration von $3,53 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ beziehungsweise $0,44 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (entspricht $7,43 \text{ mg L}^{-1}$ bzw. $0,75 \text{ mg L}^{-1}$) erreicht werden. Zusätzlich wurde die Expression ADH/D1 und ADH/A1 noch in *E. coli*(DE3)RIPL untersucht, jedoch konnte in *E. coli* keine Expression festgestellt werden. Im Bioreaktor wurden, unter Verwendung des angereicherten Hv-YPC Mediums und des oben beschriebenen Expressionsprotokolls, die Alkoholdehydrogenasen und die Dihydrodipicolinat Reduktasen exprimiert. Durch die Expression der Enzyme im Rührkesselreaktor anstelle im Schüttelkolben konnte eine Steigerung der Proteinkonzentration um das 28-fache erreicht werden.

Laut der Annotation handelt es sich bei der ADH/D1 um eine Fe^{2+} -abhängige Alkoholdehydrogenase. Jedoch konnte keine Aktivität mit ADH/D1, das mit Fe^{2+} substituiert war, gemessen werden. Durch eine Zugabe von Zn^{2+} konnte die Umsetzung einwertiger Alkohole beobachtet werden. Eine Substitution mit Mn^{2+} führte zu einer Erhöhung der Aktivität um 500% . Damit konnte bei 75°C , 3 M KCl und $\text{pH } 10$ eine maximale spezifische Aktivität von $2,5 \text{ U mg}^{-1}$ bei der Umsetzung von Cinnamylalkohol bestimmt werden. Hingegen zeigen die Michaelis-Menten Konstanten, die als Indikator für die Bindungsaffinität gelten, eine

Präferenz für ADH/D1, das mit einer Zn^{2+} Lösung inkubiert wurde. Für die beiden Substrate Cinnamylalkohol und 1-3-Propanediol konnte ein deutlich niedrigerer K_M (0,56 mM und 55,00 mM) bestimmt werden als für Mn^{2+} substituiertes ADH/D1 (0,81 mM und 177,81 mM).

Für die Charakterisierung der Dihydrodipicolinat Reduktasen wurde das Substrat Citraconsäure Anhydrid verwendet. Die Dihydrodipicolinat Reduktase DR/A1 aus dem Metagenom von Atlantis II wies in einem Temperaturbereich von 35 – 40°C, bei einem pH von 9 und einer Salzkonzentration von 3 M eine maximale spezifische Aktivität von 2,2 U mg^{-1} auf. Hingegen zeigte DR/D1 aus dem Metagenom Discovery eine maximale spezifische Aktivität von 7,1 U mg^{-1} bei einer Temperatur von 40°C einem pH von 7,5 und einer Salzkonzentration von 3 – 4 M KCl. Im Vergleich mit den publizierten Dihydrodipicolinat Reduktasen, die im salzfreien Medium Aktivität aufweisen, verfügen die halophilen Dihydrodipicolinat Reduktasen über eine hohe Salztoleranz. Da bei der Charakterisierung nicht das natürliche Substrat verwendet wurde, sondern Citraconsäure Anhydrid weisen die Michaelis-Menten Konstanten für DR/D1 (97,33 mM) und DR/A1 (190,16 mM) sehr hohe Werte auf. DR/D1 weist im Vergleich zu DR/A1 eine höhere Lagerstabilität auf. Bei -20°C liegt die Halbwertszeit von DR/D1 bei 600 h, wohingegen die Halbwertszeit von DR/A1 bei 500 h liegt. Mit zunehmender Temperatur sinkt die Halbwertszeit bis sie bei 4°C bei 100 h (DR/D1) bzw. 20 h (DR/A1). Eine Zusammenfassung der exprimierten und aufgereinigten Enzyme ist in Tabelle 10.1 dargestellt.

Tabelle 10.1: Exprimierte und aufgereinigte Proteine aus den Solebecken. Darstellung der optimalen Bedingungen und der maximalen spezifischen Aktivität.

Enzym	Protein, $mg_{g_{BTM}}^{-1}$	Salz Optimum, M KCl	pH Optimum	Temp. Optimum, °C	Aktivität, U mg^{-1}
ADH/D1	16,5	3,0	10,0	75	2,5
ADH/A1	3,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DR/D1	17,3	4,0	9,0	40	7,5
DR/A1	8,9	2,0	7,5	40	2,2

Haloferax volcanii H1895_pTA963-ADH/D1 kann auch als Ganzzell-Biokatalysator verwendet werden. Dies wurde anhand der Umsetzung von 1-Pantanal zu 1-Pentanol

untersucht. Die Genexpression wurde im Rührkesselreaktor nach oben beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die geernteten Zellen wurden im Komplexmedium Hv-YPC resuspendiert und so die gewünschte Zellkonzentration erhalten. Mit steigender Biomassekonzentration erhöht sich die Menge an Produkt. Der maximale Umsatz von 95% konnte während einer Reaktionszeit von 1 h bei 45°C, einer Biomassekonzentration von 20 g L⁻¹ und bei einer Substratkonzentration von 1,0 g L⁻¹ erreicht werden.

In weiterführenden Untersuchungen sollte das Quorum Sensing Verhalten von *Haloferax volcanii* untersucht werden. Durch ein detailliertes und tieferes Verständnis darüber könnten Satzverfahren im Rührkesselreaktor weiter optimiert werden und somit eine höhere Biotrockenmasseausbeute erreicht werden.

Durch die Expression der intrinsischen Tryptophanase von *Haloferax volcanii* bei der Zugabe von L-Tryptophan, wird das im Medium vorhandene L-Tryptophan reduziert. Durch die Klonierung eines Tryptophanase Deletionsstamm könnte die Genexpression vereinfacht werden. Eventuell wäre nur eine einmalige Zugabe des Induktors nötig, vielleicht könnte auch die L-Tryptophan Konzentration reduziert werden.

11 Literaturverzeichnis

Adams, M. W. W., F. B. Perler and R. M. Kelly (1995). "Extremozymes: Expanding the limits of biocatalysis." nature biotechnology **13**: 662 - 668.

Alam, I., A. Antunes, A. A. Kamau, W. Ba Alawi, M. Kalkatawi, U. Stingl and V. B. Bajic (2013). "INDIGO - INtegrated data warehouse of microbial genomes with examples from the red sea extremophiles." PLoS One **8**(12): e82210.

Albers, S. and M. Pohlschröder (2009). "Diversity of archaeal type IV pilin-like structures." Extremophiles **2009**(13): 405 - 411.

Albers, S. V. and M. Pohlschroder (2009). "Diversity of archaeal type IV pilin-like structures." Extremophiles **13**(3): 403-410.

Albers, S. V., Z. Szabo and A. J. M. Driessen (2003). "Archaeal Homolog of Bacterial Type IV Prepilin Signal Peptidases with Broad Substrate Specificity." Journal of Bacteriology **185**(13): 3918-3925.

Alberts, B. (2005). Lehrbuch der molekularen Zellbiologie.

Allers, T. (2010). "Overexpression of His-Tag Proteins." Bioengineered Bugs **4**(1): 288 - 290.

Allers, T., S. Barak, S. Liddell, K. Wardell and M. Mevarech (2010). "Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*." Appl Environ Microbiol **76**(6): 1759-1769.

Allers, T. and H. P. Ngo (2003). "Genetic analysis of homologous recombination in Archaea: *Haloferax volcanii* as a model organism." Biochemical Society Transactions **31**(3): 706 - 710.

Allers, T., H. P. Ngo, M. Mevarech and R. G. Lloyd (2004). "Development of Additional Selectable Markers for the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* Based on the *leuB* and *trpA* Genes." Applied and Environmental Microbiology **70**(2): 943-953.

Alqueres, S. M. C., R. V. Almeida, M. M. Clementino, P. P. Vieira, W. I. Almeida, A. M. Cardoso and O. B. Martins (2007). "Exploring the biotechnological Application in the Archaeal domain." Brasilian Journal of Microbiology **38**: 388 - 405.

Amoozegar, M. A., F. Malekzadeh and A. M. Khursheed (2003). "Production of amylase by newly isolated moderate halophile *Halobacillus* sp. strain MA-2." Journal of Microbiological Methods **52**: 353 - 359.

Anastas, P. T. and J. C. Waren (1998). Green Chemistry - Theory and Practice. Oxford University, New York Press.

Ander, P. and L. Marzullo (1997). "Sugar oxidoreductases and veratyl alcohol oxidase as related to lignin degradation." Journal of Biotechnology **53**(2): 115 - 131.

Antunes, A., D. K. Ngugi and U. Stingl (2011). "Microbiology of the Red Sea (and other) deep-sea anoxic brine lakes." Environ Microbiol Rep **3**(4): 416-433.

Aono, R., H. Kobayashi, K. N. Joblin and K. Horikoshi (2014). "Effects of Organic Solvents on Growth of *Escherichia coli* K-12." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **58**(11): 2009-2014.

Arends, I. W. C. E., R. Sheldon and U. Hanefeld (2007). Green Chemistry. Weinheim, WILEY-VCH.

Asgher, M., M. J. Asad, S. U. Rahman and R. L. Legge (2007). "A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing." Journal of Food Engineering **79**(3): 950-955.

Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin and G. Sherlock (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." Nat Genet **25**(1): 25-29.

Augustin, N., C. W. Devey, F. M. van der Zwan, P. Feldens, M. Tominaga, R. A. Bantan and T. Kwasnitschka (2014). "The rifting to spreading transition in the Red Sea." Earth and Planetary Science Letters **395**: 217-230.

Backer, H. and M. Schoell (1972). "New deeps with brines and metalliferous sediments in the Red Sea." Nature Physical Science **240**: 153 - 158.

Bang, J. K., A. Follér and M. Buttazzoni (2009). Industrial biotechnology: more than green fuel in a dirty economy?. Dänemark, World Wild Life Fund.

Bardy, S. L., J. Eichler and K. F. Jarrell (2003). "Archaeal signal peptides - a comparative survey at the genome level." Protein Science **12**: 1833 - 1843.

Bardy, S. L., S. Y. Ng and K. F. Jarrell (2004). "Recent advances in the structure and assembly of the archaeal flagellum." Journal of Molecular Microbiology **7**: 41 - 51.

Beale, E. G., E. A. Deep, R. S. Handy, H. Akhavan-Tafti and A. P. Schaap (1992). "A rapid, and simple chemoluminescent assay for *Escherichia coli* beta-galactosidase" Biotechniques **12**: 320 - 324.

- Beeby, M., B. D. O'Connor, C. Ryttersgaard, D. R. Boutz, L. J. Perry and T. O. Yeates (2005). "The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles." PLoS Biol **3**(9): e309.
- Bell, G. S., R. J. M. Russell, H. Connaris, D. W. Hough, M. J. Danson and G. L. Taylor (2002). "Stepwise adaptations of citrate synthase to survival at life's extremes." European Journal of Biochemistry **269**(24): 6250-6260.
- Berk, H. and R. K. Thauer (1997). "Function of coenzyme F420-dependent NADP reductase in methanogenic archaea containing an NADP dependent alcohol dehydrogenase." Archives of Microbiology **168**: 396 - 402.
- Bertani, G. (1951). "Studies of Lysogenesis." **62**: 293 - 300.
- Betram, C., A. Krätschell, K. O'Brien, W. Brückmann, A. Proeßler and K. Rehdanz (2011). "Metalliferous sediments in the Atlantic II Deep - Assessing the geological and economic resource potential and legal constraints." Resource Policy **36**(4): 315 - 329.
- Bignell, R. D., D. S. Cronan and J. S. Tooms (1976). "Red Sea metalliferous brine precipitates." Trans Geol Assoc of Canada Spec Paper **14**: 147 - 179.
- Bischoff, K. M. and V. W. Rodwell (1996). "3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Haloferax volcanii*: purification characterization, and expression in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **178**(1): 19 - 23.
- Bitan-Banin, G., R. Ortenberg and M. Mevarech (2003). "Development of a Gene Knockout System for the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* by Use of the *pyrE* Gene." Journal of Bacteriology **185**(3): 772-778.
- Blaby, I. K., G. Phillips, C. E. Blaby-Haas, K. S. Gulig, B. El Yacoubi and V. de Crecy-Lagard (2010). "Towards a systems approach in the genetic analysis of archaea: Accelerating mutant construction and phenotypic analysis in *Haloferax volcanii*." Archaea **2010**: 426239.
- Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-VIDes, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997). "The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**: 1453 - 1469.
- Blum, N. and H. Puchelt (1991). "Sedimentary-hosted polymetallic massive sulfide deposits of the Kebrüt and Shaban deeps." Mineral Deposita **26**: 217 - 227.
- Boutz, D. R., D. Cascio, J. Whitelegge, L. J. Perry and T. O. Yeates (2007). "Discovery of a thermophilic protein complex stabilized by topologically interlinked chains." Journal of Molecular Biology **368**(5): 1332 - 1344.
- Bräsen, C. and P. Schönheit (2001). "Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea." Archives of Microbiology **175**(5): 360-368.

- Breuert, S., T. Allers, G. Spohn and J. Soppa (2006). "Regulated Polyploidy in Halophilic Archaea." PLoSone **1**(1): 1 - 10.
- Bruneau, L., N. G. Jerlov and F. F. Koczy (1953). "Reports of the Swedish deep-sea expedition, Physical and chemical methods." Physicy and Chemistry **3**(4): 99 - 112.
- Burton, S. G., D. Cowan and J. M. Woodley (2002). "The search for the ideal biocatalyst." nature biotechnology **20**: 37 - 45.
- Cacciapuoti, G., F. Fuccio, L. Petraccone, P. Del Vecchio and M. Porcelli (2012). "Role of disulfide bonds in conformational stability and folding of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*." Biochim Biophys Acta **1824**(10): 1136-1143.
- Cahyanto, M. N., H. Kawasaki, M. Nagashio, K. Fujiyama and T. Seki (2006). "Regulation of aspartokinase, aspartate semialdehyde dehydrogenase, dihydrodipicolinate synthase and dihydrodipicolinate reductase in *Lactobacillus plantarum*." Microbiology **152**(Pt 1): 105-112.
- Camacho, R. M., J. C. Mateos-Diaz, D. M. Diaz-Montano, O. Gonzalez-Reynoso and J. Cordova (2010). "Carboxyl ester hydrolases production and growth of a halophilic archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1." Extremophiles **14**(1): 99-106.
- Cambillau, C. and J. M. Claverie (2000). "Structural and genomic correlates of hyperthermostability." Journal of Biological Chemistry **275**: 32383 - 32386.
- Cann, A. F. and J. C. Liao (2010). "Pentanol isomer synthesis in engineered microorganisms." Appl Microbiol Biotechnol **85**(4): 893-899.
- Cao, Y., L. Liao, X. W. Xu, A. Oren, C. Wang, X. F. Zhu and M. Wu (2008). "Characterization of alcohol dehydrogenase from the haloalkaliphilic archaeon *Natronomonas pharaonis*." Extremophiles **12**(3): 471-476.
- Cavicchioli, R., R. Amils, D. Wagner and T. McGenity (2011). "Life and applications of extremophiles." Environ Microbiol **13**(8): 1903-1907.
- Charnock, M. B. (1964). "Anomalous bottom water in the Red Sea." Nature **203**: 591.
- Chen, R. R. (2007). "Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering." Applied Microbiology and Biotechnology **74**: 730 - 738.
- Cirillo, J. D., T. R. Weisbrod, A. Banerjee, B. R. Bloom and W. R. Jacobs (1994). "Genetic determination of the meso-Diaminopimelate Biosynthetic Patchway of Mycobacteria." Journal of Bacteriology **176**(14).
- Cirillo, M., R. Zheng, G. Scapin and J. S. Blanchard (2003). "The Three-Dimensional Structures of the Mycobacterium tuberculosis Dihydrodipicolinat Reductase-NAD-2,6-PDC and -NADPH-2,6-PDC Complexes, Structural and Mutagenic Analysis of Relaxed Nucleotide Specificity." Biochemistry **42**: 10644 - 10650.

- Cita, M. B. (2006). "Exhumation of Messinian evaporites in the deep-sea and creation of deep anoxic brine-filled collapsed basins." Sedimentary Geology **188 - 189**: 357 - 378.
- Coker, J. A., P. DasSarma, J. Kumar, J. A. Muller and S. DasSarma (2007). "Transcriptional profiling of the model Archaeon Halobacterium sp. NRC-1: responses to changes in salinity and temperature." Saline Systems **3**: 6.
- Coleman, P. L. and H. Weiner (1973). "Growth, Isolation and Characterization of a Yeast Manganese Alcohol Dehydrogenase." Biochemistry **12**(18): 3466 - 3472.
- Connaris, H., J. B. Chaudhuri, M. J. Danson and D. W. Hough (1998). "Expression, Reactivation and Purification of Enzymes from Haloferax volcanii in Escherichia coli." Biotechnology and Bioengineering **64**(1): 38 - 45.
- Connaris, H., M. W. West, D. W. Hough and M. J. Danson (1998b). "Cloning and overexpression in Escherichia coli of genes encoding citrat synthase from the hyperthermophilic Archaeon Sulfolobis solfataricus." Extremophiles **2**: 61 - 66.
- Coulter, C. V., J. A. Gerrard, J. A. Kraunsoe and A. J. Pratt (1999). "Escherichia coli dihydrodipicolinat synthase and dihydrodipicolinat reductase: kinetic and inhibition studies of two putative herbicide targetd." Pesticide Science **55**: 887 - 895.
- Cremer, J., L. Eggeling and H. Sahm (1991). "Control of the Lysine Biosynthesis Sequence in corynebacterium glutamicum as Analyzed by Overexpression of the Individual Corresponding Genes." Applied and Environmental Microbiology **57**(6): 1746 - 1752.
- Daggett, V. and M. Levitt (1993). "Protein Unfolding Pathways Explored Through Molecular Dynamic structure." Journal of Molecular Biology **232**: 600 - 619.
- Danson, M. J. and D. W. Hough (1998). "Structure, function and stability of enzymes from the Archaea." Trends in Microbiology **6**(8): 307 - 314.
- Das, S., S. Singh and V. Sharma (2001). "Biotechnical application of industrially important amylase enzyme." International Journal of Pharma and Bio Science **2**(1): 486 - 496.
- DasSarma, P. and P. Arora (2001). Halophiles. Encyclopedia of Life Science. London, Nature Publishing Group.
- DasSarma, S., B. R. Berquist, J. A. Coker, P. DasSarma and J. A. Muller (2006). "Post-genomics of the model haloarchaeon Halobacterium sp. NRC-1." Saline Systems **2**: 3.
- DasSarma, S., S. P. Kennedy, B. Berquist, W. V. Ng, N. S. Baliga, J. L. Spudich, M. P. Krebs, J. A. Eisen, C. H. Johnson and L. Hood (2001). "Genomic perspective on the photobiology of Halobacterium species NRC-1, a phototrophic, photoactive and UV-tolerant haloarchaeon." Photosynthesis Resaerch **70**: 3 - 17.

- Demirjian, D. C., F. Moris-Varas and C. S. Cassidy (2001). "Enzymes from extremophiles." Current Opinion in Chemical Biology **5**: 144 - 151.
- Deutch, C. E. (2002). "Characterization of a salt-tolerant alpha-amylase from *Bacillus dipsosauri*." Letters in Applied Microbiology **35**: 78 - 84.
- Dickenson, C. J. and F. M. Dickenson (1976). "Some Properties of an Alcohol Dehydrogenase Partially Purified from Baker's Yeast Grown without Added Zinc." Biochemistry Journal **153**: 309 - 319.
- Dobson, R. C., M. D. Griffin, S. J. Roberts and J. A. Gerrard (2004). "Dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) from *Escherichia coli* displays partial mixed inhibition with respect to its first substrate, pyruvate." Biochimie **86**(4-5): 311-315.
- Dogovski, C., S. R. Dommaraju, L. C. Small and M. A. Perugini (2012). "Comparative structure and function analyses of native and his-tagged forms of dihydrodipicolinate reductase from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Protein Expr Purif **85**(1): 66-76.
- Dommaraju, S. R., C. Dogovski, P. E. Czabotar, L. Hor, B. J. Smith and M. A. Perugini (2011). "Catalytic mechanism and cofactor preference of dihydrodipicolinate reductase from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Arch Biochem Biophys **512**(2): 167-174.
- Doyle, M. P. and J. L. Schoeni (1984). "Survival and Growth Characteristics of *Escherichia coli* Associated with Hemorrhagic Colitis." Applied and Environmental Microbiology **48**(4): 855 - 856.
- Drews, G. (2015). Die Verwandtschaft zwischen Bacteria, Archaea und Eukarya. Bakterien - ihre Entdeckung und Bedeutung für Natur und Mensch. G. Drews. Heidelberg, Springer Verlag.
- Eden, A., L. Van Nederveelde, M. Drukker, N. Benvenisty and A. Debourg (2001). "Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast." Applied Microbiology and Biotechnology **55**(3): 296-300.
- Eder, W., L. L. Jahnke, M. Schmidt and R. Huber (2001). "Microbial diversity of the brine-seawater interface of the Kebrut Deep, Red Sea, studied via 16S rRNA gene sequences and cultivation methods." Appl Environ Microbiol **67**(7): 3077-3085.
- Eder, W., W. Ludwig and R. Huber (1999). "Novel 16S rRNA gene sequence retrieved from highly saline brine sediments of Kebrut Deep, Red Sea." Archives of Microbiology **172**: 231 - 218.
- Egorova, K. and G. Antranikian (2005). "Industrial relevance of thermophilic Archaea." Curr Opin Microbiol **8**(6): 649-655.
- Eichler, J. (2001). "Biotechnological uses of archaeal extremozymes." Biotechnol Adv **19**: 261 - 278.

- Elleuche, S., C. Schroder, K. Sahm and G. Antranikian (2014). "Extremozymes--biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms." Curr Opin Biotechnol **29**: 116-123.
- Emerson, D., J. A. Rentz, T. G. Lilburn, R. E. David, H. Aldrich, C. Chan and C. L. Moyer (2007). "A novel lineage of Proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities." Plos One **2**: 667.
- Emery, K. O., J. M. Hunt and E. E. Hays (1969). Summary of Hot Brines and Heavy Metal Deposits. New York, Springer-Verlag.
- Enos, M. (2007). Growing Halobacterium sp. NRC-1
- Ernst, M., B. Kaup, M. Muller, S. Bringer-Meyer and H. Sahm (2005). "Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (R)-specific alcohol dehydrogenase." Appl Microbiol Biotechnol **66**(6): 629-634.
- Esquivel, R. N. and M. Pohlschroder (2014). "A conserved type IV pilin signal peptide H-domain is critical for the post-translational regulation of flagella-dependent motility." Mol Microbiol **93**(3): 494-504.
- Faber, E., R. Botz, J. Poggenburg, M. Schmidt, P. Stoffers and M. Hartmann (1998). "Methane in Red Sea Brines." Organic Geochemistry **29**: 363 - 379.
- Fairbanks, G., T. L. Steck and D. F. H. Wallach (1971). "Electrophoretic Analysis of the Major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membran." Biochemistry **10**(13): 2606 - 2608.
- Falb, M., K. Muller, L. Konigsmair, T. Oberwinkler, P. Horn, S. von Gronau, O. Gonzalez, F. Pfeiffer, E. Bornberg-Bauer and D. Oesterhelt (2008). "Metabolism of halophilic archaea." Extremophiles **12**(2): 177-196.
- Farkas, W. and C. Gilvarg (1965). "The Reduction Step in Diaminopimelic Acid Biosynthesis." The Journal of Biological Chemistry **240**(12): 4717 - 4722.
- Fernandez, R., F. Rodriguez-Valera, J. Gonzales-Ramos and F. Ruiz-Berraquero (1996). "Accumulation of Poly(beta-hydroxybutyrate) by Halobacteria." Applied and Environmental Microbiology **51**(1): 214 - 216.
- Ferrer, M., O. Golyshina, A. Beloqui and P. N. Golyshin (2007). "Mining enzymes from extreme environments." Curr Opin Microbiol **10**(3): 207-214.
- Fiala, G., C. R. Woese, T. A. Langworthy and K. O. Stetter (1990). "Felexistipes sinusarabici, a novel genus and species of eubacteria occurring in the Atlantis II Deep brines of the Red Sea." Archives of Microbiology **154**: 120 - 126.

- Forsynth, M. P. and D. J. Kushner (1970). "Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria." Canadian Journal of Microbiology **16**: 253 - 261.
- Frols, S., M. Dyll-Smith and F. Pfeifer (2012). "Biofilm formation by haloarchaea." Environ Microbiol **14**(12): 3159-3174.
- Fu, Y. (2013). Asymmetric deuction using novel ene-reductases from cyanobacteria. Dr. rer. nat., Technische Universität München.
- Fu, Y., K. Hoelsch and D. Weuster-Botz (2012). "A novel ene-reductase from *Synechococcus* sp. PCC 7942 for the asymmetric reduction of alkenes." Process Biochemistry **47**(12): 1988-1997.
- Fujiwara, S. (2002). "Extremophiles: Developments of their special functions and potentials resources." Journal od Bioscience and Bioengineering **94**: 518 - 525.
- Fukushima, T., T. Mizuki and A. Echigo (2004). "Organic solvent tolerance of halophilic alpha-amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1." Extremophiles **2005**(9): 85 - 89.
- Gaspar, P., G. Moura, M. A. Santos and J. L. Oliveira (2013). "mRNA secondary structure optimization using a correlated stem-loop prediction." Nucleic Acids Res **41**(6): e73.
- Ge, X., A. Olsen, S. Cai and D. S. Sem (2008). "Binding Synergy and Cooperativity in Dihydrodipicolinat Reductase: Implications for Mechanism and the Desing of Biligand Inhibitors." Biochemistry **47**: 9966 - 9980.
- Georgi T, D. Rittmann and V. Wendisch (2005). "Lysine and glutamate production by *Cornynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: Roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase." Metabolic Engineering **7**(4): 291 - 301.
- Ghosh, A. and S. Albers (2011). "Assembly and function of the archaeal flagellum." Biochemical Society Transactions **39**(1): 64 - 69.
- Gimenez, M. I., M. Cerletti and R. E. De Castro (2015). "Archaeal membrane-associated proteases: insights on *Haloferax volcanii* and other haloarchaea." Front Microbiol **6**: 39.
- Gomes, J. and W. Steiner (2004). "The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes." Extremophiles and Extremozymes **42**(4): 223 - 233.
- Goodarzi, H., N. Torabi, H. S. Najafabadi and M. Archetti (2008). "Amino acid and codon usage profiles: adaptive changes in the frequency of amino acids and codons." Gene **407**(1-2): 30-41.
- Grant, W. D. (2004). "Life at low water activity." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **359**(1448): 1249-1266; discussion 1266-1247.

- Greenberg, E. P. (2003). "Bacterial communication and group behavior." J Clin Invest **112**(9): 1288-1290.
- Grötzing, S., I. Alam, W. B. Atawi, V. B. Bajic, U. Stingl and J. Eppinger (2014). "Mining a database of single amplified genomes from Red Sea brine pool extremophiles - improving reliability of gene function prediction using a pürofile and pattern matching algorithm (PPMA)." Frontiers in microbiology **5**(134): 1 - 14.
- Gupta, M. N. and I. Roy (2004). "Enzymes in organic media. Forms, functions and applications." Eur J Biochem **271**(13): 2575-2583.
- Gurung, N., S. Ray, S. Bose and V. Rai (2013). "A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond." Biomed Res Int **2013**: 329121.
- Haki, G. (2003). "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review." Bioresource Technology **89**(1): 17-34.
- Hampp, N. (2000). "Bacteriorhodopsin: mutating a biomaterial into an optoelectronic material." Applied Microbiology and Biotechnology **53**: 633 - 639.
- Hampp, N. and C. Bräuchle (1990). Bacteriorhodopsin and its functional variants: Potential Application in Modern Options. Studies in Organic Chemistry. H. Ed and H. Dürr. **40**: 954 - 975.
- Hartman, A. L., C. Norais, J. H. Badger, S. Delmas, S. Haldenby, R. Madupu, J. Robinson, H. Khouri, Q. Ren, T. M. Lowe, J. Maupin-Furlow, M. Pohlschroder, C. Daniels, F. Pfeiffer, T. Allers and J. A. Eisen (2010). "The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon." PLoS One **5**(3): e9605.
- Hartmann, M., J. C. Scholten, P. Stoffers and W. F. (1998). "Red Sea - new results from the Shaban, Kebrit and Atlantis II and Discovery Deep." Maritim Geology **144**: 311 - 330.
- Hatti-Kaul, R., U. Tornvall, L. Gustafsson and P. Borjesson (2007). "Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals--a cradle-to-grave perspective." Trends Biotechnol **25**(3): 119-124.
- Henderson, P. J. F. (1990). "The homologous glucose transport proteins of prokaryotes and eukaryotes." Research in Microbiology **141**(3): 316 - 328.
- Hendricks, R. L., F. B. Reisbick, E. J. Mahaffey, D. B. Roberts and M. N. A. Peterson (1969). Hot Brines and Recent Heavy Metal Deposits in the Red Sea. New York, Springer Verlag.
- Hilt, W., G. Pfleiderer and P. Fortnagel (1991). "Glucose dehydrogenase from *Bacillus subtilis* expressed in *Escherichia coli* I: purification, characterization and comparison with glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*." Biochimica et Biophysica Acta **1076**: 298 - 304.

- Hollmann, F., I. W. C. E. Arends and D. Holtmann (2011). "Enzymatic reductions for the chemist." Green Chemistry **13**(9): 2285.
- Holmes, M. and M. Dyll-Smith (1990). "A Plasmid Vector with a Selectable Marker for Halophilic Archaeobacteria." Journal of Bacteriology **172**(2): 756 - 761.
- Holmes, M. and M. Dyll-Smith (2000). "Sequence and expression of halobacterial beta-galactosidase gene." Molecular Microbiology **38**(1): 114 - 122.
- Holmes, M., M. Kamekura, W. Lam, S. Nuttall, W. Woods, P. E. Jablonski, J. Serrano, K. Ngui, J. Anton and T. Allers (2008). The Halohendbook, Dyll-Smith, M.
- Holmes, M., R. Scopes, R. Moritz, R. Simpson, C. Englert, F. Pfeifer and M. Dyll-Smith (1996). "Purification and analysis of an extremely halophile beta-galactosidase from *Haloferax alicantei*." Biochimica et Biophysica Acta **1337**: 276 - 286.
- Hough, D. W. and M. J. Danson (1999). "Extremozymes." Current Opinion in Chemical Biology **3**: 39 - 46.
- Hovland, M., T. Kuznetsova, H. Rueslatten, B. Kvamme, H. K. Johnson, G. E. Fladmark and A. Hebach (2006). "Sub-surface precipitation of salts in supercritical seawater." Basin Res **18**: 221 - 230.
- Hrenovic, J. and T. Ivankovic (2009). "Survival of *Escherichia coli* and *Acinetobacter junii* at various concentrations of sodium chloride." EurAsian Journal of Biosciences(3): 144-151.
- Hummel, W. (1999). "Large scale application of NAD(P)-dependent oxidoreductases recent developments." Trends in Biotechnology **17**(12): 487 - 492.
- Ito, S. (1997). "Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus* : Enzymatic properties, genetics, and application to detergents." Extremophiles **1**(2): 61-66.
- Jacob, F., D. Perrin, C. Sanchez and J. Monod (1960). "Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator." C.R. Hebd. Seances Acad. Sci **250**: 1727 - 1792.
- Jeffery, J., E. Cederlund and H. Jörnvall (1984). "Sorbitol dehydrogenase." European Journal of Biochemistry **140**: 7 - 16.
- Jolley, K. A., E. Rapaport, D. W. Hough, M. J. Danson, W. G. Woods and M. L. Dyll-Smith (1996). "Dihydrolipoamide dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*: homologous overexpression of the cloned gene." Journal of Bacteriology **178**(11): 3044 - 3048.
- Jorgensen, S., C. E. Vorgias and G. Antranikian (1997). "Cloning, Sequencing, Characterization and Expression of an Extracellular alpha-Amylase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." The Journal of Biological Chemistry **272**(26): 16335 - 16342.

- Jörnvall, H., B. Persson and J. Jeffery (1981). "Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(7): 4226 - 4230.
- Jörnvall, H., B. Persson and J. Jeffery (1987). "Characterization of alcohol/polyol dehydrogenases." Eur. J. Biochem.(67): 195 - 201.
- Jörnvall, H., B. Persson and J. Jeffrey (1987). "Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases." European Journal of Biochemistry **167**: 195 - 201.
- Karan, R., M. D. Capes, P. DasSarma and S. DasSarma (2013). "Cloning, overexpression, purification and characterization of a polyextremophilic beta-galactosidase from the Antarctic haloarchaeon *Haloarubrum lacusprofundi*." BMC Biotechnol **13**(3): 1 - 11.
- Karan, R., M. D. Capes and S. Dassarma (2012). "Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity." Aquat Biosyst **8**(1): 4.
- Karan, R., P. DasSarma, E. B. Kubiczek, R. R. Weng, C. Liao, D. R. Goodlett, W. V. Ng and S. DasSarma (2015). "Halophiles and their enzymes: negativity put to good use." Curr Opin Microbiol **25**: 120-126.
- Karbe, L. (1987). Red Sea (Key Environments). Oxford, Pergamon Press.
- Karshikoff, K. and R. Ladenstein (2001). "Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a "traffic rule" for hot roads." Trends in Biochemical Science **26**(9): 550 - 557.
- Kaup, B., S. Bringer-Meyer and H. Sahm (2004). "Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation." Appl Microbiol Biotechnol **64**(3): 333-339.
- Kauri, T., R. Wallace and D. J. Kushner (1990). "Nutrition of the Halophilic Archaeobacterium, *Haloferax volcanii*." Systematic and Applied Microbiology **13**(1): 14-18.
- Kennedy, S. P., W. V. Ng, S. L. Salzberg, L. Hood and S. DasSarma (2001). "Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence." Genome Res **11**(10): 1641-1650.
- Kimura, K. and T. Goto (1975). "A New Flavin Enzyme Catalyzing the Reduction of Dihydrodipicolinate in Sporulating *Bacillus subtilis*." Journal of Biochemistry **77**: 415 - 420.
- Kimura, K. and T. Goto (1977). "Dihydrodipicolinate Reductase from *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*." Journal of Biochemistry **81**(5): 1367 - 1373.
- Klein, A. R., H. Berk, E. Purwantini, L. Daniels and R. K. Thauer (1996). "Site-specificity at C5 of coenzyme F420 for F420-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* and F420 dependent alcohol dehydrogenase from *Methanococcus thermophilus*." European Journal of Biochemistry **239**: 93 - 97.

- Koh, C. L., C. K. Sam, W. F. Yin, L. Y. Tan, T. Krishnan, Y. M. Chong and K. G. Chan (2013). "Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds." Sensors (Basel) **13**(5): 6217-6228.
- Kratzer, R., M. Pukl, S. Egger, M. Vogl, L. Brecker and B. Nidetzky (2011). "Enzyme identification and development of a whole-cell biotransformation for asymmetric reduction of o-chloroacetophenone." Biotechnol Bioeng **108**(4): 797-803.
- Kumar, S. and R. Nussinov (2004). "Different roles of electrostatics in heat and in cold: adaptation by citrate synthase." Chembiochem **5**(3): 280-290.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero and e. al. (1997). "The complete Genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*." Nature **399**.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**: 680 - 686.
- Lamed, R. and J. G. Zeikus (1980). "Ethanol production by thermophilic bacteria: relationship between fermentation product yields and catabolic enzyme activity in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii*." Journal of Bacteriology **144**: 569 - 578.
- Large, A., C. Stamme, C. Lange, Z. Duan, T. Allers, J. Soppa and P. A. Lund (2007). "Characterization of a tightly controlled promoter of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and its use in the analysis of the essential *cct1* gene." Mol Microbiol **66**(5): 1092-1106.
- León, R., P. Fernandes, M. Pinheiro and J. M. S. Cabral (1998). "Whole-cell biocatalysis in organic media." Enzyme and microbial technology **23**: 483 - 500.
- Lestini, R., S. P. Laptенок, J. Kuhn, M. A. Hink, M. C. Schanne-Klein, U. Liebl and H. Myllykallio (2013). "Intracellular dynamics of archaeal FANCM homologue Hef in response to halted DNA replication." Nucleic Acids Res **41**(22): 10358-10370.
- Liliensiek, A. K., J. Cassidy, G. Gucciardo, C. Whitely and F. Paradisi (2013). "Heterologous overexpression, purification and characterisation of an alcohol dehydrogenase (ADH2) from *Halobacterium* sp. NRC-1." Mol Biotechnol **55**(2): 143-149.
- Liu, W., Y. Li, M. Peeters, J. Rayner, P. Sharp, G. Shaw and B. Hahn (2010). "Single genome amplification and direct amplicon sequencing of *Plasmodium* spp. DNA from ape fecal specimens."
- Lizama, C., M. Monteoliva-Sanchez, B. Prado, A. Ramos-Cormenzana, J. Weckesser and V. Campos (2001). "Taxonomic study of extreme halophilic archaea isolated from the "Salar de Atacama", Chile." Syst Appl Microbiol **24**(3): 464-474.
- Lui, W. and P. Wang (2007). "Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis." Biotechnology Advances **25**(4): 369 - 384.

- Ma'or, Z., Y. Henis, Y. Alon, E. Orlov, K. B. Sorensen and A. Oren (2006). "Antimicrobial properties of Dead Sea black mineral mud." Journal of Dermatology **45**: 504 - 511.
- Machielsen, R., A. R. Uria, S. W. Kengen and J. van der Oost (2006). "Production and characterization of a thermostable alcohol dehydrogenase that belongs to the aldo-keto reductase superfamily." Appl Environ Microbiol **72**(1): 233-238.
- Madern, D., C. Ebel and G. Zaccai (2000). "Halophilic adaptation of enzymes." Extremophiles **4**: 91 - 98.
- Makinen, M. W. and B. Y. Moon (1981). "Coordination environment of the active-site metal ion of liver alcohol dehydrogenase." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(10): 6221 - 6225.
- Mallick, P., D. R. Boutz, D. Eisenberg and T. O. Yeates (2002). "Genomic evidence that the intracellular proteins of archaeal microbes contain disulfide bonds." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9679-9684.
- March, J. C. and W. E. Bentley (2004). "Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology." Curr Opin Biotechnol **15**(5): 495-502.
- Maret, W., I. Andersson, H. Dietrich, H. Schneider-Berndlöäher, R. Einarsson and M. Zeppezauer (1979). "Site-Specific Substituted Cobalt(II) Horse Liver Alcohol Dehydrogenase." European Journal of Biochemistry **98**(501 - 512).
- Maupin-Furlow, J. A., M. A. Gil, M. A. Humbard, P. A. Kirkland, W. Li, C. J. Reuter and A. J. Wright (2005). "Archaeal proteasomes and other regulatory proteases." Curr Opin Microbiol **8**(6): 720-728.
- McClellan, K. H., M. K. Winson, L. Fish, A. Taylor, S. Chhabra, M. Camara, M. Daykin, J. Lamb, S. Swift, B. Bycroft, S. A. B. Stewart and P. Williams (1997). "Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones
- " Microbiology **143**: 3703 - 3711.
- Mdluli, K. and M. Spigelman (2006). "Novel targets for tuberculosis drug discovery." Curr Opin Pharmacol **6**(5): 459-467.
- Mee, B., D. Kelleher, J. Frias, R. Malone, K. F. Tipton, G. T. Henehan and H. J. Windle (2005). "Characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase of *Helicobacter pylori*. An aldehyde dismutating enzyme." FEBS J **272**(5): 1255-1264.
- Messner, P. and U. B. Sleytr (1992). "Crystalline Bacterial Cell-Surface Layers." Advances in Microbial Physiology **33**: 214 - 277.

- Mevarech, M., F. Frolow and L. M. Gloss (2000). "Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt." Biophysical Chemistry **86**.
- Meyer, H.-P. (2011). "Sustainability and Biotechnology." Organic Process Research and Development **15**: 180 - 188.
- Michaelis, L. and M. Menten (1913). "Die Kinetik der Invertinwirkung."
- Michaelis, W., A. Jenisch and H. H. Richnow (1990). "Hydrothermal petroleum generation in the Red Sea sediments from the Kebrit and Shaban Deeps." Applied Geochemistry **5**: 103 - 114.
- Mijts, B. N. and B. K. C. Patel (2002). "Cloning, sequencing and expression of an alpha-amylase gene, amyA, from the thermophilic halophile Halothermothrix orenii and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme." Microbiology **148**: 2343 - 2349.
- Miller, A. R. (1964). "Highest salinity in the world ocean." Nature **203**: 341 - 360.
- Miller, A. R., C. D. Densmore, E. T. Degens, J. C. Hathaway, F. T. Manheim and P. J. McFarlin (1966). "Hot brines and recent iron deposits in deeps of the Red Sea." Geochimica et Cosmochimica **30**: 341 - 360.
- Miller, M. B. and B. L. Bassler (2001). "Quorum Sensing in Bacteria." Annual Reviews in Microbiology **55**: 165 - 199.
- Mironescu, M., I. D. Mironescu, V. Jascanu and C. Posten (2003). "Influence of cultivation Media on Halobacteria, Growth and Biomass Formation." ACTA Universitatis Cibiniensis **1(7)**: 17 - 24.
- Monod, J. (1949). "The growth of bacterial cultures." Annual Review of Microbiology **3**: 371 - 394.
- Monot, M., C. Boursaux-Eude, M. Thibonnier, D. Vallenet, I. Moszer, C. Medigue, I. Martin-Verstraete and B. Dupuy (2011). "Reannotation of the genome sequence of Clostridium difficile strain 630." J Med Microbiol **60(Pt 8)**: 1193-1199.
- Montella, C., L. Bellolell, R. Perez-Luque, J. Badia, L. Baldoma, M. Coll and J. Aguilar (2005). "Crystal structure of an iron-dependent group III dehydrogenase that interconverts L-lactaldehyde and L-1,2-propanediol in Escherichia coli." J Bacteriol **187(14)**: 4957-4966.
- Moon, J. H., H. J. Lee, S. Y. Park, J. M. Song, M. Y. Park, H. M. Park, J. Sun, J. H. Park, B. Y. Kim and J. S. Kim (2011). "Structures of iron-dependent alcohol dehydrogenase 2 from Zymomonas mobilis ZM4 with and without NAD⁺ cofactor." J Mol Biol **407(3)**: 413-424.
- Mullakhanbhai, M. and H. Larsen (1975). "Halobacterium volcanii spec. nov., a Dead Sea Halobacterium with a Moderate Salt Requirement." Arch. Microbiol. **104**: 207 - 217.

- Nelson, K. E., R. A. Clayton, S. R. Gill, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft and E. K. Hicky (1999). "Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*." Nature **399**.
- Ng, W. V., S. P. Kennedy, G. G. Mahairas, B. Berquist, M. Pan, H. D. Shukla, S. R. Lasky, N. S. Baliga, V. Thorsson, J. Sbrogna, S. Swartzell, D. Weir, J. Hall, T. A. Dahl, R. Welti, Y. A. Goo, B. Leithauser, K. Keller, R. Cruz, M. J. Danson, D. W. Hough, D. G. Maddocks, P. E. Jablonski, M. P. Krebs, C. M. Angevine, H. Dale, T. A. Isenbarger, R. F. Peck, M. Pohlschroder, J. L. Spudich, K. W. Jung, M. Alam, T. Freitas, S. Hou, C. J. Daniels, P. P. Dennis, A. D. Omer, H. Ebhardt, T. M. Lowe, P. Liang, M. Riley, L. Hood and S. DasSarma (2000). "Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 12176-12181.
- Niehaus, F., C. Bertoldo, M. Kähler and G. Antranikian (1999). "Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application." Applied Microbiology and Biotechnology **51**: 711 - 729.
- Noar, A., P. Lapiere, M. Mevarech, R. T. Papke and U. Gophna (2012). "Low species barriers in halophilic archaea and the formation of recombinant hybrids." Current Opinion in Biology **22**(15): 1444 - 1448.
- O'Toole, G., H. B. Kaplan and R. Kolter (1999). "Genetic Approaches to Study of Biofilms." Methods Enzymol. **310**: 91-109.
- Okolo, B., J. R. Johnston and D. R. Berry (1987). "Toxicity of Ethanol, n-Butanol and Iso-amyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae* when Supplied Separately and in Mixtures." Biotechnology Letters **9**(6): 431 - 434.
- Onishi, H. (1971). "Halophilic Amylase from a moderately halophilic *Micrococcus*." Journal of Bacteriology **109**(2): 570 - 574.
- Orell, A., S. Frols and S. V. Albers (2013). "Archaeal biofilms: the great unexplored." Annu Rev Microbiol **67**: 337-354.
- Oren, A. (1999a). "Microbiological studies in the Dead Sea: future challenges towards the understanding of life at the limit of salt concentrations." Hydrobiologia **405**: 1 - 9.
- Oren, A. (1999b). "Bioenergetic Aspects of Halophilism." Microbiology and Molecular Biology Reviews **63**(2): 334 - 348.
- Oren, A. (2008). "Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity." Saline Systems **4**: 2.
- Oren, A. (2009). "Microbial diversity and microbial abundance in salt-saturated brines: Why are the waters of hypersaline lakes red?" Natural Resources and Environmental Issues **15**(49).

- Oren, A. and P. Gurevich (1995). "Diversity of lactate metabolism in halophilic archaea." Canadian Journal of Microbiology **41**(3).
- Paggi, R. A., C. B. Martone, C. Fuqua and R. E. Castro (2003). "Detection of quorum sensing signals in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*." FEMS Microbiology Letters **221**(1): 49-52.
- Paiva, A. M., D. E. Vanderwall, J. S. Blanchard, J. W. Kozarich, J. M. Williamson and T. M. HKelly (2001). "Inhibitors of dihydrodipicolinat reductase, a key enzyme of the diaminopimelate pathway of *Mycobacterium tuberculosis*." Biochimica et Biophysica Acta **1545**: 67 - 77.
- Pandey, B., V. P. Pandey and U. N. Dwivedi (2011). "Cloning, expression, functional validation and modeling of cinnamyl alcohol dehydrogenase isolated from xylem of *Leucaena leucocephala*." Protein Expr Purif **79**(2): 197-203.
- Pautot, G., P. Guennoc, A. Coutelle and N. Lyberis (1984). "Discovery of a large brine deep in the Red Sea." Nature **310**: 133 - 136
- Pavelka, M. S., T. S. Weisbrod and W. R. Jacobs (1997). "Cloning of the *dapB* Gene, Encoding Dihydrodipicolinat Reductase, from *Mycobacterium tuberculosis*." Journal of Bacteriology **179**(8): 2777 - 2782.
- Pearce, F. G., C. Sprissler and J. A. Gerrard (2008). "Characterization of dihydrodipicolinate reductase from *Thermotoga maritima* reveals evolution of substrate binding kinetics." J Biochem **143**(5): 617-623.
- Perez-Pomares, F., V. Bautista, J. Ferrer, C. Pire, F. C. Marhuenda-Egea and M. J. Bonete (2003). "Alpha-amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*." Extremophiles **7**: 423 - 431.
- Persson, B., M. Krook and H. Jörnvall (1991). "Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes." European Journal of Biochemistry **200**: 537 - 543.
- Pfruender, H., R. Jones and D. Weuster-Botz (2006). "Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis." J Biotechnol **124**(1): 182-190.
- Pickl, A., U. Johnsen, R. M. Archer and P. Schönheit (2014). "Identification and characterization of 2-keto-3-deoxy-gluconat kinase and 2-keto-3-deoxy-galactonate kinase in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*." FEMS Microbiol Lett.
- Pickl, A., U. Johnsen and P. Schönheit (2012). "Fructose degradation in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* involves a bacterial type phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system, fructose-1-phosphate kinase, and class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase." J Bacteriol **194**(12): 3088-3097.

- Pierret, M. C., N. Clauer, D. Bosch, G. BLanc and C. France-Lanord (2001). "Chemical and isotopic ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, ^{18}O , D) constraints to the formation process of Red-Sea brines." Geochimica et Cosmochimica **65**(8): 1259 - 1275.
- Podar, M. and A. L. Reysenbach (2006). "New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles." Curr Opin Biotechnol **17**(3): 250-255.
- Pohlschröder, M., A. Ghosh, M. Tripepi and S. Albers (2011). "Archaeal type IV pilus-like structures - evolutionarily conserved prokaryotic surface organelles." Current Opinion in Biotechnology **2011**(14): 1 - 7.
- Purdy, K. J., T. D. Cresswell-Maynard, D. B. Nedwell, T. J. McGenity, W. D. Grant, K. N. Timmis and T. M. Embley (2004). "Isolation of haloarchaea that grow at low salinities." Environ Microbiol **6**(6): 591-595.
- Rademacher, H. (1999). Die Erde im Visir: Die Geowissenschaften an der Schwelle zum 21. Jahrhundert. Heidelberg, Springer.
- Radianingtyas, H. and P. C. Wright (2003). "Alcohol dehydrogenases from thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria." FEMS Microbiology Reviews **27**(5): 593-616.
- Raghubeer, E. V. and J. R. Matches (1990). "Temperature Range for Growth of Escherichia coli Sterotyp O157:H7 and Selected Coliforms in E. coli Medium." Journal of Clinical Microbiology **28**(4): 803 - 805.
- Reddy, S. G., J. C. Sacchettini and J. S. Blanchard (1995). "Expression, Purification and Characterization of Escherichia coli Dihydrodipicolinat Reductase." **3492 - 3501**.
- Reed, C. J., H. Lewis, E. Trejo, V. Winston and C. Evilia (2013). "Protein adaptations in archaeal extremophiles." Archaea **2013**: 373275.
- Reid, M. F. and C. A. Fewson (1994). "Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases." Critical Reviews in Microbiology **20**: 13 - 56.
- Reizer, J., A. Reizer and M. H. Saier (1993). "The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution and proposed functional differentiation of two repeated halves of the proteins." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **28**(3): 235 - 257.
- Robinson, J. L., B. Pyzyna, R. G. Atrasz, C. A. Henderson, K. L. Morrill, A. M. Burd, E. Desoucy, R. E. Fogleman, 3rd, J. B. Naylor, S. M. Steele, D. R. Elliott, K. J. Leyva and R. F. Shand (2005). "Growth kinetics of extremely halophilic archaea (family halobacteriaceae) as revealed by arrhenius plots." J Bacteriol **187**(3): 923-929.
- Robinson, R. (2016). "Archaea." Retrieved 3.3.2016, 2016.
- Rodriguez-Valera, F. and J. A. G. Lillo (1992). "Halobacteria as producers of polyhydroxyalcanoates." FEMS Microbiology Reviews **103**: 181 - 186.

- Rost, B. (1999). "Twilight zone of protein sequence alignments." Protein Engineering **12**: 85 - 94.
- Rothschild, L. J. and R. L. Mancinelli (2001). "Life in extreme environments." Nature **409**: 1092 - 1111.
- Rozzell, J. D. (1999). "Commercial Scale Biocatalysts: Myths and Realities." Bioorganic and Medicinal Chemistry **7**: 2253 - 2261.
- Sanchez-Porro, C., E. Mellado, C. Bertoldo, G. Antranikian and A. Ventosa (2003). "Screening and characterization of the protease CP1 produced by moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76." Extremophiles **7**: 221 - 389.
- Santillan, M. and M. C. Mackey (2008). "Quantitative approaches to the study of bistability in the lac operon of *Escherichia coli*." J R Soc Interface **5 Suppl 1**: S29-39.
- Sára, M. and U. B. Sleytr (2000). "S-layer Proteins." Journal of Bacteriology **182**(4): 859 - 868.
- Satosi, H., O. Seigo, T. Kenji, K. Kazuhisa, K. Tetsuo, K. Toshiaki and K. Hitosi (2001). "Chemo-enzymatic synthesis of 3-(2-naphthyl)-L-alanine by an amino transferase from the extreme thermophile *Thermococcus profundus*." Biotechnological Letters **23**: 589 - 591.
- Scapin, G., S. G. Reddy, R. Zheng and J. S. Blanchard (1997). "Three-Dimensional Structure of *Escherichia coli* Dihydrodipicolinate Reductase in Complex with NADH and the Inhibitor 2,6-Pyridinedicarboxylate." Biochemistry **36**: 15081 - 15088.
- Schiraldi, C. and M. De Roas (2002). "The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles." Trends in Biotechnology **20**(12): 515 - 521.
- Schmid, A., J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts and B. Witholt (2001). "Industrial biocatalysis today and tomorrow." Nature **409**(11): 258 - 268.
- Schneegurt, M. A. (2012). "Media and Conditions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archaea." 35-58.
- Scholten, J. C., P. Stoffers, D. Garbe-Schönberg and M. Moammar (2000). Handbook of Marine Mineral Deposits. Boca-Raton CRC-Press.
- Scopes, R. K. (1983). "An iron-activated alcohol dehydrogenase." FEBS Letters **156**(2): 303 - 306.
- Sehgal, S. N. and N. E. Gibson (1960). "Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*." Canadian Journal of Microbiology **6**: 165 - 169.
- Sellek, G. A. and J. B. Chaudhuri (1999). "Biocatalysts in organic media using enzymes from extremophiles." enzyme and microbial technology **25**: 471 - 482.

- Shafiei, M., A. A. Ziaee and M. A. Amoozegar (2012). "Purification and characterization of a halophilic alpha-amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F." Extremophiles **16**(4): 627-635.
- Sherwood, K. E., D. J. Cano and J. A. Maupin-Furlow (2009). "Glycerol-mediated repression of glucose metabolism and glycerol kinase as the sole route of glycerol catabolism in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*." J Bacteriol **191**(13): 4307-4315.
- Siam, R., G. A. Mustafa, H. Sharaf, A. Moustafa, A. R. Ramadan, A. Antunes, V. B. Bajic, U.
- Stingl, N. G. Marsis, M. J. Coolen, M. Sogin, A. J. Ferreira and H. E. Dorry (2012). "Unique prokaryotic consortia in geochemically distinct sediments from Red Sea Atlantis II and discovery deep brine pools." PLoS One **7**(8): e42872.
- Sigrist, C. J., E. de Castro, L. Cerutti, B. A. Cucho, N. Hulo, A. Bridge, L. Bougueleret and I. Xenarios (2013). "New and continuing developments at PROSITE." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D344-347.
- Slytr, U. B., B. Messner, P. Pum and M. Sára (1996). "Crystalline Bacterial Cell Surface Protein." Academic Press.
- Slytr, U. B. and M. Sára (1997). "Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnical applications." TIBTECH **15**: 20 - 26.
- Soppa, J. (2005). "From replication to cultivation: hot news from Haloarchaea." Curr Opin Microbiol **8**(6): 737-744.
- Soppa, J. (2006). "From genomes to function: haloarchaea as model organisms." Microbiology **152**(Pt 3): 585-590.
- Soppa, J. (2011). "Functional genomic and advanced genetic studies reveal novel insights into the metabolism, regulation, and biology of *Haloferax volcanii*." Archaea **2011**: 602408.
- Souza, P. and P. Magalhaes (2010). "Application of Microbial alpha-amylase in Industry - a review." Brasilian Journal of Microbiology **41**: 850 - 861.
- Stan-Lotter, H., E. Doppler, M. Jarosch, C. Radax, C. Gruber and K. I. Inatomi (1999). "Isolation of a chymotrypsinogen B-like enzyme from the archaeon *Natronomonas pharaonis* and other halobacteria." Extremophiles **3**: 153 - 161.
- Stingl, U., D. K. Ngugi, L. Thompson, A. Antunes and M. Cahill (2012). "Mikrobielle Ökonomie des Roten Meeres." BIOspektrum **18**(6): 582 - 584.
- Strillinger, E., S. W. Grotzinger, T. Allers, J. Eppinger and D. Weuster-Botz (2015). "Production of halophilic proteins using *Haloferax volcanii* H1895 in a stirred-tank bioreactor." Appl Microbiol Biotechnol.

- Stroud, A., S. Liddell and T. Allers (2012). "Genetic and Biochemical Identification of a Novel Single-Stranded DNA-Binding Complex in *Haloferax volcanii*." Front Microbiol **3**: 224.
- Sun, H. and B. V. Plapp (1992). "Progressive Sequence Alignment and Molecular Evolution of Zn-Containing Alcohol Dehydrogenase Family." Journal of Molecular Evolution **34**: 522 - 535.
- Sundarram, A., T. Pandurangappa and K. Murthy (2014). "alpha-Amylase Production and Application: A Review." Applied and Environmental Microbiology **2**(4): 166 - 175.
- Tawara, E. and N. Kamo (1991). "Glucose transport of *Haloferax volcanii* requires the Na⁺ electrochemical potential gradient and inhibitors for the mammalian glucose transporter inhibit the transport." Biochimica et Biophysica Acta **1070**: 293 - 299.
- Thompson, D., J. Palmer and C. J. Daniels (1999). "Expression and heat responsive regulation of a TFIIB homologue from the archaeon *Haloferax volcanii*." Molecular Microbiology **33**(5): 1081 - 1092.
- Timpson, L. M., D. Alsafadi, C. Donnchadha, S. Liddell, M. Sharkey and F. Paradisi (2012). "Characterization of alcohol dehydrogenase (ADH12) from *Haloarcula marismortui*, an extreme halophile from the Dead Sea." Extremophiles **16**(1): 57 - 66.
- Timpson, L. M., D. Alsafadi, C. Mac Donnchadha, S. Liddell, M. A. Sharkey and F. Paradisi (2012). "Characterization of alcohol dehydrogenase (ADH12) from *Haloarcula marismortui*, an extreme halophile from the Dead Sea." Extremophiles **16**(1): 57-66.
- Timpson, L. M., A. K. Liliensiek, D. Alsafadi, J. Cassidy, M. A. Sharkey, S. Liddell, T. Allers and F. Paradisi (2013). "A comparison of two novel alcohol dehydrogenase enzymes (ADH1 and ADH2) from the extreme halophile *Haloferax volcanii*." Appl Microbiol Biotechnol **97**(1): 195-203.
- Tishkov, V. I. and V. O. Popov (2006). "Protein engineering of formate dehydrogenase." Biomol Eng **23**(2-3): 89-110.
- Torreblanca, M., F. Rodriguez-Valera, G. Juez, A. Ventosa, M. Kamekura and M. Kajs (1986). "Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov." Syst Appl Microbiol **8**: 89 - 99.
- Tripepi, M., R. N. Esquivel, R. Wirth and M. Pohlschroder (2013). "*Haloferax volcanii* cells lacking the flagellin FlgA2 are hypermotile." Microbiology **159**(Pt 11): 2249-2258.
- Tripepi, M., S. Imam and M. Pohlschroder (2010). "*Haloferax volcanii* flagella are required for motility but are not involved in PibD-dependent surface adhesion." J Bacteriol **192**(12): 3093-3102.

- Tripepi, M., J. You, S. Temel, O. Onder, D. Brisson and M. Pohlschroder (2012). "N-glycosylation of *Haloferax volcanii* flagellins requires known Agl proteins and is essential for biosynthesis of stable flagella." J Bacteriol **194**(18): 4876-4887.
- van den Burg, B. (2003). "Extremophiles as a source for novel enzymes." Current Opinion in Microbiology **6**(3): 213-218.
- van der Oost, J., W. G. B. voorhorst, S. W. Kengen and A. C. M. Geerling (2001). "Genetic and biochemical characterization of a short-chain alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic strain *Pyrococcus furiosus*." European Journal of Biochemistry **268**: 3062 - 3068.
- Vidal, R., L. Lopez-Maury, M. G. Guerrero and F. J. Florencio (2009). "Characterization of an alcohol dehydrogenase from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 that responds to environmental stress conditions via the Hik34-Rre1 two-component system." J Bacteriol **191**(13): 4383-4391.
- Vieille, C., J. M. Hess, R. M. Kelly and J. G. Zeikus (1995). "xylA cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*." Applied and Environmental Microbiology **61**: 1867 - 1875.
- Vieille, C. and J. D. Zeikus (1996). "Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability." Microbiol Mol Biol Rev **65**: 1 - 63.
- Voisard, D., F. Meuwly, P. A. Ruffieux, G. Baer and A. Kadouri (2003). "Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells." Biotechnol Bioeng **82**(7): 751-765.
- Voorhorst, W. G. B., R. I. L. Eggen, E. J. Luesink and W. M. de Vos (1995). "Characterization of the cel B gene coding for beta-galactosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and its expression and site-directed mutation in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **177**: 7105 - 7111.
- Voorhorst, W. G. B., A. C. M. Geerling, G. Schut, I. Dahlke, M. Thomm and J. van der Oost (1999). "Transcriptional regulation in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: coordinated expression of divergently oriented genes in response to beta-linked glucose polymerism." Journal of Bacteriology **181**: 3777 - 3783.
- Waino, M. and K. Ingvorsen (2003). "Production of beta-xylanase and beta-xylosidase by the extremely halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76." Extremophiles **7**: 87 - 93.
- Wang, Y., H. Cao, G. Zhang, S. Bougouffa, O. O. Lee, A. Al-Suwailem and P. Y. Qian (2013). "Autotrophic microbe metagenomes and metabolic pathways differentiate adjacent Red Sea brine pools." Sci Rep **3**: 1748.
- Waters, C. M. and B. L. Bassler (2005). "Cell-to-Cell Communication in Bacteria." Annual Review of Cell Development Biology **21**: 319 - 346.

- Watson, S. W. and J. B. Waterbury (1969). Hot Brines and Recent Heavy Metal Deposits in the Red Sea. New York, Springer-Verlag.
- Wejse, P. L., K. Ingvorsen and K. Mortensen (2003). "Purification and characterization of two extremely halotolerant xylanases from a novel from a novel halophilic bacterium." Extremophiles **7**: 299 - 306.
- Wichmann, R. and D. Vasic-Racki (2005). "Cofactor Regeneration at the Lab Scale." **92**: 225-260.
- Wisniack, J. (2002). "The Dead Sea - A live pool of chemicals." Indian Journal of Chemical Technology **9**: 79 - 87.
- Woese, C. R., O. Kandler and M. L. Wheelis (1990). "Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya." Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 4756 - 4579.
- Wolfe, A. J. (2005). "The acetate switch." Microbiol Mol Biol Rev **69**(1): 12-50.
- Woodside, S. M., B. D. Bowen and J. M. Piret (1998). "Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors." Cytotechnology **28**: 163 - 175.
- Woodyer, R. D., T. W. Johannes and H. Zhao (2006). Regeneration of Cofactors for Enzyme Biocatalysis. Enzyme Technology. A. Pandey, C. Webb, C. R. Soccol and C. Larroche, Springer.
- Zaigler, A., S. C. Schuster and J. Soppa (2003). "Construction and usage of a onefold-coverage shotgun DNA microarray to characterize the metabolism of the archaeon *Haloferax volcanii*." Molecular Microbiology **48**(4): 1089 - 1105.
- Zeikus, J. D., C. Vieille and A. Savchenko (1998). "Thermozymes: biotechnology and structure function relationship." Extremophiles **2**(3): 179 - 183.
- Zhang, K., M. R. Sawaya, D. S. Eisenberg and J. C. Liao (2008). "Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20653-20658.
- Zhang, S., G. Pohnert, P. Kongsaree, D. B. Wilson, J. Clardy and B. Ganem (1998). "Chorismate Mutase-Prephenate Dehydratase from *Escherichia coli*. STUDY OF CATALYTIC AND REGULATORY DOMAINS USING GENETICALLY ENGINEERED PROTEINS." Journal of Biological Chemistry **273**(11): 6248-6253.
- Zhang, Y., K. Post-Martens and S. Denkin (2006). "New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy." Drug Discovery Today **11**(1-2): 21-27.
- Zhao, H. and W. A. van der Donk (2003). "Regeneration of cofactors for use in biocatalysis." Current Opinion in Biotechnology **14**(6): 583-589.

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
% (v/v)	Volumen Prozent
% (w/w)	Massen Prozent
μ	Wachstumsrate
ADH/A1	Alkoholdehydrogenase aus dem Solebecken Atlantis II
ADH/D1	Alkoholdehydrogenase aus dem Solebecken Discovery
APS	Ammoniumperoxodisulfat
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DO	Dissolved oxygen, Gelöstsauerstoffkonzentration
DR/A1	Dihydrodipicolinat Reduktase aus dem Solebecken Atlantis II
DR/D1	Dihydrodipicolinat Reduktase aus dem Solebecken Discovery
DRSB	Deep Red Sea Brine Pools
5-FOA	5-Fluoroorotic Säure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMAC	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
k_{cat}	Wechselzahl
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Lysogen Broth
M_w	Molekulare Masse
NAD^+	Nikotinamid Adenin Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinamid Adenin Dinukleotid (reduzierte Form)
$NADP^+$	Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat (reduzierte Form)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
SDS	Sodium dodecyl Sulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamid
Tris	Tris(hydroxymethyl) Aminomethan
U	Enzymeinheit $U = \mu\text{mol min}^{-1}$

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Rotes Meer mit den Solebecken, <i>Kebrit</i> , <i>Discovery</i> und <i>Atlantis II</i>	9
Abbildung 3.2: Phylogenetischer Stammbaum	13
Abbildung 3.3: Reaktion von Dihydrodipicolinat	17
Abbildung 3.4 Zellen von <i>Haloferax volcanii</i> (Noar, Lapierre et al. 2012).....	24
Abbildung 3.5: Stoffwechselweg halophiler Archaeen.....	27
Abbildung 3.6: Aufbau der Zelloberflächenstrukturen von Archäen	30
Abbildung 3.7: Mechanismus zur Genregulation nach <i>Quorum Sensing</i> :	31
Abbildung 3.8: Rührkesselreaktor mit 6-Blatt Scheibenrührer im kontinuierlichen Betrieb...	35
Abbildung 3.9: Typischer Wachstumsverlauf von Mikroorganismen im Satzverfahren.....	37
Abbildung 3.10: Membranreaktor	40
Abbildung 3.11: Schema einer irreversiblen 1-Substrat-1-Produkt Enzymreaktion.....	41
Abbildung 3.12: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (v) von der Substratkonzentration (c_s) nach Michaelis-Menten.....	42
Abbildung 3.13: Schema zur Darstellung eines Cofaktor-Regenerierungssystems mit zwei Enzyme.....	45
Abbildung 3.14: Katalysierte Reaktionen durch die beiden Enzyme Formiatdehydrogenase (FDH) und Glukosedehydrogenase (GDH).....	46
Abbildung 4.1 Deletion der Gene Hvo_1033 und Hvo_1034 in <i>Haloferax volcanii</i> H1424...	58
Abbildung 4.2: Aufbau des 7,5 L Rührkesselreaktors mit Doppelmantel	64
Abbildung 4.3: Aufbau zur automatisierten Kultivierung mit dem parallelen Bioreaktorblock	69
Abbildung 5.1: Ergebnis der Kolonie-PCR von 5-FOA resistenten Kolonien (a – y).....	83
Abbildung 5.2: Ergebnisse des Oberflächen Adhäsionstests zur Evaluierung der Biofilmbildung	85
Abbildung 5.3: Kultivierung der <i>Haloferax volcanii</i> H1895 (▲), H1830 (□), H1424 Δ pilB3C3 g (●), H1424 Δ pilB3C3 n (●) und H1424 (●) in Hv-YPC bei 45°C, pH 7,5 und 2500 U min ⁻¹	86

Abbildung 6.1: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> im sterilen 500 mL Schüttelkolben mit 100 mL definierten Medium CDM bei 45°C und 170 U min ⁻¹	91
Abbildung 6.2: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Rührkesselreaktor	92
Abbildung 6.3: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Rührkesselreaktor	93
Abbildung 6.4: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Rührkesselreaktor unter Verwendung von 2 L des definierten Mediums Hv-Min.	94
Abbildung 6.5: Kultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1424 (○) und H1895 (□) in 100 mL sterilem Komplexmedium Hv-YPC in einem 500 mL Schüttelkolben bei 45°C, pH 7,5 und 170 U min ⁻¹	95
Abbildung 6.6: Kultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Rührkesselreaktor in 2 L Hv-YPC	96
Abbildung 6.7: Kultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Satzverfahren im Rührkesselreaktor in 2 L Hv-YPC-Medium	97
Abbildung 6.8: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Rührkesselreaktor in 2 L Hv-YPC	98
Abbildung 6.9: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Rührkesselreaktor in 2 L Hv-YPC-Medium	99
Abbildung 6.10: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Rührkesselreaktor in 2 L Hv-YPC	100
Abbildung 6.11: relative Biotrockenmassekonzentration einer Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im parallelen Bioreaktorblock (bioREAKTOR48)	101
Abbildung 6.12: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im parallelen Bioreaktorblock (bioREAKTOR48)	102
Abbildung 6.13: Einfluss der Salinität auf das Wachstum von <i>Haloferax volcanii</i> H1895... 103	
Abbildung 6.14: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Membranreaktor im angereicherten Hv-YPC Medium mit kontinuierlichem Medienaustausch und vollständiger Zellrückhaltung.	104
Abbildung 6.15: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Membranreaktor im angereicherten Hv-YPC Medium mit kontinuierlichem Medienaustausch und vollständiger Zellrückhaltung. Darstellung der Konzentration des gebildeten Acetats bei 0,1 h ⁻¹ (□) und 0,075 h ⁻¹ (○)	104

Abbildung 7.1: Spezifische β -Galaktosidase Aktivität von <i>Haloferax volcanii</i> H895_pTA1228-bgaH	112
Abbildung 7.2: Spezifische β -Galaktosidase Aktivität	114
Abbildung 7.3: Darstellung der spezifischen β -Galaktosidase Aktivität	116
Abbildung 7.4: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895_pTA963-ADH/D1 im Rührkesselreaktor in 2 L angereichertem Hv-YPC Medium	119
Abbildung 7.5: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895_pTA963-ADH/D1 (●) und H1895_pTA963-ADH/A1 (○) im Rührkesselreaktor in 1 L angereicherten Hv-YPC Medium	120
Abbildung 7.6 SDS-PAGE Analyse der gereinigten Alkoholdehydrogenasen	121
Abbildung 7.7: Gereinigtes ADH/D1 und ADH/A1,	123
Abbildung 7.8: Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895_pTA963-DR/D1	126
Abbildung 7.9: SDS-PAGE Analyse der gereinigten Dihydrodipicolinat Reduktasen	127
Abbildung 8.1: Substratspektrum von ADH/D1 dargestellt in relativer Aktivität, %.	129
Abbildung 8.2: Reaktionsweg der Alkpololdehydrogenase	130
Abbildung 8.3: spezifische Aktivität von ADH/D1 mit verschiedenen Metallionen	131
Abbildung 8.4: Darstellung der spezifischen Aktivität von 0,35 μ M AHD/D1 inkubiert in 10 μ M Mn ²⁺ (□) oder 10 μ M Zn ²⁺ (■) bei RT für 30 min.	133
Abbildung 8.5: spezifische Aktivität bei verschiedenen DMSO Konzentrationen im Versuchsansatz 0% (□), 5% (■), 10% (■), und 20% (■).	137
Abbildung 8.6: Temperaturstabilität der ADH/D1. Halbwertszeit bei -20°C, 4°C, 25°C und * 50°C (Halbwertszeit: 6,3 h)	138
Abbildung 8.7: Darstellung der Aminosäuresequenz der Alkoholdehydrogenase ADH/D1.	140
Abbildung 8.8: Reaktion des Substrates Citraconsäure Anhydrid zum Produkt Methylsuccinat Anhydrid	145
Abbildung 8.9: Darstellung der spezifischen Aktivität von 3 μ M DR/A1	147
Abbildung 8.10: Darstellung der spezifischen Aktivität von 3 μ M DR/D1	149
Abbildung 8.11: Halbwertszeiten des Aktivitätsverlusts von DR/A1 (■) und DR/D1 (■) bei einer Lagertemperatur von -20°C, 4°C und 25°C.	151
Abbildung 8.12: Darstellung eines Ausschnitts Aminosäuresequenz der Dihydrodipicolinat Reduktase DR/D1	152

Abbildung 8.13: Darstellung eines Ausschnitts Aminosäuresequenz der Dihydrodipicolinat Reduktase DR/A1	153
Abbildung 9.1: Biotrokenmassekonzentration bei der Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1895_pTA963-ADH/D1 im 250 mL Schüttelkolben	157
Abbildung 9.2: Gemessene Produktkonzentration (1-Pentanol).....	158
Abbildung 9.3: Gemessene Produktkonzentration (1-Pentanol).....	159
Abbildung 9.4: Umsatz von 1,0 g L ⁻¹ 1-Pentanal.....	160
Abbildung 12.1: Plasmid pTA963	200
Abbildung 12.2: Plasmid pTA1228-bgaH	201

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Aufstellung der identifizierten Gen mit Hilfe des PPM Algorithmus (Grötzinger, Alam et al. 2014).....	12
Tabelle 3.2: Kosten der Cofaktoren (Wichmann and Vasic-Racki 2005).....	44
Tabelle 4.1: Zusammensetzung des <i>Lysogeny Broth</i> (LB) Mediums	47
Tabelle 4.2: Zusammensetzung des SOB Mediums.....	48
Tabelle 4.3: Zusammensetzung des CCMB80 Puffers	48
Tabelle 4.4: Bestandteile des Komplexmediums Hv-YPC	48
Tabelle 4.5: Zusammensetzung des Hv-Ca Agars.	49
Tabelle 4.6: Zusammensetzung des Minimalmediums Hv-Min	50
Tabelle 4.7: Zusammensetzung der Kohlenstoffquelle für das definierte Medium Hv-Min... 50	
Tabelle 4.8: Spurenelementlösung für die definierten Medien Hv-Min und CDM.....	50
Tabelle 4.9: Zusammensetzung des definierten Mediums CDM.....	51
Tabelle 4.10: Zusammensetzung der 30%igen Salzwasserlösung.....	51
Tabelle 4.11: In dieser Arbeit verwendete <i>Haloferax volcanii</i> Stämme mit ihrem Genotyp... 52	
Tabelle 4.12: In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i> Stämme und ihr Genotyp.....	53
Tabelle 4.13: In dieser Arbeit verwendete Plasmide mit den codierenden Gensequenzen zur heterologen Genexpression.	53
Tabelle 4.14: Primer zur Untersuchung der Gendeletion Hvo_1033 und Hvo_1034 in <i>Haloferax volcanii</i> H1424.	55
Tabelle 4.15: Zusätze	59
Tabelle 4.16: bgaH Expression in H1895 im 250 mL Schüttelkolben in 50 mL Hv-YPC.....	61
Tabelle 4.17: Komponenten, die in einzelnen Satzverfahren im Rührkesselreaktor zum Komplexmedium Hv-YPC hinzugegeben wurden.....	66
Tabelle 4.18: Gegenüberstellung des angereicherten Hv-YPC Mediums zum ursprünglichen Hv-YPC Medium.	66
Tabelle 5.1: Verwendete Kontrollstämme für die Bewertung der Δ pilB3C3 Stämme bei der phänotypischen Charakterisierung	84

Tabelle 6.1: Spezifische Wachstumsrate μ , ermittelt durch exponentielle Regression und die Biomasseertrags- bzw. Produktselektivitätskoeffizienten $Y_{X/S}$ & $Y_{P/S}$ für die Kultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> H1424 im Schüttelkolben.....	91
Tabelle 8.1: Darstellung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten v_{max} bei der Umsetzung der drei Substrate Cinnamylalkohol, 1-3-Propandiol und 1,5-Pentandiol mit 0,35 μ M ADH/D1 bei 60°C, 3 M KCl in 50 mM Glycin pH 10 und 20 mM NAD ⁺	134
Tabelle 8.2: Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, der Michaelis-Menten Konstante und der Wechselzahl k_{cat} mit 5 μ M ADH/D1 bei 70°C, 3 M KCl in 50 mM Glycin pH 10 und 40 mM 1-5-Pentandiol.....	135
Tabelle 8.3: Vergleich der heterolog exprimierten Alkoholdehydrogenase ADH/D1 mit anderen extremophilen Alkoholdehydrogenasen.....	143
Tabelle 8.4: Vergleich der heterolog exprimierten Alkoholdehydrogenase ADH/D1 mit anderen Alkoholdehydrogenasen (Cinnamylalkohol Dehydrogenasen CAD), die ebenfalls Cinnamylalkohol als Substrat nutzen.....	144
Tabelle 8.5: maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} , Michaelis-Menten-Konstante K_M und Wechselzahl k_{cat} für die Dihydrodipicolinat Reduktasen DR/A1	150
Tabelle 8.6 Vergleich der heterolog exprimierten Dihydrodipicolinat Reduktasen DR/D1 und DR/A1 mit anderen Dihydrodipicolinat Reduktasen aus der Literatur.....	155
Tabelle 10.1: Exprimierte und aufgereinigte Proteine aus den Solebecken. Darstellung der optimalen Bedingungen und der maimalen spezifischen Aktivität.....	166
Tabelle 12.1: Verwendete Substrate.....	198
Tabelle 12.2: Verwendete Substrate zur Bestimmung der Substratspezifität von DR/D1 und DR/A1	199
Tabelle 12.3: Benötigte Puffer und Stocklösungen zur Medienherstellung.....	201
Tabelle 12.4: Stocklösungen der Kohlenstoffquellen, die zur Satzkultivierung von <i>Haloferax volcanii</i> in CDM verwendet wurden.	201
Tabelle 12.5: Allgemeine Laborgeräte.....	202
Tabelle 12.6: Chemikalienliste.....	203
Tabelle 12.7: Einzelkomponenten des parallelen Bioreaktorblocks	204
Tabelle 12.8: Labfors	204
Tabelle 12.9 Fast Protein Liquid Chromatography	205

Tabelle 12.10: HPLC Geräte und benötigte Säulen 205

12 Anhang

12.1 Substrate

Tabelle 12.1: Verwendete Substrate zur Bestimmung der Substratspezifität von ADH/D1

Substrat	$M_W \text{ g mol}^{-1}$
Ethanol	46,06
Methanol	32,04
1,5-Pentandiol	104,15
1,3-Propandiol	76,09
1-Heptanol	116,20
1-Pentanol	88,15
2-Methyl-2-Propanol	74,12
2-Propanol	60,10
1-Butanol	74,12
2-Butanol	74,12
Sorbitol	182,17
1-Hexanol	102,17
1-Phenylethanol	122,17
3-Methyl-3-Pentanol	102,17
Cyclohexanol	100,16
3-Methyl-2-buten-1-ol	86,13
2-3-Butandiol	90,12
3-Buten-2-ol	72,11
3-Octanol	130,14
3-Pentanol	88,14
Pentaerythritol	136,15
Glycerol	92,09
Cinnamylalkohol	134,18

Tabelle 12.2: Verwendete Substrate zur Bestimmung der Substratspezifität von DR/D1 und DR/A1

Substrat	M_w, g mol⁻¹
Ketoisophorone	152,19
Trans-2-pentene-1-al	84,12
R-Carvone	150,22
S-Carvone	150,22
Mesaconic acid	130,10
2-Methyl-2-cyclopenten-1-on	96,13
3-phenyl-2-methylpropenal	146,19
Citraconsäure Anhydrid	112,08
3-Methyl-2-cyclohexen-1-on	110,15
Maleimid	97,07
Citral	152,23
1-Acetyl-1-Cyclohexene	124,65
1-Methyl-N-phenylmaleimid	187,19
Coumarine	146,14
Itaconic acid	130,10
Menadione	172,24
Citronellal	154,28

(Karan, Capes et al. 2013)

12.2 Plasmide

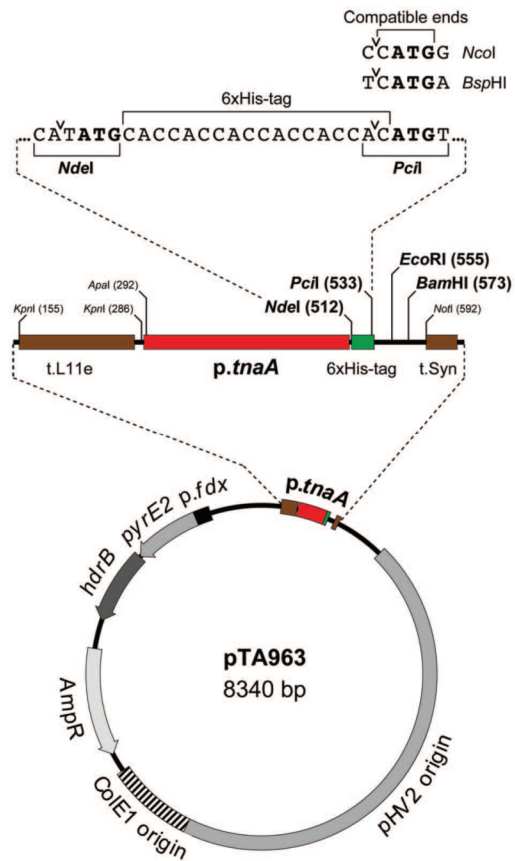


Abbildung 12.1: Plasmid pTA963

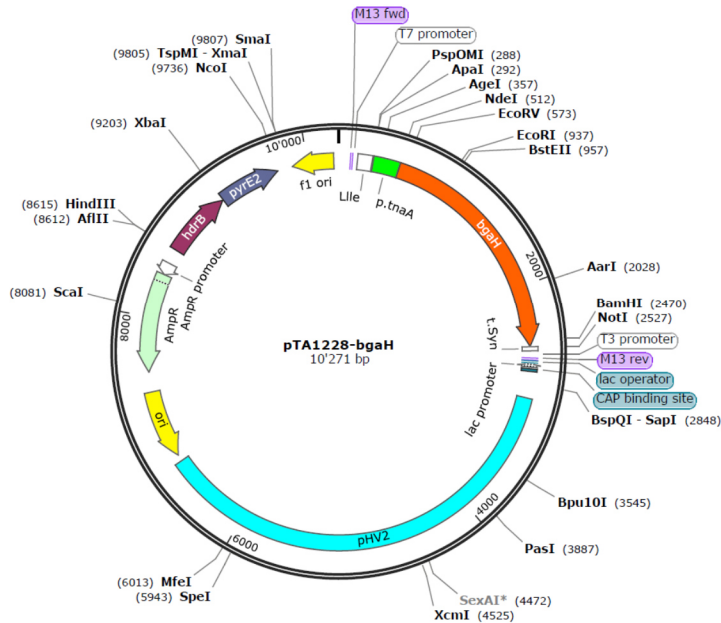


Abbildung 12.2: Plasmid pTA1228-bgaH

12.3 Puffer und Stocklösungen

Tabelle 12.3: Benötigte Puffer und Stocklösungen zur Medienherstellung

Puffer, Lösungen	Konzentration	Herstellung
CaCl ₂	1 M	eingewogen, in VE-H ₂ O gelöst und autoklaviert
Tris-HCl, pH 7,5	1 M	eingewogen, in VE-H ₂ O gelöst, mit HCl auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert
MgSO ₄ *7H ₂ O	1 M	eingewogen, in VE-H ₂ O gelöst und autoklaviert
Ethanol	20% (v/v)	99% Ethanol (HPLC-Grade) mit VE-H ₂ O verdünnt

Tabelle 12.4: Stocklösungen der Kohlenstoffquellen, die zur Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* in CDM verwendet wurden.

Kohlenstoffquelle	Konzentration	Herstellung
Acetat	1 M	eingewogen, in VE-H ₂ O gelöst und autoklaviert
Glukose	1 M	eingewogen, in VE-H ₂ O gelöst und autoklaviert
Succinat	1 M	eingewogen, in VE-H ₂ O gelöst und autoklaviert

12.4 Allgemeine Geräte und Materialien

Tabelle 12.5: Allgemeine Laborgeräte

Geräte	Hersteller
Abluftfilter, 516-6896	VWR, Darmstadt, Deutschland
Aluminium Deckel für HPLC Fläschen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Analytische Waage Explorer 10 mg - 210 g	Ohaus, Gießen
Analytische Waage Explorer 5 g - 32 kg	Ohaus, Gießen
Autoklav, Systec 5075 ELV	Systec, Wettenberg
Deckgläser 24x50 mm	Marienfeld Superior
Einstrahlphotometer Spectronic Genesys 20	Thermo Electron, Dreieich
Einwegküvetten, Halb-Mikro	A. Hartenstein
Magnetische Rührer, 10 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
Mikropipette, 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL, 10 mL	Brand, Wertheim
Mikrotiterplatte, Deepwell	Nunc
MTP-Photometer EL 808IU	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
MTP-Photometer Software KC Junior v. 1.10	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
pH Einstabmesskette N 6000 A	Schott, Mainz
pH Elektrode Blue Line 14 pH	Schott, Mainz
pH Meter CG 843	Schott, Mainz
Probenfläschen HPLC, 1,5 mL	VWR, Darmstadt, Deutschland
Reagenzgefäße 15 mL, 50 mL	Nunc
Spitzenfilter, 0,2 µm 25 mm, PET	Roth, Deutschland
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Ultraschallbad Ultrasonic cleaner	VWR, Darmstadt
Vivaspin, Zentrifugenröhrchen, MWCO 10 kDa	VWR, Darmstadt, Deutschland
Wise Cube Schüttelinkubator WIS-20	Witeg Labortechnik, Wertheim, Deutschland
Zuluftfilter, Midistart 2 µm	Watson-Marlow

Tabelle 12.6: Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
1-Pentanol	Sigma Aldrich	398268-500ML
5-Fluoroorotic acid hydrate	Sigma Aldrich	796999-250MG
Adenin	Sigma Aldrich	A8626-1G
Agar	Carl Roth	5210.1
Ammoniak, 25%	neolab	40.802.500
Ammoniumchlorid	Carl Roth	K298.1
Ampicillin	Carl Roth	K029.1
Antifoam 204	Sigma Aldrich	A6428
Biotin	Sigma Aldrich	B4501-16
Calciumchlorid	Carl Roth	A119.1
Casaminhydrolysat	Carl Roth	AE41.2
Cytosin	Sigma Aldrich	C3506-1G
di-Potassiumhydrogenphosphat	neolab	5494,1
EDTA	Carl Roth	X986.2
Ethanol, 99%	Carl Roth	9065.1
Glukose Monohydrat	Carl Roth	6887.1
Glycerin, 80%	Carl Roth	3783.2
Guanin	Sigma Aldrich	G11950-10G
Hypoxanthin	Sigma Aldrich	H9639-56
Imidazol	Sigma Aldrich	56750-149
L-Tryptophan	Sigma Aldrich	TO254-100G
Laktat, DL, 60%	Sigma Aldrich	L1375
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth	M2393-500G
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Carl Roth	T888.3
Manganese II chlorid	VWR	25.222.233
NaCl	Carl Roth	3957.2
Pepton	Fluka	87972-1KG
Pantothensäure	Sigma Aldrich	PHR1323-500MG
Potassiumchlorid	AppliChem	A3582,1000
Potassium-di-hydrogenphosphat	neolab	5494,1
Salzsäure, rauchend 37%	Carl Roth	4625.2
Thymidin	AlfaAesar	A11493
Tris Pufferan	Carl Roth	AE15.2
Uracil	Sigma Aldrich	U0750-5G
Valeraldehyd	Sigma Aldrich	110132-250ML
Yeast Extract	Sigma Aldrich	92144-500G
Zinkchlorid	Sigma Aldrich	746355-500G

12.5 Rührkesselreaktoren

Tabelle 12.7: Einzelkomponenten des parallelen Bioreaktorblocks

Geräte	Hersteller
150 L Vorlage- und Abwasserbehälter	Schubert Kunststoff GmbH, München
MULTIstar 400 W	Fryka Kältetechnik
Heizbad Haake W15 mit Thermostat Haake C 10	Thermo Fisher Scientific
thermischer Massendurchflussregler Brooks 5850S	Westphal Mess- und Regeltechnik GmbH, Ottobrunn
Bioreaktorblock mit Sterilgasabdeckung und Rührer	2mag, München
Optosensorik (MultiChannel Reader for pH and oxygen)	PreSens Precision Sensing, Regensburg, Deutschland
Milliliter-Reaktoren	PreSens Precision Sensing, Regensburg, Deutschland
MTP Photometer Fluostar Galaxy	BMG Laboratories, Offenburg
MTP-Waschstation Columbus	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Genesis Workstation	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Software	Hersteller
Gemini 3.40 SP2	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
fedbatch XP 1.0.213	DASGIB AG, Jülich
fedbatch XP Server 1.0.21	DASGIB AG, Jülich
Fluostar 4.31	BMG Laboratories, Offenburg

Tabelle 12.8: Labfors

Geräte	Hersteller
Labfors Reaktor 7,5 L	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
Rührer 3 6-Blattscheibenrührer	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
Kontrolleinheit	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
pO ₂ Sonde, Visiferm DO Sensor	Hamilton, Höchst
pH Elektrode, Easyferm	Hamilton, Höchst
Abgasanalyse	BlueSens, Herten
Pumpe ISM 444	Ismatec Glattbrugg, Schweiz
Filterkartusche 750 kDa	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Software	Hersteller
Iris-NT Pro Version 6.0	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz

12.6 Proteinaufreinigung

Tabelle 12.9 Fast Protein Liquid Chromatography

Geräte	Hersteller
GradiFrac FPLC-Einheit	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HisTrap Säule 5 mL	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Pumpe P50	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
UV Spektrometer LKB Uvicord SII, 280 nm	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Software	Hersteller
Labview 6.0	National Instruments, München

12.7 Analytische Verfahren

Tabelle 12.10: HPLC Geräte und benötigte Säulen

Geräte	Hersteller
HPLC Autosampler, Pumpe Typ Agilent 1100	Agilent Technologies, Waldbronn
Säulen Ofen Mistral	Sikarus Spark Holland
UV Detektor S3300	Sykam
IEX Säule HPX-87H	BioRad Laborstories GmbH. München
Phenomenex synergy RP C18 Säule	Phenomenex, USA
Trace GC Ultra	Thermo Scientific
Tri Plus Autosampler	Thermo Scientific
GC Säule Stablewax, 30 m	Restek GmbH
Software	Hersteller
Agilent	Agilent Technologies, Waldbronn
XCalibur	Thermo Scientific