

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Stereoselektive mehrstufige Reduktion von Dehydrocholsäure
mit Hydroxysteroiddehydrogenasen**

Boqiao Sun

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Harald Klein
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brück

Die Dissertation wurde am 30.04.2014 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am
17.06.2014 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz.

Während dieser Zeit haben viele Personen auf unterschiedlichen Weisen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, denen ich an dieser Stelle herzlichst danken möchte:

Ganz besonders möchte ich Herrn Professor Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die ausgezeichnete Betreuung und die Möglichkeit danken, dieses äußerst vielseitige und herausfordernde Thema bearbeiten und darüber promovieren zu dürfen. Seine unterstützenden und motivierenden Worte, die hilfreichen Diskussionen und das vertrauensvolle Einräumen von Freiheiten haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dem Korreferenten Herrn Professor Dr. rer. nat. Thomas Brück (Fachgebiet Industrielle Biokatalyse, Technische Universität München) und dem Prüfungsvorsitzenden Herrn Professor Dr.-Ing. Harald Klein (Lehrstuhl für Anlagen- und Prozesstechnik, Technische Universität München) möchte ich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe danken.

Frau Dr. Kathrin Castiglione, Gruppenleiterin Biokatalyse am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, möchte ich für ihre vielfältige Unterstützung und die kreativen Diskussionen danken.

Den Kooperationspartnern von der Firma PharmaZell GmbH, Raubling, Herrn Ralf Groß, Herrn André Steiner, Frau Aleksandra Mikolajka und Herrn Professor Dr. rer. nat. Rolf Schmid möchte ich stellvertretend für alle an diesem Kooperationsprojekt beteiligten Personen für die gute Zusammenarbeit danken.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Finanzierung des Projektes "Biokatalytische Stereoselektive Reduktion -BSR-".

Dr. Michael Braun für die hervorragende Einarbeitung in das Thema.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling und Herrn Dr. Alberto Marin Sanguino (beide Fachgebiet Systembiotechnologie, Technische Universität München) für die hilfreichen Vorschläge und Diskussionen zum Thema Modellierung.

All meinen Studenten: Sven Bresch, Christina Kantzow, Judith Schäfers, Alexandra Thomas, Michael Jochner, Jessica Guo, Tobias Treiber, Christina Pfaffinger, Jacqueline Fries, Alexandra Wollersheim, Florian Hartl, Ljubomir Grozdev, Johannes Cremer und Jakob Schmidt.

Dr. Kathrin Castiglione, Dr. Alberto Marin Sanguino, Georg Faust und Christina Kantzow für das gründliche Korrekturlesen der Dissertation.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik, des Fachgebiets Systembiotechnologie und des Fachgebiets Selektive Trenntechnik für die herausragende Arbeitsatmosphäre.

Schließlich möchte ich ganz besonders meinen Eltern danken, die mich immer unterstützt und mir Rückhalt gegeben haben, und mir dadurch diese Arbeit erst ermöglichten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	3
3	Theoretische Grundlagen	7
3.1	Biokatalytische Prozesse in der organischen Synthese	7
3.1.1	Enzymatische Prozesse in der Gegenwart	7
3.1.2	Vorteile enzymatischer Synthesen	8
3.1.3	Nachteile enzymatischer Synthesen	9
3.1.4	Dehydrogenasen/Reduktasen	11
3.1.5	Kofaktorregenerierung	15
3.1.6	Protein-Engineering	17
3.1.7	Isolierte Enzyme oder Ganzzellbiokatalysatoren	19
3.1.8	<i>Escherichia coli</i> als Ganzzellbiokatalysator	21
3.2	Enzymkinetik	22
3.2.1	Das Michaelis-Menten-Modell	22
3.2.2	Enzyminhibition	23
3.2.3	Substrat- und Produktinhibition	26
3.2.4	Mechanismen von Zwei-Substrat-Zwei-Produkt-Enzymreaktionen	27
3.2.5	King-Altman-Verfahren zur Herleitung komplexer Geschwindigkeitsgleichungen	28
3.2.6	Substratinhibition im ordered bi-bi-Enzymmechanismus	32
3.2.7	Enzymkinetische Modelle als Prozessmodelle	35
3.3	Synthese von Ursodesoxycholsäure (UDCA)	36
3.3.1	Struktur und Bedeutung von Gallensalzen	36
3.3.2	Ursodesoxycholsäure als Pharmazeutikum	38

3.3.3	Gewinnung und chemische Darstellung von Ursodesoxycholsäure	38
3.3.4	Mikrobielle Umwandlung von Gallensalzen	39
3.3.5	Mikrobielle Hydroxysteroiddehydrogenasen	40
3.3.6	Möglichkeiten der enzymatischen Synthese von Ursodesoxycholsäure	41
3.3.7	Zweistufige Reduktion von Dehydrocholsäure zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure	43
4	Material und Methoden	45
4.1	Allgemeines Material	45
4.2	Spezielles Material	45
4.2.1	Basisvektoren	45
4.2.2	Vektorkonstrukte	45
4.2.3	Bakterienstämme	47
4.3	Mikrobiologische Methoden	48
4.3.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> im Schüttelkolben	48
4.3.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> im 7,5 L Rührkesselreaktor	48
4.3.3	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> im 75 L Rührkesselreaktor	50
4.3.4	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> -Bibliotheken in <i>Deep Well</i> -Platten	52
4.3.5	Stammhaltung	52
4.3.6	Zellaufschluss von <i>Escherichia coli</i> in der Schwingmühle	53
4.3.7	Zellaufschluss von <i>Escherichia coli</i> im Hochdruckhomogenisator	53
4.3.8	Zellaufschluss von <i>Escherichia coli</i> mit Lysozym	54
4.4	Molekularbiologische Methoden	54
4.4.1	Isolation von Plasmid-DNA	54
4.4.2	Polymerasekettenreaktion	54
4.4.3	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese	54
4.4.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelextraktion	55
4.4.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels PCR Clean-Up Kit	55
4.4.6	Restriktion mit Endonukleasen	55
4.4.7	Ligation von DNA-Fragmenten	55
4.4.8	Positionsgerichtete Mutagenese	56

4.4.9	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen	56
4.4.10	Herstellung und Transformation elektrokompeter Zellen	57
4.4.11	Kolonie-Polymerasekettenreaktion	58
4.4.12	Spezifische Ausschaltung chromosomaler Gene	58
4.4.13	Sequenzierung von DNA	59
4.5	Proteinchemische Methoden	59
4.5.1	Aufreinigung von Proteinen im mL-Maßstab	59
4.5.2	Aufreinigung von Proteinen im L-Maßstab	60
4.5.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .	61
4.5.4	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)	61
4.5.5	Bestimmung von Enzymaktivitäten im Mikrotiterplattenphotometer . .	62
4.5.6	Bestimmung von Enzymkinetiken und Enzymmechanismen	62
4.5.7	Aufzeichnung von Verlaufskurven für die mechanistische Modellierung	64
4.6	Analytische Methoden	66
4.6.1	Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen	66
4.6.2	Bestimmung der Biotrockenmassenkonzentration von Bakteriensus- pensionen	66
4.6.3	Photometrische Bestimmung von Kofaktorkonzentrationen	66
4.6.4	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	67
4.6.5	Durchflusszytometrie (FACS)	67
4.7	Stereoselektive Reduktion von Dehydrocholsäure	68
4.7.1	Satz-Reduktion im 2 mL-Maßstab	68
4.7.2	Satz-Reduktion im 20 mL-Maßstab	68
4.7.3	Satz-Reduktion im 1 L-Maßstab	69
4.7.4	Präparative Darstellung von Monoketo- und Diketo-Gallensalzen . . .	70
4.7.5	Isolation von Gallensalzen durch Säurepräzipitation	71
4.8	Statistische und computerbasierte Methoden	71
4.8.1	Bioinformatische Methoden	71
4.8.2	Statistische Versuchsplanung	72
4.8.3	Parameteridentifikation von statistischen Polynommodellen	74

4.8.4	Herleitung mechanistischer Modelle	75
4.8.5	Parameteridentifikation von mechanistischen Modellen	75
4.8.6	Simulation und Konfidenzintervallbestimmung von mechanistischen Prozessmodellen	78
5	Änderung der Kofaktorspezifität der 7β-Hydroxysteroiddehydrogenase (7β- HSDH)	81
5.1	Erstellung einer NADH-abhängiger Mutante durch rationales Protein-Design . . .	81
5.1.1	Identifizierung der kofaktordeterminierenden Aminosäureposition . . .	81
5.1.2	Herstellung und Charakterisierung der NADH-abhängigen Einfachmu- tante	82
5.2	Gerichtete Evolution der NADH-abhängigen 7 β -Hydroxysteroiddehydrogen- ase (7 β -HSDH)	85
5.2.1	Herstellung des Wirtsstamms für die Mutantenbibliothek	85
5.2.2	Auswahl der zu mutierenden Positionen	85
5.2.3	Durchführung der gerichteten Evolution	86
5.2.4	Vergleichende Charakterisierung der NADH-abhängigen Mutanten . . .	86
5.3	Diskussion	89
6	Evaluation verschiedener Strategien zur Ganzzellbiokatalyse	93
6.1	Ein-Zell-System mit bispezifischer Formiatdehydrogenase (FDH)	93
6.1.1	Stammentwicklung	93
6.1.2	Vergleich der Ganzzellbiokatalysatoren in Schüttelkolbenexpression . . .	95
6.1.3	Optimierung der Rührkesselkultivierung	96
6.1.4	Optimierung der Biotransformation	97
6.1.5	Biotransformation im Litermaßstab	99
6.2	Ein-Zell-System mit monospezifischer Formiatdehydrogenase (FDH)	100
6.2.1	Stammentwicklung	100
6.2.2	Biotransformation im Litermaßstab	102
6.2.3	Diskussion	103
6.3	Zwei-Zell-System mit zwei verschiedenen Formiatdehydrogenasen (FDH) . . .	103
6.3.1	Stammentwicklung	104

6.3.2	Vergleich der Ganzzellbiokatalysatoren in Schüttelkolbenexpression . .	104
6.3.3	Optimierung der Biotransformation	105
6.3.4	Biotransformation im Litermaßstab	106
6.4	Ein-Zell-System mit Glucosedehydrogenase (GDH)	108
6.4.1	Stammentwicklung	108
6.4.2	Vergleich der Ganzzellbiokatalysatoren in Schüttelkolbenexpression . .	108
6.4.3	Biotransformation im Litermaßstab	109
6.5	Diskussion	110
7	Optimierung der Ganzzellbiokatalyse	115
7.1	Vergleich von Stämmen und Kultivierungsbedingungen	115
7.1.1	Klonierung	115
7.1.2	Vergleich unterschiedlicher Stämme	116
7.1.3	Vergleich von Kultivierungsbedingungen	118
7.2	Lagerung von Ganzzellbiokatalysatoren	120
7.2.1	Lagerstabilität	121
7.2.2	Einfluss der Lagerform	124
7.2.3	Frost-Tau-Stabilität	127
7.3	Charakterisierung der Ganzzellbiokatalyse	128
7.3.1	Einfluss der Kofaktorzugabe	128
7.3.2	Einfluss der Temperatur	130
7.3.3	Einfluss von Substratkonzentration, Zellkonzentration und Kofaktoren .	131
7.3.4	Skalierbarkeit der Biotransformation	133
7.3.5	Einfluss von Glycerin und Magnesiumchlorid	134
7.4	Empirische Modellierung der Biokatalyse	135
7.4.1	Modellerstellung und Parameterbestimmung	135
7.4.2	Modellvalidierung	139
7.4.3	Modellanalyse und Diskussion	141
7.5	Diskussion	143
8	Mechanistische Modellierung der multienzymatischen Biotransformation	149
8.1	Bestimmung von Enzymmechanismen	149

8.1.1	Enzymmechanismus der 7β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7β -HSDH)	150
8.1.2	Enzymmechanismus der 3α -Hydroxysteroiddehydrogenase (3α -HSDH)	151
8.2	Herleitung mechanistischer Einzelenzymmodelle	153
8.2.1	Ordered bi-bi-Mechanismus unter Vernachlässigung des zuerst dissoziierenden Produkts (P)	153
8.2.2	Ordered bi-bi-Mechanismus mit EBQ-Substratinhibition	154
8.3	Abschätzung kinetischer Parameter der Einzelenzyme	157
8.3.1	Parameterschätzung für die Glucosedehydrogenase (GDH)	157
8.3.2	Parameterschätzung für die 7β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7β -HSDH)	158
8.3.3	Parameterschätzung für die 3α -Hydroxysteroiddehydrogenase (3α -HSDH)	160
8.3.4	Diskussion	163
8.4	Herleitung des mechanistischen Prozessmodells	164
8.4.1	Mechanismus der Glucosedehydrogenase (GDH) mit konkurrierenden Kofaktoren	164
8.4.2	Mechanismus der Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDH) mit konkurrierenden Gallensalzen	167
8.4.3	Mechanistische Prozessmodelle für die Reduktion von Dehydrocholsäure	171
8.5	Validierung des Prozessmodells zur zweistufigen Reduktion von Dehydrocholsäure	173
8.5.1	Experimentelle Validierung	173
8.5.2	Diskussion	175
8.6	Analyse des Prozessmodells zur zweistufigen Reduktion von Dehydrocholsäure	176
8.7	Diskussion	180
9	Zusammenfassung und Ausblick	183
	Literaturverzeichnis	191
	Abkürzungsverzeichnis	211
A	Allgemeines Material	A.1

A.1	Geräte	A.1
A.2	Chemikalien	A.3
A.3	Enzyme	A.5
A.4	Sonstige Verbrauchsmaterialien	A.5
A.5	Standards und Kits	A.6
A.6	Oligonukleotide	A.6
A.7	Medien und Puffer	A.8
B	Herleitungen von Geschwindigkeitsreaktionen	B.1
B.1	Ordered bi-bi-Mechanismus mit EBQ-Substratinhibition	B.1
B.2	Mechanismus der HSDH mit konkurrierenden Gallensalzen	B.4
B.3	Mechanismus der GDH mit konkurrierenden Kofaktoren	B.10
C	Verlaufskurven für Parameterschätzung	C.1
C.1	Verlaufskurven der Glucosedehydrogenase (GDH) mit NAD	C.1
C.2	Verlaufskurven der Glucosedehydrogenase (GDH) mit NADP	C.4
C.3	Verlaufskurven der 7 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7 β -HSDH)	C.7
C.4	Verlaufskurven der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 α -HSDH)	C.10
D	Sonstiges	D.1
D.1	IUPAC-Nomenklatur für Nukleinsäuren	D.1
D.2	IUPAC-Nomenklatur für Aminosäuren	D.1

1 Einleitung

Schätzungsweise 10 – 15 % der erwachsenen Bevölkerung in westlichen Industrienationen sind Träger von Gallensteinen. Während die meisten Träger ein Leben lang ohne Symptome bleiben, führen Gallensteine in 20 – 40 % der Fälle zu einer Gallenkolik, womit Gallensteinerkrankungen den Hauptanteil der stationären Krankenhauseinweisungen infolge gastrointestinaler Beschwerden stellen und allein in den USA jährliche Kosten von 6,5 Mrd. Dollar verursachen. Die Therapie der Wahl ist in den meisten Fällen die operative Entfernung der Gallenblase (Shaffer, 2006; Lee & Kim, 2009).

Aus der traditionellen Chinesischen Medizin ist ein Arzneimittel bekannt, das eine nicht-invasive Behandlung von Gallensteinen ermöglicht. Schon in der Tang-Dynastie fand Bären-galle als Therapeutikum für Gelbsucht im *Xinxiu Bencao* (657 n.Chr.) Erwähnung, dem ersten behördlich erstellten Arzneibuch der Welt. Weitere Arzneibücher aus der Song-, und Ming-Dynastie (10. – 13. und 14. – 17. Jahrhundert) empfehlen die Einnahme von Bären-galle bei Gelbsucht, abdominaler Distension und Oberbauchbeschwerden – alles Beschwerden, die durch Erkrankungen der Leber und des Gallentrakts hervorgerufen werden können, einschließlich durch Gallensteine (Lindley & Carey, 1987; Li *et al.*, 1995).

Die hohe Nachfrage nach Bären-galle führte dazu, dass Bären als Folge ihrer Bejagung zu einer bedrohten Spezies wurden. Auch die Züchtung von Bären in Bärenfarmen, um ihre Galle über einen Katheter direkt aus der Gallenblase zu gewinnen, kann deren Bedarf nicht decken, so dass es seit Beginn des 20. Jahrhunderts Bestrebungen gibt, einen Ersatz für diesen Naturstoff zu finden. Analysen über die Zusammensetzung der Galle bei Vertebraten ergeben, dass Gallensalze eines ihrer Hauptbestandteile darstellen. Bei den meisten Spezies dominieren die beiden Gallensalze Cholsäure und Chenodesoxycholsäure, jedoch findet sich speziell bei Bären im großen Umfang ein Epimer der Chenodesoxycholsäure, welches die Bezeichnung Ursodes-

oxycholsäure trägt. Diese Bezeichnung leitet sich von dem Wort „*ursus*“ ab, dem lateinischen Begriff für „Bär“ (Ekdahl & Sjövall, 1958; Hagey *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 2009).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Ursodesoxycholsäure (UDCA) ist ein Wirkstoff, der breite Anwendung bei einer Vielzahl von Indikationen findet. Der weltweite jährliche Bedarf betrug 2009 schätzungsweise 200 Tonnen (Feng *et al.*, 2009). Erstmals 1955 wurde UDCA durch japanische Forscher synthetisiert. Ihre industrielle Herstellung erfolgt seitdem auf chemischen Weg, in einem siebenstufigen Prozess, der in den vergangenen Jahrzehnten zunehmend rationalisiert und optimiert wurde. Aufgrund der komplexen Stereochemie dieses Stoffes wurden seit den 1980er Jahren enzymatische Schritte bei dessen Herstellung vorgeschlagen und erforscht (Sutherland *et al.*, 1982b; Carrea *et al.*, 1992). Kommerzielle Anwendung finden diese Schritte bislang jedoch nicht.

Die vorgeschlagenen Synthesewege lassen sich in zwei Hauptwege einteilen. Ihre Gemeinsamkeit haben sie in ihrer Ausgangssubstanz Cholsäure (CA), die sich aus Schlachtabfällen gewinnen lässt, und in ihrem Endprodukt der enzymatischen Schritte, der 12-Keto-Ursodesoxycholsäure (12-Keto-UDCA), die sich anschließend in einem chemischen Schritt zu UDCA umwandeln lässt.

Die Forschungsarbeiten beschränkten sich bis auf wenige Ausnahmen bislang auf den einen, rein enzymatischen Syntheseweg von CA zu 12-Keto-UDCA (Medici *et al.*, 2002; Fossati *et al.*, 2006; Monti *et al.*, 2009). Monti *et al.* (2009) gelang es hierbei, in einem Verfahren mit fünf beteiligten Enzymen, 12,5 mM CA in einem Prozessschritt vollständig zu 12-Keto-UDCA umzusetzen. Jedoch wurden sämtliche dieser Arbeiten zumindest teilweise mit Enzymen durchgeführt, die aus Wildtyp-Organismen isoliert wurden, darunter schwer zu kultivierende, obligat anaerobe Organismen wie etwa Clostridien. Braun (2011) setzte am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der TU München als erstes ausschließlich in *Escherichia coli* (*E. coli*) rekombinant exprimierte Enzyme ein. Ihm gelang mit Hilfe eines rekombinanten Ganzzellbiokatalysators die Umsetzung von über 100 mM CA zum Intermediat 12-Keto-Chenodesoxycholsäure (12-Keto-CDCA).

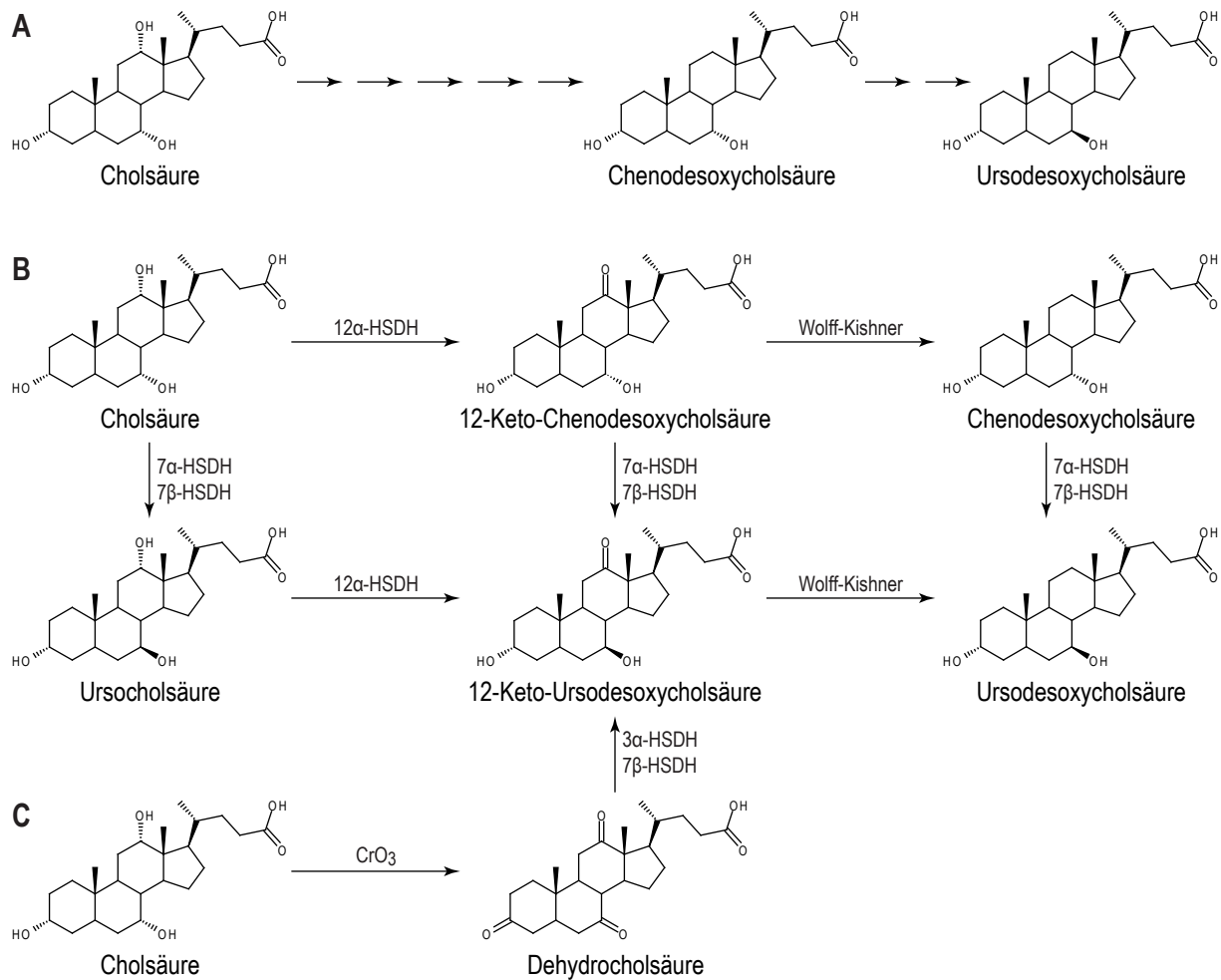


Abbildung 2.1: Synthesewege für Ursodesoxycholsäure (UDCA). **A:** Chemischer Syntheseweg für UDCA, **B:** chemo-enzymatische Synthesewege nach Sutherland & Macdonald (1982a), **C:** chemo-enzymatischer Syntheseweg nach Carrea *et al.* (1992).

Das Interesse dieser Arbeit lag auf dem zweiten, chemo-enzymatischen Syntheseweg von CA zu 12-Keto-UDCA. Bei diesem wird CA zunächst chemisch zu Dehydrocholsäure (DHCA) oxidiert und anschließend mit Hilfe zweier enzymatischer Schritte, katalysiert durch eine 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 α -HSDH) und eine 7 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7 β -HSDH), zu 12-Keto-UDCA reduziert. Dieser Weg wurde als erstes von Carrea *et al.* (1992) vorgeschlagen, dem die vollständige Umsetzung von 12,5 mM DHCA zu 12-Keto-UDCA gelang, jedoch kamen wiederum aus Wildtyp-Organismen isolierte Enzyme zum Einsatz. Die Synthesewege für UDCA sind in Abbildung 2.1 zusammengefasst.

Am Institut für Technische Biologie (ITB) der Universität Stuttgart gelang erstmals die Isolation und rekombinante Expression einer 7 β -HSDH (Liu *et al.*, 2010). Zusammen mit einer seit kurz vor der Jahrtausendwende rekombinant vorliegenden 3 α -HSDH (Möbus & Maser,

1998) sind damit die Voraussetzungen gegeben, einen auf rekombinant exprimierten Enzymen basierten Herstellungsprozess von 12-Keto-UDCA aus DHCA zu entwickeln.

Erste Arbeiten von Braun *et al.* (2012) zeigten, dass eine vollständige einstufige Umsetzung von 70 mM DHCA zum Intermediat 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure (3,12-Diketo-UDCA) unter Verwendung eines rekombinanten *E. coli*-Ganzzellbiokatalysators möglich ist. Allerdings konnten bei der zweistufigen Umsetzung von 50 mM DHCA zu 12-Keto-UDCA kein vollständiger Umsatz erzielt werden, obwohl $18,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ des Ganzzellbiokatalysators eingesetzt wurden. Dennoch wurde gezeigt, dass eine Umsetzung von DHCA zu 12-Keto-UDCA innerhalb eines Prozessschritts mit einem rekombinanten Ganzzellbiokatalysator prinzipiell zu erreichen ist.

Das Ziel dieser Forschungsarbeit ist nun, auf Basis dieser Vorarbeiten, einen möglichst effizienten, auf Industriemaßstäbe skalierbaren und wettbewerbsfähigen Satzprozess zur Herstellung von 12-Keto-UDCA aus DHCA auf Grundlage rekombinanter *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren zu entwickeln. Ein Satzprozess verfügt durch die einfache Prozessführung über den Vorteil der einfachen Übertragbarkeit und Skalierbarkeit. *E. coli* wurde als Wirtsorganismus gewählt, da dieser über passive und aktive Transportmechanismen für Gallensalze verfügt und denen gegenüber hohe Toleranzen aufweist (Thanassi *et al.*, 1997). Zudem sind vielfältige Techniken zur genetischen Manipulation von *E. coli* bekannt (Sambrook & Russell, 2001). Für die Prozessentwicklung spielt nicht nur die Raum-Zeit-Ausbeute eine Rolle, sondern auch das für einen wirtschaftlichen Prozess wichtige Verhältnis zwischen Produkt- und Biokatalysatormenge (Pollard & Woodley, 2007). Hierbei sollen auf Enzym-, Stamm-, Kultivierungs- und Prozessebene Fortschritte erzielt werden.

Auf der Enzymebene stehen bislang nur NADPH-abhängige Varianten der 7β -HSDH zur Verfügung, während die zur Verfügung stehende 3α -HSDH NADH-abhängig ist (Braun *et al.*, 2012). Hier sollen mittels Protein-Engineering NADH-abhängige 7β -HSDH-Mutanten erzeugt werden, wodurch auf den Kofaktor NADP(H) verzichtet werden kann, was zu einer einfacheren Kofaktorregenerierung führen kann.

Weiterhin sollen verschiedene Strategien zur Ganzzellbiokatalyse mit rekombinanten *E. coli* untersucht werden, bei denen Enzyme mit unterschiedlichen Kofaktorspezifitäten, verschiedene Kofaktorregenerierungsenzyme und die Verwendung eines oder zweier Ganzzellbiokatalysato-

ren betrachtet werden. Hierbei muss für jeden Fall zunächst eine Stammentwicklung erfolgen und alle Ganzzellbiokatalysestrategien mit optimierten Stämmen vergleichend evaluiert werden. Am Ende erfolgt die Auswahl der besten Ganzzellbiokatalysestrategie.

Die ausgewählte Ganzzellbiokatalysestrategie soll anschließend einer Optimierung unterzogen werden. Hierbei sollen Biokatalysatorherstellung (Fermentation), Lagerung und die Durchführung der Biokatalysereaktion durchleuchtet werden. Ziel ist es, einen schnellen, effizienten, robusten und skalierbaren Prozess bei minimalem Biokatalysatoreinsatz zu finden.

Um das Reaktionssystem besser zu verstehen, soll zudem ein mechanistisches kinetisches Modell der multienzymatischen Reaktion erstellt werden. Hierzu müssen enzymkinetische Parameter bestimmt und das Gesamtmodell validiert werden. Die Analyse des Modells soll das Wissen über den Reaktionsprozess erweitern und Aufschlüsse über weitere Optimierungsmöglichkeiten geben.

Anhand dieser definierten Ziele wird folgender Arbeitsplan aufgestellt:

- Protein-Engineering der 7β -HSDH
 - Herstellung einer NADH-abhängigen 7β -HSDH-Mutante mittels rationalem Protein-Design
 - Gerichtete Evolution der 7β -HSDH zur Generierung besserer NADH-abhängiger Mutanten
- Evaluationen verschiedener Ganzzellbiokatalysestrategien mit rekombinanten *E. coli*
 - Ausarbeitung verschiedener Systeme
 - Stammentwicklung und erste Optimierung
 - Vergleichende Evaluation der Systeme
- Untersuchung und Optimierung der Ganzzellbiokatalyse hinsichtlich
 - Kultivierung
 - Lagerung
 - Biokatalyseprozess
- Mechanistische Modellierung der multienzymatischen Reaktion
 - Erstellung einer geeigneten Modellarchitektur
 - Bestimmung von Modellparametern
 - Validierung des Prozessmodells
 - Analyse des Prozessmodells

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Biokatalytische Prozesse in der organischen Synthese

Biotechnologische Prozesse werden bereits seit dem Altertum für die Herstellung von Lebensmitteln angewandt. Mit der Entwicklung der modernen Naturwissenschaft im 18. und 19. Jahrhundert wurden biotechnologische Prozesse auch Gegenstand einer wissenschaftlichen Wahrnehmung (Buchholz *et al.*, 2012). Die erste biokatalytische asymmetrische Reaktion wurde 1858 von Louis Pasteur beschrieben, dem eine kinetische Racematspaltung von DL-Diammoniumtartrat mit *Penicillium glaucum* gelang (Pasteur, 1858). Im Jahre 1898 erkannte Emil Fischer die besondere Chemo-, Regio- und Stereoselektivität von Enzymen (Fischer, 1898), und im selben Jahr gelang Arthur Croft-Hill die erste enzymatische Synthese, bei der er Hefeextrakt zu einer Glucoselösung gab und im Anschluss Isomaltose erhielt (Sumner & Somers, 1953). In den 1930er Jahren wurden bereits Enzyme in der industriellen Produktion eingesetzt (Wenda *et al.*, 2011). Mit der Identifikation immer weiterer Biokatalysatoren und den Fortschritten auf dem Gebiet der rekombinanten DNA-Technologie und des Protein-Engineerings erfuhr die industrielle Biokatalyse einen weiteren Aufschwung in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts und der überwiegende Großteil kommerziell verfügbarer Enzyme ist mittlerweile rekombinanten Ursprungs (Liese *et al.*, 2006; Aehle, 2007; Buchholz *et al.*, 2012).

3.1.1 Enzymatische Prozesse in der Gegenwart

In der heutigen Zeit wird die Biokatalyse sowohl in der Akademie als auch in der Industrie als ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung nachhaltiger Verfahren für die chemische Industrie gesehen (Fahrenkamp-Uppenbrink, 2002). Bereits 2003 wurden 22 von 38 asymmetrischen Synthesen im Großmaßstab mit Biokatalysatoren durchgeführt (Blaser & Schmidt, 2004), während bereits über 500 kommerziell erhältliche Produkte durch enzymatische Verfah-

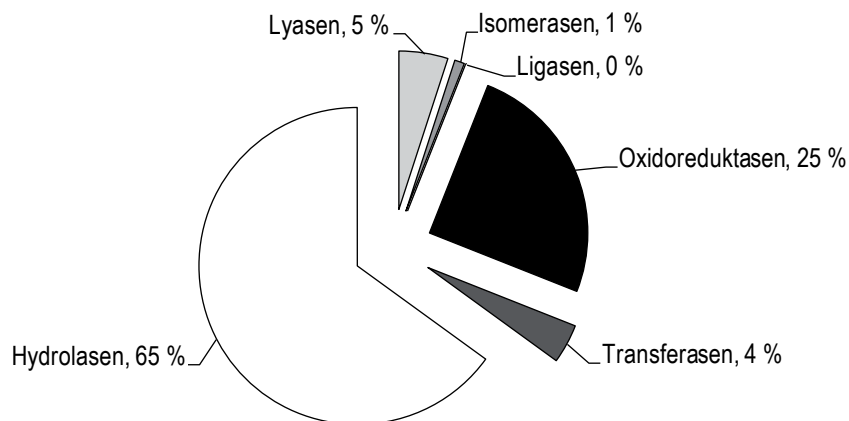


Abbildung 3.1: Einsatz verschiedener Enzymklassen in der organischen Synthese nach Jeromin & Bertau (2005).

ren hergestellt wurden (Johannes & Zhao, 2006). Entsprechend der Bedeutung enzymatischer Verfahren für die chemische Industrie entwickelte sich auch das Marktvolumen für industrielle Enzyme von 1,6 Mrd. USD in 1998 auf 5,1 Mrd. USD in 2009 mit weiterhin steigender Tendenz (Sanchez & Demain, 2011).

Enzyme werden gemäß der International Union of Biochemistry (IUB) in sechs Klassen unterteilt: Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen (Webb, 1992). Im industriellen Einsatz sind hierbei Hydrolasen am stärksten vertreten, während Oxidoreduktasen mit 25 % an zweiter Stelle folgen (vgl. Abbildung 3.1).

3.1.2 Vorteile enzymatischer Synthesen

Ein wichtiger Grund für den Einsatz von Enzymen ist die hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität der von ihnen katalysierten Reaktionen. Dadurch können unerwünschte Nebenprodukte weitgehend vermieden werden, so dass diese nicht aufwändig abgetrennt werden müssen und insgesamt höhere Ausbeuten zu erzielen sind (Schulze & Wubbolts, 1999; Rozzell, 1999; Schmid *et al.*, 2001). Durch ihre hohe Selektivität kann zudem auf das bei der chemischen Synthese häufig durchgeführte Einfügen und Entfernen von Schutzgruppen verzichtet werden, was die Anzahl benötigter Prozessschritte verringert und dadurch mit einer Effizienzsteigerung des gesamten Syntheseprozesses einhergeht (Schmid *et al.*, 2001; Ishige *et al.*, 2005). Trotz ihrer Selektivität sind Enzyme nicht auf ein bestimmtes Substrat beschränkt, sondern verfügen über eine natürliche Promiskuität wodurch sie bereits in ihrer natürlichen Umgebung mehrere Substrate umsetzen können. Allerdings können Enzyme auch nicht-natürliche Substrate akzeptie-

ren oder sogar nicht-natürliche Reaktionen katalysieren (Schoemaker *et al.*, 2003; Purkardhofer *et al.*, 2006; Khersonsky & Tawfik, 2010). Enzyme können auch Reaktionen an nicht-aktivierten Positionen katalysieren, die für eine chemische Umsetzung nicht oder nur sehr schwer zu erzielen sind (Rozzell, 1999; Schoemaker *et al.*, 2003).

Enzyme sind darüber hinaus äußerst effiziente Katalysatoren, die die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber der nicht-katalysierten Reaktion typischerweise um Faktor $10^8 - 10^{10}$ beschleunigen und somit chemische Katalysatoren deutlich übertreffen. Somit kann eine enzymkatalysierte Reaktion mit deutlich geringerem Katalysatoranteil durchgeführt werden. Während chemische Katalysatoren in der Regel mit einem molaren Anteil von 0,1 – 1 % eingesetzt werden, liegt dieser Wert bei enzymkatalysierten Reaktionen im Bereich von $10^{-3} - 10^{-4}$ % (Wolfenden & Snider, 2001; Faber, 2011).

Anders als chemische Reaktionen werden enzymatische Umsetzungen in der Regel bei milden Bedingungen, moderaten Temperaturen (20 – 40 °C), neutralem pH (pH 5 – 8), wässriger Lösung und Atmosphärendruck durchgeführt. Dies verringert zum einen den Energieeinsatz im Prozess, zum anderen minimiert es das Risiko unerwünschter Nebenreaktionen, was besonders bei labilen Produkten von Bedeutung ist (Panke *et al.*, 2004; Ishige *et al.*, 2005; Illanes *et al.*, 2012). Häufig ist durch den Verzicht auf gefährliche Reaktanden auch die Sicherheit bei enzymatischen Prozessen erhöht (Nakamura *et al.*, 2003). Ein weiterer Aspekt ist, dass Enzyme biologisch abbaubar sind und umweltfreundlich entsorgt werden können, im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren, die häufig Schwermetalle enthalten (Rozzell, 1999).

Ein weiterer Vorteil ist, dass Enzyme unter ähnlichen Reaktionsbedingungen aktiv sind, wodurch diese miteinander kompatibel sind. Somit können auch mehrstufige Reaktionskaskaden in einem einzigen Prozessschritt durchgeführt werden, indem mehrere Enzyme miteinander kombiniert werden, was die Effizienz des Syntheseprozesses weiter steigert (Faber, 2011).

3.1.3 Nachteile enzymatischer Synthesen

Trotz der vielen Vorteile, die Enzyme gegenüber chemischen Katalysatoren aufweisen, werden ihnen auch Nachteile entgegengehalten. Ein Aspekt ist die limitierte Verfügbarkeit von Enzymen, so dass nicht für jede gewünschte Reaktion ein geeigneter Biokatalysator zur Verfügung

steht (Faber, 2011). In diesem Zusammenhang ist es wichtig, dass das Arsenal an bekannten Biokatalysatoren beständig erweitert wird, zum Beispiel durch Durchmusterung von Stammsammlungen, Metagenom- und Datenbankanalysen oder durch Protein-Engineering (Fessner *et al.*, 1999; Ferrer *et al.*, 2010; Behrens *et al.*, 2011; Eriksen *et al.*, 2014). Ein weiterer Aspekt ist, dass es keine Enzympaare gibt, die wie Bild und Spiegelbild zueinander passen. Da die intrinsische Chiralität der Enzyme nicht umkehrbar ist, kann die stereochemische Selektivität einer enzymkatalysierten Reaktion nicht einfach durch den Einsatz des anderen Enantiomers umgekehrt werden, wie es etwa bei chemischen Katalysatoren möglich ist (Wyatt & Warren, 2007; Faber, 2011). Jedoch existieren auch Ausnahmen wie katalytisch aktive RNA-Moleküle, sogenannte Ribozyme (Lorsch & Szostak, 1994). Trotzdem bleibt dem Anwender oft nichts anderes übrig, als neue Enzyme zu identifizieren oder die Stereoselektivität des Enzyms durch Protein-Engineering umzukehren (May *et al.*, 2000; Faber, 2011).

Weiterhin wird oft bemängelt, dass Enzyme nur unter milden Bedingungen stabil sind, und empfindlich auf hohe Temperaturen, Salzgehalte oder extremen pH reagieren und durch diese inaktiviert werden (Faber, 2011). Hierbei können gezielte Durchmusterungen von Extremophilen helfen, deren Enzyme durch die Umwelt dieser Organismen entsprechend angepasste Toleranzen aufweisen. So sind sowohl Enzyme bekannt, die ihre Funktion auch bei über 100 °C beibehalten, als auch welche, die selbst im gefrorenen Zustand aktiv sind (Schuster *et al.*, 1990; Adams, 1993; Phillips, 1996). Auch mit Methoden des *Protein-Engineerings* können Prozessstabilitäten erhöht und Temperatur- und pH-Optima von Enzymen verändert werden (Schoemaker *et al.*, 2003).

Eine weitere Limitation ist, dass Enzyme in der Regel ihre maximale Aktivität in wässrigen Lösungen entfalten, während organische Lösungsmittel denaturierend wirken können (Laane *et al.*, 1987; Schmid *et al.*, 2001). Dies ist vor allem dann ein Nachteil, wenn das umzusetzende Substrat nur eine geringe Löslichkeit in Wasser aufweist (León *et al.*, 1998; Wenda *et al.*, 2011). Allerdings sind auch Enzyme bekannt, die in nicht-wässrigen Lösungsmitteln oder Lösungen mit hohem Anteil an organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden können. Hier könnten Durchmusterungen von Organismen mit hoher Toleranz für organische Lösungsmittel oder wiederum Protein-Engineering helfen (Gupta & Khare, 2009; Wenda *et al.*, 2011). Der Wechsel des Lösungsmittels kann zudem auch als Chance begriffen werden, da manche En-

zyme dadurch veränderte Chemo-, Regio- und Stereoselektivitäten erhalten können (Klibanov, 2001).

Häufig ist bei Enzymen zudem eine Substrat- oder Produktinhibition zu beobachten. Während sich eine Substratinhibition leicht über ein Substratzudosierungsverfahren umgehen lässt, ist die Überwindung der Produktinhibition eine größere Herausforderung (Faber, 2011). Hier könnte der Einsatz von Zwei-Phasen-Systemen hilfreich sein, wobei die zweite Phase sowohl als Substratreservoir als auch als *in situ* Extraktionsmittel für das Produkt dienen kann (Dennewald *et al.*, 2011).

Viele Enzymreaktionen sind zudem auf Kofaktoren angewiesen, die bei der Umsetzung stöchiometrisch verbraucht werden. Diese sind oft chemisch instabil und zudem sehr teuer, so dass diese regeneriert werden müssen. Auf diesem Feld gab es in den vergangenen Jahrzehnten beträchtliche Fortschritte, so dass diese Herausforderung für einige Kofaktoren bereits als bewältigt angesehen werden kann (Bommarius & Riebel-Bommarius, 2004; van der Donk & Zhao, 2003). Trotzdem wird noch der Großteil industrieller Enzymreaktionen mit Hydrolasen durchgeführt, die keine Kofaktoren benötigen (vgl. Abbildung 3.1).

3.1.4 Dehydrogenasen/Reduktasen

Dehydrogenasen/Reduktasen bilden eine Untergruppe der Oxidoreduktasen, welche die Übertragung von Reduktionsäquivalenten zwischen zwei Redoxsystemen katalysieren. Die von der IUB unter EC 1.1.1.x klassifizierten Dehydrogenasen/Reduktasen katalysieren die Oxidation von Alkoholen zu Ketonen bzw. Aldehyden und die jeweilige Rückreaktion unter Transfer eines Hydridions. Dabei benötigen sie den Kofaktor Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (NAD(P) bzw. NAD(P)H) (Webb, 1992; Nakamura *et al.*, 2003). Die Reaktionen sind in der Regel chemo-, regio- und enantioselektiv, wodurch mit ihnen racemische Gemische sekundärer Alkohole aufgetrennt werden können, indem ein Enantiomer schneller umgesetzt wird als das andere (vgl. Abbildung 3.2).

Unterteilt werden Dehydrogenasen/Reduktasen basierend auf der Länge ihrer monomeren Aminosäuresequenz. Langkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (*long chain dehydrogenase/reductase*, LDR) besitzen eine Sequenzlänge von mehr als 350 Aminosäuren

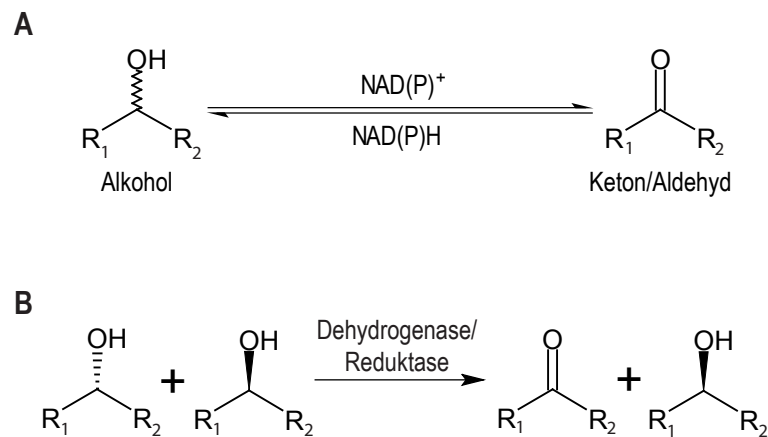


Abbildung 3.2: **A** zeigt schematisch die durch Dehydrogenasen/Reduktasen katalysierten Reaktionen. **B** zeigt das Prinzip der Racematspaltung mittels Dehydrogenasen/Reduktasen.

und sind von Metallionen abhängig (v.a. Eisen und Zink). Mittelkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (*medium chain dehydrogenase/reductase*, MDR) besitzen eine ungefähre Länge von 350 Aminosäuren und sind zinkabhängig. Zu ihnen gehören unter anderem die Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase der Klasse I (Persson *et al.*, 2008). Kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (*short chain dehydrogenase/reductase*, SDR) besitzen hingegen eine Sequenzlänge von 250–350 Aminosäuren und verfügen nicht über ein Metallion (Oppermann *et al.*, 2003).

SDR besitzen trotz der im paarweisen Vergleich typischerweise geringen Sequenzidentitäten von 20–30 % ein gemeinsames α/β -Faltungsmuster, das eine Rossmann-Faltung beinhaltet. Diese besteht aus drei oder mehr parallelen β -Strängen, die mit α -Helices verbunden sind und besitzt die Fähigkeit, Nukleotide zu binden (Rao & Rossmann, 1973; Rossmann *et al.*, 1975; Oppermann *et al.*, 2003; Kallberg *et al.*, 2010). Funktional verfügen SDR über eine große Diversität und setzen Substrate wie Alkohole, Ketone, Zucker, Steroide und aromatische Verbindungen um. Darüber hinaus existieren Vertreter, die der Gruppe der Isomerasen oder Lyasen zugeordnet werden, oder solche, die keine bekannte enzymatische Aktivität aufweisen (Persson, 2003; Persson *et al.*, 2008).

Die SDR-Superfamilie lässt sich nochmals in verschiedene Unterfamilien einteilen, wobei „Klassisch“ und „Erweitert“ die größten Unterfamilien bilden und sich im Wesentlichen in ihrer Länge (250 bzw. 350 Aminosäuren) und ihrer Kofaktorbindetasche unterscheiden (Jörnvall

Tabelle 3.1: Konservierte Sequenzmotive bei klassischen SDR nach Kallberg *et al.* (2002) und Persson (2003). Aminosäuren sind als Einbuchstabencode angegeben, Kleinbuchstaben stehen für aromatisch (a), geladen (g), hydrophob (h), polar (p) und beliebig (x). Alternative Aminosäuren an einer Position sind in eckigen Klammern gestellt, die Aminosäuren der katalytischen Tetrade sind fett markiert.

Sekundärstrukturelement	Sequenzmotiv	Postulierte Funktion
$\beta_1 + \alpha_1$	TGxxxGhG	Strukturgebend für Kofaktorbindung
$\beta_3 + \alpha_3$	Dhx[gp]	Bindung des Adeninrings des Kofaktors
β_4	GxDhDhNNAGh	Stabilisierung des zentralen β -Faltblatts
α_4	hNhxG	Teil des aktiven Zentrums
β_5	GxhhxhSSh	Teil des aktiven Zentrums
α_5	Yx[AS][ST]K	Teil des aktiven Zentrums
β_6	h[KR]h[NS]xhxPGxxxT	Strukturgebend

et al., 1995). Die klassischen SDR weisen konservierte Sequenzmotive auf (vgl. Tabelle 3.1), von denen das Nukleotidbindungsmotiv TGxxxGhG im N-terminalen Bereich hervorzuheben ist, welches eine wichtige strukturgebende Funktion bei der Kofaktorbindung ausübt (Jörnvall *et al.*, 1981; Oppermann *et al.*, 1997; Jörnvall *et al.*, 1999; Filling *et al.*, 2002). Weitere Unterfamilien der SDR sind „*Intermediate*“, „*Divergent*“, „*Complex*“ und „*Atypical*“

Das aktive Zentrum der klassischen SDR wird durch eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Serin, Tyrosin und Lysin im Bereich des β_5 -Strangs und der α_5 -Helix bestimmt (Ghosh *et al.*, 1994a; Oppermann *et al.*, 1997), die bei den meisten Vertretern noch um ein konserviertes Aspartat an der α_4 -Helix erweitert wird, weshalb auch oft von einer katalytischen Tetrade gesprochen wird (Filling *et al.*, 2002; Oppermann *et al.*, 2003). Der Katalysemechanismus ist exemplarisch an der 7α -HSDH aus *E. coli* in Abbildung 3.3 dargestellt (Tanaka *et al.*, 1996b).

Weiterhin unterscheiden sich klassische SDR im Bereich der Kofaktorbindetasche, die die Kofaktorspezifität des Enzyms determiniert. Bei NADH-akzeptierenden Enzymen befindet sich am C-terminalen Ende des β_2 -Strangs meist eine saure Aminosäure Aspartat oder Glutamat, während bei NADPH-bindenden SDR an dieser Position oft eine kleine aliphatische Aminosäure lokalisiert ist, gefolgt von einer basischen Aminosäure Arginin oder Lysin. Weiterhin verfügen NADPH-abhängige Enzyme oft über eine weitere basische Aminosäure innerhalb des TGxxxGhG-Motivs (Ghosh *et al.*, 1994b; Persson, 2003).

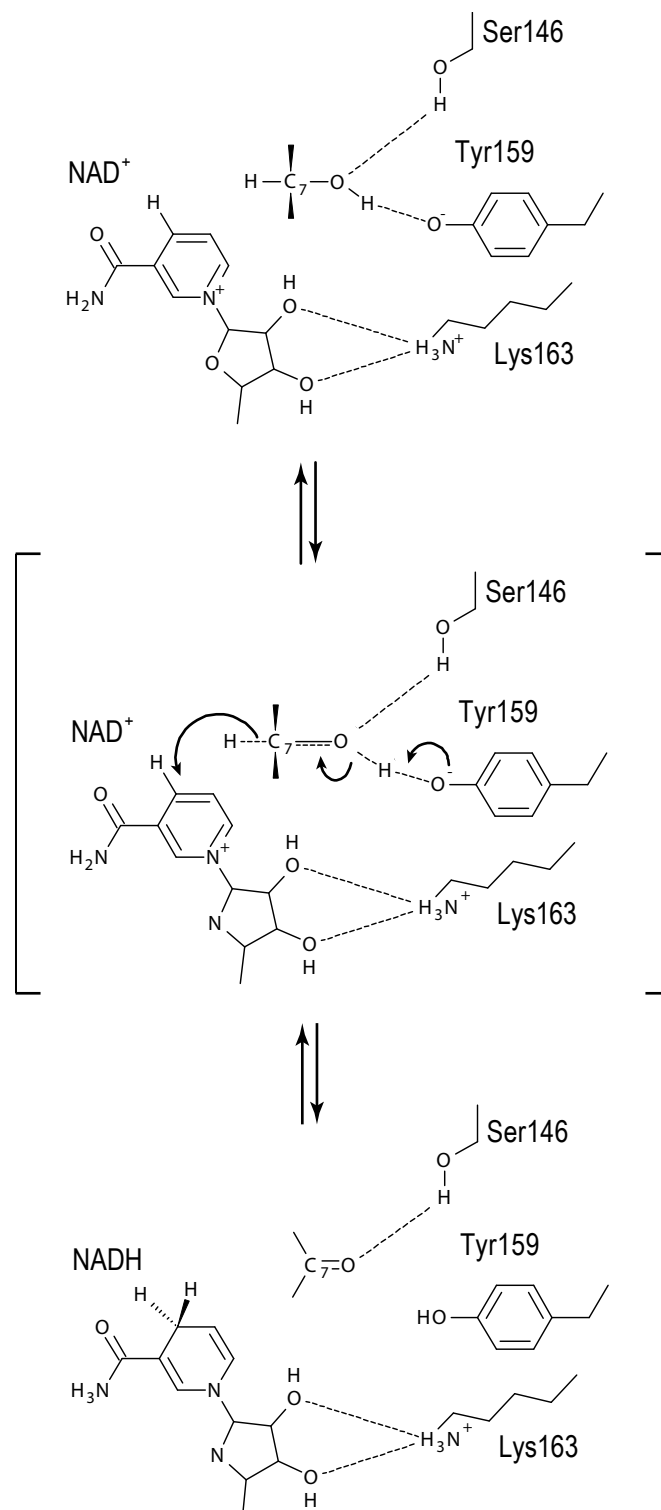


Abbildung 3.3: Katalytischer Mechanismus der 7 α -HSDH nach Tanaka *et al.* (1996b).

3.1.5 Kofaktorregenerierung

Bei der enzymatischen Umsetzung mit NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktasen erfolgt die Übertragung eines Hydridions vom Nicotinamid-Kofaktor auf das Substrat bzw. in umgekehrter Richtung. Dabei wird der benötigte Kofaktor in stöchiometrischer Weise verbraucht. Aufgrund der hohen Kosten für Nicotinamid-Kofaktoren wäre ein industrieller Prozess bei stöchiometrischer Zugabe unwirtschaftlich, weshalb diverse Methoden zur *in situ*-Regeneration von Kofaktoren entwickelt wurden (van der Donk & Zhao, 2003; Wichmann & Vasic-Racki, 2005).

Ausschlaggebend für den Regenerierungsprozess ist die Anzahl der Regenerationszyklen, die ein Kofaktor bis zu seiner Inaktivierung durchlaufen kann, welche als *total turnover number* (TTN) angegeben wird (Chenault & Whitesides, 1987). Um einen ökonomischen Prozess zu erhalten sollte die TTN mindestens $10^3 - 10^5 \text{ mol mol}^{-1}$ betragen (van der Donk & Zhao, 2003).

Mögliche Regenerierungsstrategien sind eine chemische (Jones *et al.*, 1972; Bhaduri *et al.*, 1998; Wagenknecht *et al.*, 2003), elektrochemische (Domínguez *et al.*, 1993; De Lacey *et al.*, 2000) oder photochemische (Julliard & Le Petit, 1982; Nakamura & Yamanaka, 2002) Reduktion der Kofaktoren, deren Nachteile jedoch ihre geringe Selektivität, geringe TTN ($\leq 10^3 \text{ mol mol}^{-1}$) und ihre limitierte Kompatibilität zu biologischen Systemen darstellen (Wichmann & Vasic-Racki, 2005). Alternativen dazu wären der Einsatz von metabolisch aktiven Ganzzellbiokatalysatoren, bei denen der Zellmetabolismus zur Kofaktorregeneration genutzt werden kann (Duetz *et al.*, 2001; Julsing *et al.*, 2012), oder enzymatische Regenerierungsmethoden, bei denen man zwischen substrat- und enzymgekoppelten Ansätzen unterscheidet, die in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt sind.

Bei dem substratgekoppelten Ansatz erfolgt die Kofaktorregenerierung durch dasselbe Enzym, welches die gewünschte Redoxreaktion katalysiert. Mittels Zugabe eines günstigen Kosubstrats wird die Reduktion bzw. Oxidation des Substrats mit der Oxidation bzw. Reduktion des Kosubstrats gekoppelt (Kroutil *et al.*, 2004). Dieser Ansatz wird beispielsweise mit Alkoholdehydrogenasen durchgeführt (Schubert *et al.*, 2002), jedoch hat dieser Ansatz den intrinsischen Nachteil, dass das Reaktionsgleichgewicht in der Regel auf der Seite der Reduktionsreaktion liegt (Faber, 2011). Bei dem enzymgekoppelten Ansatz hingegen werden die Reduktion bzw. Oxidation des Substrats und die Regeneration des Kofaktors durch zwei verschiedene En-

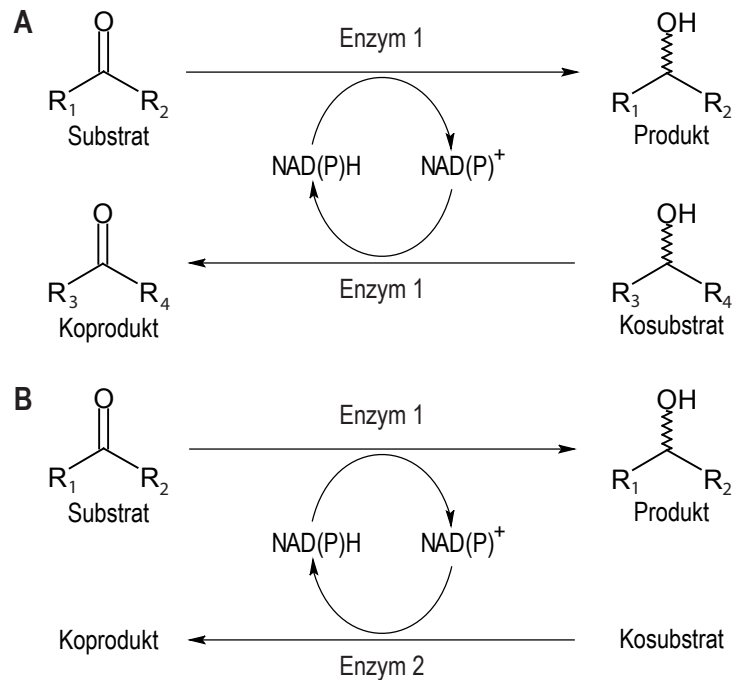


Abbildung 3.4: Enzymatische Kofaktorregenerierungsstrategien. **A** zeigt den substratgekoppelten Ansatz. **B** zeigt den enzymgekoppelten Ansatz.

zyme katalysiert (van der Donk & Zhao, 2003). Einige häufig verwendete Enzyme sollen im Folgenden diskutiert werden:

Formiatdehydrogenasen (FDH)

Als Goldstandard der enzymgekoppelten Regenerierung von NADH gilt die Verwendung der FDH (EC 1.2.1.2), welche die Oxidation von Formiat zu CO_2 katalysiert (van der Donk & Zhao, 2003; Weckbecker *et al.*, 2010). Ihr Vorteil besteht sowohl in der Verwendung des kostengünstigen Kosubstrats Formiat, als auch in dem gebildetem Nebenprodukt CO_2 , welches als Gas aus dem Reaktionsansatz entweicht und somit zu einer praktisch irreversiblen Umsetzung des Formiats führt. Dadurch verschiebt sich das thermodynamische Gleichgewicht in Richtung des reduzierten Produktes (Shaked & Whitesides, 1980; van der Donk & Zhao, 2003). Nachteile von FDH bestehen in ihrer geringen spezifischen Enzymaktivität ($6 - 10 \text{ U mg}^{-1}$) und ihrer strikten Spezifität für NAD als Kofaktor (Kato *et al.*, 1979; Slusarczyk *et al.*, 2000; van der Donk & Zhao, 2003). Diese Nachteile wurden versucht, durch Protein-Engineering zu umgehen (Tishkov *et al.*, 1999; Tishkov & Popov, 2006; Hölsch & Weuster-Botz, 2010). Prominente

Vertreter sind FDH aus *Candida boidinii* (Schütte *et al.*, 1976) und *Mycobacterium vaccae* (Karzanov *et al.*, 1991).

Glucosedehydrogenasen (GDH)

GDH (EC 1.1.1.47) katalysieren die Oxidation von β -D-Glucose zu D-Glucono-1,5-Lacton, welches anschließend spontan und quasi irreversibel zu Gluconsäure hydrolysiert, wodurch das thermodynamische Gleichgewicht ebenfalls in Richtung des reduzierten Produktes verschoben wird (Weckbecker *et al.*, 2010). Der Vorteil der GDH besteht in ihrer Akzeptanz sowohl von NAD als auch von NADP sowie in ihrer hohen spezifischen Enzymaktivität von 375 – 550 U mg⁻¹ (Mitamura *et al.*, 1989, 1990; Hilt *et al.*, 1991; Nagao *et al.*, 1992). Eine Limitation für die Verwendung von GDH in Ganzzellbiokatalysatoren ist, dass Glucose bei der Aufnahme durch *E. coli* über das Phosphotransferasesystem zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert wird, weswegen zum Teil versucht wird, den Glucose-Transport über die Zellmembran durch die Koexpression eines Glucose-Facilitators oder eine Perforation der Zellen zu verbessern (Schewe *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2010). Häufig verwendet werden GDH aus *Bacillus subtilis* (Ramaley & Vasantha, 1983) und *Bacillus megaterium* (Mitamura *et al.*, 1989).

Weitere Kofaktorregenerierungsenzyme

Abgesehen von den beiden genannten Enzymen gibt es noch einige weitere Kofaktorregenerierungssysteme. Einsatz finden unter anderem noch Alkoholdehydrogenasen (ADH, EC 1.1.1.1 und 1.1.1.2), Glucose-6-Phosphatdehydrogenasen (G6PDH, EC 1.1.1.49), Phosphitdehydrogenasen (PTDH, EC 1.20.1.1) und Hydrogenasen (EC 1.12.7.2) (Wong *et al.*, 1981; Keinan *et al.*, 1986; Drewke & Ciriacy, 1988; Bryant & Adams, 1989; Vrtis *et al.*, 2001).

3.1.6 Protein-Engineering

Viele Enzyme zeigen im industriellen Einsatz gewisse Limitationen auf, weshalb es Bestrebungen gibt, durch Veränderung ihrer Aminosäuresequenz, bestimmte Eigenschaften zu verbessern. Mit diesem als Protein-Engineering bezeichneten Ansatz lassen sich Enzyme in ihrer Aktivität, Stabilität und Enantioselektivität verbessern oder letztes auch umkehren, Regioselektivitäten

verändern, Inhibitionen verringern, Substratspektren erweitern oder auch gänzlich neue Enzymreaktionen kreieren (Reetz & Jaeger, 1999; Böttcher & Bornscheuer, 2010; Bornscheuer *et al.*, 2012). Die Vorgehensweise erfolgt hierbei in 3 Schritten: 1. Festlegen auf eine Engineering-Strategie, 2. Veränderung des Enzyms gemäß der Strategie, 3. Evaluation und Auswahl der Mutanten (Kazlauskas & Bornscheuer, 2009). Die unterschiedlichen Strategien sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Rationales Protein-Design

Das rationale Protein-Design stellt einen wissensbasierten Ansatz dar, mit dem Proteineigenschaften mit einigen wenigen, gezielten Änderungen in der Aminosäuresequenz verändert werden. Hierbei wird das Verhalten von Enzymen modellbasiert zunächst auf molekularer Ebene beschrieben, um in einen zweiten Schritt Veränderungen vorzuschlagen, die zu den gewünschten, verbesserten Eigenschaften führen sollen (Kazlauskas, 2000). Grundlage hierfür ist die Kenntnis über die Struktur und den Mechanismus des entsprechenden Enzyms. Experimentell aufgeklärte Proteinstrukturen können aus Datenbanken wie der Protein Data Bank bezogen werden (Berman, 2000), in der im März 2014 bereits über 98500 Strukturen gelistet sind. Auch wenn keine experimentell aufgeklärte Struktur vom Enzym vorhanden ist, existieren bioinformatische Methoden wie die Homologie-Modellierung (Blundell *et al.*, 1987; Sali & Blundell, 1993) oder die *de novo* Vorhersage (Simons *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2003; Bradley *et al.*, 2005), um an eine Enzymstruktur zu gelangen. Mittlerweile existieren zudem voll automatisierte Server wie ROBETTA oder I-TASSER, die sich einer Kombination der beiden Methoden bedienen und nach Eingabe einer gesuchten Aminosäuresequenz ein fertig berechnetes Strukturmodell ausgeben (Raman *et al.*, 2009; Zhang, 2009).

Zufallsmutagenese und gerichtete Evolution

Ein anderer, nicht wissensbasierter Ansatz, ist die gerichtete Evolution, bei der zunächst eine Bibliothek zufällig veränderter Enzyme generiert wird, um anschließend verbesserte Mutanten mit einem Durchmusterungsverfahren zu identifizieren und selektieren (Bornscheuer & Pohl, 2001; Kaur & Sharma, 2006). Die Zufallsmutagenesen können hierbei unter anderem über fehlerbehaftete PCR, *DNA shuffling* oder *in situ* durch Verwendung von Mutator-Stämmen durchgeführt

werden (Leung *et al.*, 1989; Cadwell & Joyce, 1992; Stemmer, 1994; Camps *et al.*, 2003). Die Selektion erfolgt anschließend nach bestimmten, vorher definierten Kriterien. Durch mehrmaliges Durchlaufen dieses Prozesses können immer wieder verbesserte Enzymvarianten gefunden werden (Carballeira *et al.*, 2009). Voraussetzung für ein solches Verfahren ist jedoch ein effizientes Hochdurchsatzverfahren, mit dem große Bibliotheken durchmustert werden können. So existieren bei zwei Zufallsmutationen in einem Protein mit einer Länge von 200 Aminosäuren bereits $7,2 \cdot 10^6$ mögliche Kombinationen (Bornscheuer *et al.*, 2012).

Kombinierte Methoden

Während beim rationalen Protein-Design die benötigten Informationen oft nicht zur Verfügung stehen und die Modellierung sehr rechenintensiv sein kann, hängt die Durchführung einer gerichteten Evolution von der Verfügbarkeit geeigneter Hochdurchsatz-Durchmusterungsverfahren ab (Behrens *et al.*, 2011). Kombinierte Methoden können hierbei durch Verwendung wissens- und zufallsbasierter Ansätze die Einschränkungen beider Ansätze mildern. Eine Möglichkeit wäre, die Zufallsmutagenese auf wenige oder eine Position zu beschränken, so kann eine Zufallsmutation positionsspezifisch durch Sättigungsmutagenese eingefügt werden (Kirsch & Joly, 1998; Zheng *et al.*, 2004). Um Bibliotheksgrößen klein zu halten, können bei einer iterativen Sättigungsmutagenese (ISM) zunächst einige wenige Positionen für eine Mutagenese definiert werden. Anschließend wird zunächst eine einzelne Position mutiert, die Bibliothek durchmustert, die beste Mutante selektiert und danach diese Prozedur iterativ für die weiteren Positionen durchlaufen (Reetz *et al.*, 2009).

3.1.7 Isolierte Enzyme oder Ganzzellbiokatalysatoren

Biokatalyseprozesse lassen sich grundsätzlich mit isolierten Enzymen in verschiedenen Aufreinigungsgraden oder Ganzzellbiokatalysatoren in Form von Wildtyp- oder rekombinanten Organismen (sogenannte „*Designer Cells*“) durchführen, wobei beide Ansätze jeweils Vor- und Nachteile haben (Hollmann *et al.*, 2011). In einer Analyse von 134 industriellen Prozessen aus dem Jahr 2002 wurden in rund 60 % der angegebenen Fälle ganze Zellen verwendet, während die übrigen Prozesse mit isolierten Enzymen durchgeführt wurden (Straathof *et al.*, 2002).

Vorteil von isolierten Enzymen ist ihre hohe Produktivität, einfache Produktaufarbeitung und hohe Selektivität, da keine störenden Nebenaktivitäten durch andere Zellenzyme vermittelt werden, sofern die Enzyme in aufgereinigter Form eingesetzt werden (Faber, 2011). Allerdings ist die Herstellung isolierter Enzyme kostenintensiv. So sind Enzyme bereits als Rohextrakt doppelt so teuer wie ganze Zellen, während sich bei einer kompletten Aufreinigung die Kosten mehr als verzehnfachen (Tufvesson *et al.*, 2011). Wesentlich einfacher und kostengünstiger lassen sich ganze Zellen herstellen, allerdings können diese durch zelleigene Enzyme Nebenreaktionen katalysieren oder das Substrat sogar metabolisieren. Dieses Problem lässt sich verringern, indem das gewünschte Enzym rekombinant überexprimiert wird und somit die Nebenreaktionen überdecken kann. Trotzdem müssen im ungünstigsten Fall die verantwortlichen Gene identifiziert und ausgeschaltet werden. Aufgrund des höheren Risikos der Nebenproduktbildung kann die Produktaufarbeitung bei ganzen Zellen demnach komplizierter sein (Woodley, 2006; Hollmann *et al.*, 2011).

Wird für den Prozess eine Kofaktorregenerierung benötigt, müssen bei Einsatz isolierter Enzyme zusätzliche Kofaktorregenerierungsmethoden angewandt werden. Aus diesem Grund werden in einem solchen Fall generell Ganzzellbiokatalysatoren bevorzugt, da hierbei von der zellinternen Kofaktorregenerierung profitiert wird, die zusätzlich noch durch rekombinant eingebrachte Enzyme verstärkt werden kann (Buckland *et al.*, 2000; Bertau, 2002; Gröger *et al.*, 2006). Auch bieten ganze Zellen bei multienzymatischen Synthesen den Vorteil, dass alle Enzyme gleichzeitig in einer Zelle vorhanden sind und somit nur ein Kultivierungsprozess notwendig ist, wohingegen bei isolierten Enzymen jedes Enzym einzeln hergestellt werden muss (Carballeira *et al.*, 2009).

Eine Limitation bei ganzen Zellen kann jedoch der Stofftransport über die Zellmembran sein. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn nicht-natürliche Substrate eingesetzt werden und keine Transportmechanismen vorliegen. Mögliche Strategien sind hierbei die Perforation der Membran, die Koexpression von Facilitatoren oder auch die Verankerung des gewünschten Enzyms an der Außenmembran, z.B. durch Autodisplay (Schewe *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2010; Jose *et al.*, 2012).

Ein weiterer Faktor ist die Entwicklungsdauer, die beide Prozesse erfordern. Während Prozesse mit kommerziell erhältlichen Enzymen und Wildtyp-Organismen schnell zu implementieren

Tabelle 3.2: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile von isolierten Enzymen und Ganzzellbiokatalysatoren.

Kriterium	Isolierte Enzyme	Ganzzellbiokatalysator
Preis	mittel – hoch	niedrig
Nebenreaktionen	keine	möglich, ggf. genetische Modifikationen notwendig
Stofftransport	keine Limitation	möglich, ggf. Perforation, Koexpression von Facilitator, Expression an Außenmembran
Kofaktorregenerierung	zusätzlich erforderlich	zellintern, ggf. Unterstützung durch zusätzliche Enzyme
Multienzymprozesse	gesonderte Expression und Aufreinigung jedes einzelnen Enzyms	Koexpression sämtlicher Enzyme in einer Zelle
Produktaufarbeitung	einfach	möglicherweise aufwändig
Entwicklungsdauer	kurz – mittel	mittel – lang

tieren sind, benötigen rekombinante *Designer Cells* einen längeren Entwicklungszeitraum. Aus dem Grund werden Herstellungsprozesse in ihrer Frühphase oft mit isolierten Enzymen durchgeführt, während der kostenbedingte Umstieg auf rekombinante Zellen in einer späteren Phase erfolgt. Allerdings ist dabei zu erwägen, inwiefern der Produktaufarbeitungsprozess durch diese Umstellung beeinträchtigt wird (Pollard & Woodley, 2007). Die jeweiligen Vor- und Nachteile sind noch einmal in Tabelle 3.2 gegenübergestellt.

3.1.8 *Escherichia coli* als Ganzzellbiokatalysator

Eine Suche im *Web of Knowledge* (<http://wokinfo.com>) nach Fachartikeln mit „*whole cell biocatalyst*“ bzw. „*whole cell biocatalysis*“ im Titel ergab insgesamt 99 Treffer für den Zeitraum Januar 2010 – März 2014. In 70 % der Fälle kamen rekombinante Biokatalysatoren zum Einsatz, häufigstgenannter Organismus war mit 40 Nennungen *Escherichia coli*, deutlich vor dem mit acht Nennungen an zweiter Stelle liegenden *Pichia pastoris*. Sämtliche *E. coli* waren dabei rekombinant.

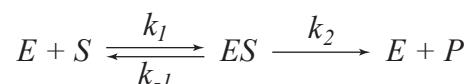
E. coli ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes Bakterium, welches 1885 von Theodor Escherich entdeckt wurde (Lederberg & Bloom, 2000). Als Modellorganismus ist er in Labo-

ratorien bekannt und etabliert und er besitzt die Fähigkeit, schnell auf günstigen Substraten zu wachsen und dabei hohe Zelldichten zu erreichen (Terpe, 2006). So lässt sich *E. coli* auf Minimalmedien zu Zelldichten von über $100 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ kultivieren (Jung *et al.*, 1988; Riesenberg *et al.*, 1991). Außerdem ist *E. coli* als Modellorganismus sehr gut charakterisiert. Für die heterologe Expression existieren eine Vielzahl etablierter Expressionssysteme, die beispielsweise auf dem Lactose-Promotor (*lac/tac*), dem T7-Promotor, dem Arabinose-Promotor (*araBAD*) oder dem Rhamnose-Promotor (*rhaP_{BAD}*) basieren (Polisky *et al.*, 1976; Studier & Moffatt, 1986; Egan & Schleif, 1993; Guzman *et al.*, 1995), sowie für Proteinexpression optimierte Stämme (Sørensen & Mortensen, 2005). Zudem wurde sein Genom bereits 1997 entschlüsselt (Blattner, 1997), so dass sich in Kombination mit etablierten Werkzeugen der Genommodifikation einzelne Gene gezielt und einfach ausschalten lassen (Hamilton *et al.*, 1989; Datsenko & Wanner, 2000; Zhong *et al.*, 2003). Dies alles macht *E. coli* zu einer populären Plattform für *Designer Cells*.

3.2 Enzymkinetik

3.2.1 Das Michaelis-Menten-Modell

Die einfachste enzymkatalysierte Reaktion ist die, bei der ein Substrat zu einem Produkt umgesetzt wird (uni-uni). Nachfolgend gezeigt ist ein einfaches Modell zur Beschreibung einer solchen Reaktion, bei dem die Annahme getroffen wird, dass Substrat (S) und Enzym (E) zunächst zu einem Enzym-Substrat-Komplex (ES) assoziieren und anschließend dieser Komplex entweder wieder zu Enzym und Substrat dissoziieren kann, oder aber das Substrat umgesetzt wird, und der Komplex zu Enzym und Produkt (P) dissoziiert. Eine zweite Annahme ist, dass die Reaktion irreversibel ist, und keine Rückreaktion erfolgt.



Ausgehend davon lässt sich die Michaelis-Menten-Gleichung herleiten:

$$v = v_{\text{max}} \cdot \frac{S}{K_m + S} \quad (3.1)$$

Dabei ist v die Reaktionsgeschwindigkeit in mol s^{-1} , v_{max} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit in mol s^{-1} , S die Substratkonzentration in mol L^{-1} und K_m die Michaelis-Konstante in mol L^{-1} , die sich wie folgt aus den Geschwindigkeitskonstanten der Teilreaktionen berechnen lässt:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (3.2)$$

Die Michaelis-Konstante wird auch als Halbsättigungskonstante bezeichnet, da bei dieser Substratkonzentration die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird (Michaelis & Menten, 1913; Briggs & Haldane, 1925; Segel, 1993).

3.2.2 Enzyminhibition

Während die Enzymaktivität durch Faktoren wie Ionenstärke, Temperatur, pH und andere vermindert werden kann, gibt es auch die Möglichkeit einer reversiblen oder irreversiblen, negativen Beeinflussung der Enzymaktivität durch spezifische Interaktionen bestimmter Liganden (Inhibitoren) mit definierten Zentren des Enzyms, was als Enzyminhibition bezeichnet wird (Bisswanger, 2008). Im Falle einer reversiblen Inhibition können grundsätzlich drei Arten unterschieden werden: kompetitiv, nicht-kompetitiv und unkompetitiv.

Bei der kompetitiven Enzyminhibition interagiert der Ligand mit der Substratbindestelle und verhindert damit das Andocken eines Substratmoleküls und somit die Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes. Bei einer klassischen nicht-kompetitiven Enzyminhibition binden Substrat und Inhibitor an unterschiedlichen Zentren und beeinflussen dabei weder die Bindung noch die Dissoziation des jeweils anderen Liganden, jedoch ist der ternäre Komplex aus Substrat, Enzym und Inhibitor inaktiv, so dass keine Reaktion katalysiert wird. Bei einer klassischen unkompetitiven Enzyminhibition bindet der Inhibitor reversibel an den binären Enzym-Substrat-Komplex und bildet mit diesem einen inaktiven ternären *Dead-End*-Komplex, der erst durch Dissoziation des Inhibitors wieder aktiv wird. Dabei bindet der Inhibitor ausschließlich an den Enzym-Substrat-Komplex, nicht jedoch an das freie Enzym (Segel, 1993). Die Schemata sind in Abbildung 3.5 gezeigt.

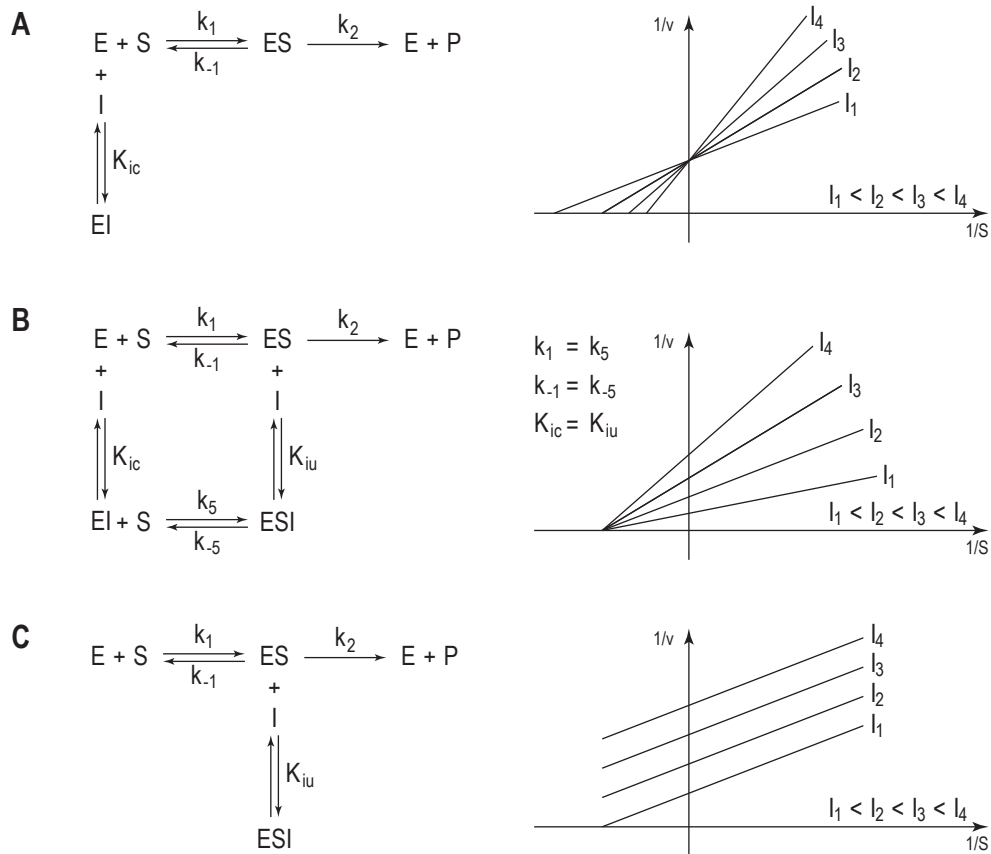


Abbildung 3.5: Schemata und doppelt reziproke Auftragung der Sättigungskinetiken verschiedener Inhibitionstypen. **A:** Kompetitive Inhibition, **B:** Nicht-kompetitive Inhibition, **C:** Unkompetitive Inhibition.

Die Geschwindigkeitsgleichungen der Enzymreaktionen werden in einem solchen Fall um einen Inhibitionsterm erweitert. Für die kompetitive Inhibition ergibt sich folgende Gleichung:

$$v = v_{max} \cdot \frac{S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_{ic}}\right) + S} \quad (3.3)$$

für die nicht-kompetitive Inhibition:

$$v = v_{max} \cdot \frac{S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_{ic}}\right) + S \left(1 + \frac{I}{K_{iu}}\right)} \quad (3.4)$$

und für die unkompetitive Inhibition:

$$v = v_{max} \cdot \frac{S}{K_m + S \left(1 + \frac{I}{K_{iu}}\right)} \quad (3.5)$$

Hierbei steht I für die Konzentration des Inhibitors, K_{ic} für die Inhibitionskonstante der kompetitiven Inhibition und K_{iu} für die Inhibitionskonstante der unkompetitiven Inhibition. Die Inhibitionskonstanten entsprechen dabei gleichzeitig der Dissoziationskonstanten des Inhibitors.

Bei der nicht-kompetitiven Inhibition existiert der ideale Fall, bei dem sich die Bindungen des Inhibitors und des Substrats nicht gegenseitig beeinflussen und somit folgendes gilt:

$$k_1 = k_5 \quad (3.6)$$

$$k_{-1} = k_{-5} \quad (3.7)$$

$$K_{ic} = K_{iu} \quad (3.8)$$

Dieser Sonderfall wird oft als eigentliche nicht-kompetitive Inhibition bezeichnet, wo hingegen die übrigen Fälle zur Abgrenzung oft als gemischte Inhibition bezeichnet werden (Bisswanger, 2008).

In Abbildung 3.5 sind die Auswirkungen einer zunehmenden Inhibitorkonzentration auf die linearisierte, doppelt reziproke Darstellung der jeweiligen Kinetiken nach Lineweaver & Burk (1934) zu sehen. Bei einer kompetitiven Inhibition erhöht sich die Steigung der Geraden, wobei der Schnittpunkt zur Ordinate erhalten bleibt, bei einer idealen nicht-kompetitiven Inhibition nimmt die Steigung ebenfalls zu, während der Schnittpunkt zur Abszisse konstant bleibt, bei einer unkompetitiven Inhibition bleibt hingegen die Steigung der Geraden konstant, jedoch verschieben sich diese parallel in y-Richtung. Durch die Anwesenheit von Inhibitoren, können sich bei der Kinetikmessung die kinetischen Konstanten scheinbar verändern. Die Zusammenhänge zwischen Inhibitorkonzentration und den scheinbaren Halbsättigungskonstanten ($K_{m,app}$) und

Tabelle 3.3: Einfluss des Inhibitors auf scheinbare Halbsättigungskonstanten ($K_{m,app}$) und maximale Reaktionsgeschwindigkeiten ($v_{max,app}$).

Inhibitionsmechanismus	$K_{m,app}$	$v_{max,app}$
kompetitiv	$K_m \left(1 + \frac{I}{K_{ic}}\right)$	v_{max}
nicht-kompetitiv, ideal	K_m	$v_{max} / \left(1 + \frac{I}{K_{iu}}\right)$
nicht-kompetitiv, allgemein	$K_m \frac{1+I/K_{ic}}{1+I/K_{iu}}$	$v_{max} / \left(1 + \frac{I}{K_{iu}}\right)$
unkompetitiv	$K_m / \left(1 + \frac{I}{K_{iu}}\right)$	$v_{max} / \left(1 + \frac{I}{K_{iu}}\right)$

maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten ($v_{max,app}$) sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst (Segel, 1993; Cornish-Bowden, 2012).

3.2.3 Substrat- und Produktinhibition

Enzyme können nicht nur durch spezielle Inhibitoren gehemmt werden, sondern auch durch ihre natürlichen Substrate oder Produkte. Schätzungsweise 20 % der Enzyme werden durch einen Überschuss ihres natürlichen Substrats inhibiert, was eine regulatorische Funktion im Organismus einnimmt (Reed *et al.*, 2010). Im Fall einer uni-uni-Reaktion bindet hierbei ein zusätzliches Substratmolekül an den Enzym-Substrat-Komplex und bildet hierdurch einen inaktiven ternären Komplex aus. Bei einer Produktinhibition hingegen wirkt das natürliche Produkt hemmend auf die Reaktion. Selbst wenn eine irreversible Reaktion angenommen wird, kann trotzdem ein Produktmolekül an das freie Enzym binden und somit das Anlagern eines Substratmoleküls verhindern (Bisswanger, 2008). Beide Schemata sind in Abbildung 3.6 gezeigt.

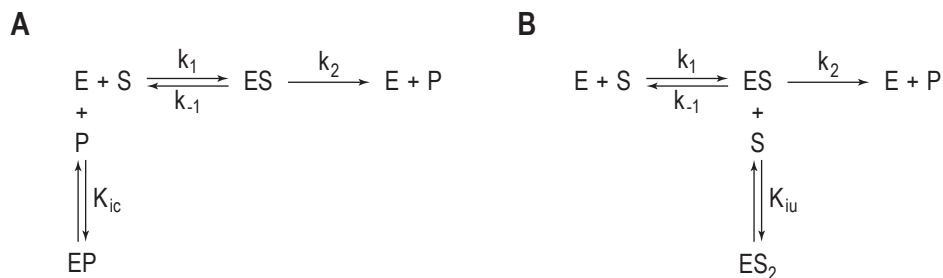


Abbildung 3.6: Schemata von Produktinhibition (A) und Substratinhibition (B).

Wie sich gut aus den Schemata erkennen lässt, handelt es sich bei einer Substratinhibition um eine unkompetitive Inhibition, während die Produktinhibition eine kompetitive ist. Die Geschwindigkeitsgleichungen sind für eine Produktinhibition:

$$v = v_{max} \cdot \frac{S}{K_m \left(1 + \frac{P}{K_{ic}}\right) + S} \quad (3.9)$$

und für eine Substratinhibition:

$$v = v_{max} \cdot \frac{S}{K_m + S \left(1 + \frac{S}{K_{iu}}\right)} \quad (3.10)$$

Dabei entsprechen diese den Gleichungen 3.3 bzw. 3.5. Eine Besonderheit bei der Substratinhibition ist, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Substratkonzentration aufgrund der Inhibition nicht gegen v_{\max} konvergiert, sondern nach einem zwischenzeitlichen Maximum (v_{opt}) wieder abnimmt. Dieses zwischenzeitliche Maximum wird bei einer optimalen Substratkonzentration (S_{opt}) erreicht, die sich wie folgt berechnen lässt:

$$S_{\text{opt}} = \sqrt{K_m \cdot K_{iu}} \quad (3.11)$$

3.2.4 Mechanismen von Zwei-Substrat-Zwei-Produkt-Enzymreaktionen

Bisher wurden Enzymmechanismen betrachtet, bei denen ein Substrat zu einem Produkt umgesetzt wird, und die als irreversibel angenommen werden. Tatsächlich sind enzymkatalysierte Reaktionen grundsätzlich reversibel und oft werden mehrere Substrate zu mehreren Produkten umgesetzt. Im Folgenden sollen Enzymreaktionen von zwei Substraten zu zwei Produkten, sogenannte bi-bi-Reaktionen genauer betrachtet werden.

Für solche Reaktionen existieren einige verschiedene mögliche Mechanismen. Einer davon ist der random bi-bi-Mechanismus, bei dem die Substrate in zufälliger Reihenfolge an das Enzym binden können. Nach der Umsetzung dissoziieren die Produkte ebenfalls in zufälliger Reihenfolge vom ternären Zentralkomplex. Ein solcher Mechanismus tritt unter anderem häufig bei Kinasen auf. Bei Dehydrogenasen lässt sich hingegen häufig ein ordered bi-bi-Mechanismus beobachten, bei dem die beiden Substrate in einer fest definierten Reihenfolge an das Enzym binden. Nach der Umsetzung wird das Molekül, das als zweites gebunden hat, zuerst vom ternären Zentralkomplex freigesetzt, während das zuerst gebundene Molekül als letztes vom Enzym dissoziiert. Ein Spezialfall des ordered bi-bi-Mechanismus ist der Theorell-Chance-Mechanismus, bei dem der ternäre Zentralkomplex derart schnell zerfällt, dass dieser quasi nicht vorhanden ist und somit für die Geschwindigkeitsgleichung vernachlässigt werden kann. Dieser Fall findet sich oft bei Alkoholdehydrogenasen. Ein weiterer Mechanismus, bei dem kein ternärer Zentralkomplex gebildet wird, ist der ping-pong bi-bi-Mechanismus, bei dem es zu einer alternierenden Bindung der Substrate und Freisetzung der Produkte kommt. Dabei nimmt das Enzym eine reaktive Gruppe vom ersten Substrat auf, nach Ablösen des ersten Produkts kann das zweite Substrat an das aktivierte Enzym binden und wiederum die reaktive Gruppe

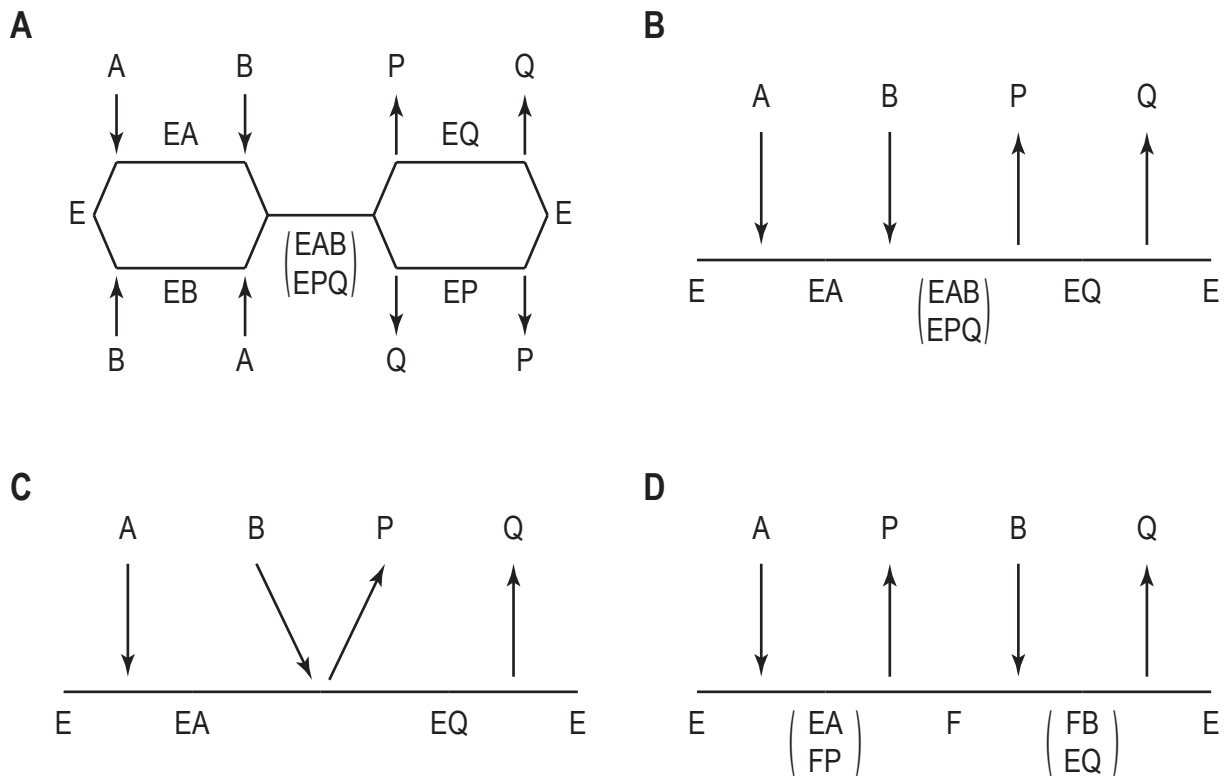


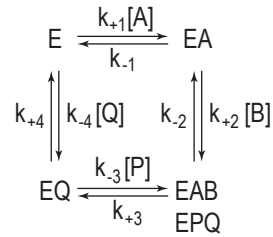
Abbildung 3.7: Schemata verschiedener Enzymmechanismen bei der Zwei-Substrat-Zwei-Produkt-Reaktion. **A:** random bi-bi-Mechanismus, **B:** ordered bi-bi-Mechanismus, **C:** Theorell-Chance-Mechanismus, **D:** ping-pong bi-bi-Mechanismus.

aufnehmen. Ein solcher Mechanismus tritt beispielsweise bei Aminotransferasen auf (Theorell & Chance, 1951; Cleland, 1963a,b,c; Bisswanger, 2008). Die Schemata dieser Mechanismen sind in Abbildung 3.7 gezeigt.

3.2.5 King-Altman-Verfahren zur Herleitung komplexer Geschwindigkeitsgleichungen

Bei Reaktionen mit mehreren Substraten und Produkten kann die Herleitung einer Geschwindigkeitsgleichung über Differenzialgleichungen ein schwer zu lösendes Unterfangen werden. King & Altman (1956) stellten eine einfache Methode vor, die am Beispiel eines ordered bi-bi-Mechanismus erläutert werden soll, welches aus Bisswanger (2008) entnommen wurde.

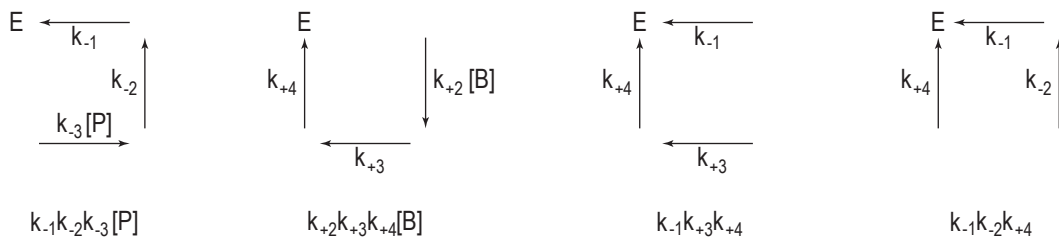
Als erstes wird ein Polygon mit Doppelpfeilen als Kanten gezeichnet, dessen Ecken jeweils einer Enzymform entsprechen. Die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten werden dabei zu den Pfeilen hinzugefügt und gegebenenfalls mit eintretenden Liganden multipliziert.



Anschließend werden alle möglichen Schemata gezeichnet, mit denen sich sämtliche Ecken des Polygons mit Linien verbinden lassen können, ohne dass dabei eine geschlossene Figur entsteht. Dabei verfügen die Schemata über $(n - 1)$ Linien, wobei n die Anzahl der Linien des Polygons darstellt. Für den ordered bi-bi-Mechanismus existieren hierbei vier Figuren.



Für jede einzelne Enzymform wird nun folgender Prozess durchlaufen: die Enzymform wird in die vier Schemata eingetragen, anschließend werden die Pfeile an den Linien eingezeichnet, die in Richtung dieser Enzymform zeigen, zusätzlich werden die Geschwindigkeitskonstanten eingezeichnet. Unter jedes Schema wird das Produkt der eingetragenen Geschwindigkeitskonstanten geschrieben. Für die freie Enzymform ergibt sich hierbei folgendes Schema:



Die relative Menge der jeweiligen Enzymform, in dem Fall des freien Enzyms ($[E]/[E]_0$), wird nun definiert als:

$$\frac{[E]}{[E]_0} = \frac{Num_E}{D} \quad (3.12)$$

wobei $[E]$ für die Konzentration des freien Enzyms steht und $[E]_0$ für die Summe der Konzentration aller Enzymformen. Num_E ist der spezifische Zählerterm für das freie Enzym und bildet

sich aus der Summe der unter die vier Schemata geschriebenen Produkte der Geschwindigkeitskonstanten:

$$Num_E = k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P] + k_{+2}k_{+3}k_{+4}[B] + k_{-1}k_{+3}k_{+4} + k_{-1}k_{-2}k_{+4} \quad (3.13)$$

Die Zählerterme der anderen drei Enzymformen lassen sich entsprechend analog ermitteln und sind wie folgt:

$$Num_{EA} = k_{+1}k_{-2}k_{-3}[A][P] + k_{-2}k_{-3}k_{-4}[P][Q] + k_{+1}k_{+3}k_{+4}[A] + k_{+1}k_{-2}k_{+4}[A] \quad (3.14)$$

$$Num_{EAB} = k_{+1}k_{+2}k_{-3}[A][B][P] + k_{+2}k_{-3}k_{-4}[B][P][Q] + k_{-1}k_{-3}k_{-4}[P][Q] + k_{+1}k_{+2}k_{+4}[A][B] \quad (3.15)$$

$$Num_{EQ} = k_{+1}k_{+2}k_{+3}[A][B] + k_{+2}k_{+3}k_{-4}[B][Q] + k_{-1}k_{+3}k_{-4}[Q] + k_{-1}k_{-2}k_{-4}[Q] \quad (3.16)$$

Der Nennerterm D ist bei allen Enzymformen gleich und besteht aus der Summe der Zählerterme:

$$D = Num_E + Num_{EA} + Num_{EAB} + Num_{EQ} \quad (3.17)$$

Die Geschwindigkeitsgleichung der Reaktion hat denselben Nenner D wie die Gleichungen der Enzymformen, der Zähler setzt sich aus der Differenz zwischen dem Produkt des Zählerkoeffizienten Num_1 und sämtlicher Substrate einerseits und dem Produkt des Zählerkoeffizienten Num_2 und sämtlicher Produkte andererseits zusammen, wobei Num_1 das Produkt sämtlicher Geschwindigkeitskonstanten der Hinreaktion und Num_2 das Produkt sämtlicher Geschwindigkeitskonstanten der Rückreaktion darstellt:

$$v = \frac{Num_1[A][B] - Num_2[P][Q]}{D} = \frac{k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}[A][B] - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}[P][Q]}{D} \quad (3.18)$$

Nachdem der Nenner in seine Konzentrationsglieder geordnet wurde, können die Geschwindigkeitskonstanten in Koeffizientenform ausgedrückt werden (Coef_A für den Koeffizienten von A usw.). Somit erhält man folgende Geschwindigkeitsgleichung:

$$v = \frac{\text{Num}_1[A][B] - \text{Num}_2[P][Q]}{\text{Const} + \text{Coef}_A[A] + \text{Coef}_B[B] + \text{Coef}_P[P] + \text{Coef}_Q[Q] + \text{Coef}_{AB}[A][B] + \text{Coef}_{AP}[A][P] + \text{Coef}_{BQ}[B][Q] + \text{Coef}_{PQ}[P][Q] + \text{Coef}_{ABP}[A][B][P] + \text{Coef}_{BPQ}[B][P][Q]} \quad (3.19)$$

mit:

$$\begin{array}{ll} \text{Num}_1 & = k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4} & \text{Coef}_{AB} & = k_{+1}k_{+2}(k_{+3} + k_{+4}) \\ \text{Num}_2 & = k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4} & \text{Coef}_{AP} & = k_{+1}k_{-2}k_{-3} \\ \text{Const} & = k_{-1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3}) & \text{Coef}_{BQ} & = k_{+2}k_{+3}k_{-4} \\ \text{Coef}_A & = k_{+1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3}) & \text{Coef}_{PQ} & = k_{-3}k_{-4}(k_{-1} + k_{-2}) \\ \text{Coef}_B & = k_{+2}k_{+3}k_{+4} & \text{Coef}_{ABP} & = k_{+1}k_{+2}k_{-3} \\ \text{Coef}_P & = k_{-1}k_{-2}k_{-3} & \text{Coef}_{BPQ} & = k_{+2}k_{-3}k_{-4} \\ \text{Coef}_Q & = k_{-1}k_{-4}(k_{-2} + k_{+3}) & & \end{array}$$

Mit Hilfe der Definitionen für kinetische Konstanten nach Cleland (1963a), die in Tabelle 3.5 angegeben sind, lässt sich die Geschwindigkeitsgleichung auch wie folgt darstellen:

$$v = \frac{V_1V_2[A][B] - \frac{V_1V_2}{K_{eq}}[P][Q]}{K_{ia}K_{mB}V_2 + K_{mB}V_2[A] + K_{mA}V_2[B] + \frac{V_1K_{mQ}}{K_{eq}}[P] + \frac{V_1K_{mP}}{K_{eq}}[Q] + V_2[A][B] + \frac{V_1K_{mQ}}{K_{eq}K_{ia}}[A][P] + \frac{K_{mA}V_2}{K_{iq}}[B][Q] + \frac{V_1}{K_{eq}}[P][Q] + \frac{V_2}{K_{ip}}[A][B][P] + \frac{V_1}{K_{eq}K_{ib}}[B][P][Q]} \quad (3.20)$$

Bei genauerer Betrachtung der beiden Darstellungsformen ist zu erkennen, dass acht Geschwindigkeitskonstanten in Gleichung 3.19 elf Geschwindigkeitskonstanten Gleichung 3.20 gegenüberstehen, demzufolge müssen drei dieser Geschwindigkeitskonstanten abhängig sein. Folgende zwei Abhängigkeiten lassen sich hierbei aus den Haldane-Beziehungen ableiten (Cleland, 1982):

$$K_{eq} = \frac{V_1K_{mP}K_{iq}}{V_2K_{ia}K_{mB}} \quad (3.21)$$

Tabelle 3.5: Definitionen der kinetischen Konstanten im ordered bi-bi-Mechanismus nach Cleland (1963a).

$V_1 = \frac{Num_1}{Coef_{AB}} = \frac{k_{+3}k_{+4}}{k_{+3}+k_{+4}}$	$V_2 = \frac{Num_2}{Coef_{PQ}} = \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_{-1}+k_{-2}}$	$K_{mA} = \frac{Coef_B}{Coef_{AB}} = \frac{k_{+3}k_{+4}}{k_{+1}(k_{+3}+k_{+4})}$
$K_{mB} = \frac{Coef_A}{Coef_{AB}} = \frac{k_{+4}(k_{-2}+k_{+3})}{k_{+2}(k_{+3}+k_{+4})}$	$K_{mP} = \frac{Coef_Q}{Coef_{PQ}} = \frac{k_{-1}(k_{-2}+k_{+3})}{k_{-3}(k_{-1}+k_{-2})}$	$K_{mQ} = \frac{Coef_P}{Coef_{PQ}} = \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_{-4}(k_{-1}+k_{-2})}$
$K_{ia} = \frac{const}{Coef_A} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	$K_{ib} = \frac{Coef_{PQ}}{Coef_{BPQ}} = \frac{k_{-1}+k_{-2}}{k_{+2}}$	$K_{ip} = \frac{Coef_{AB}}{Coef_{ABP}} = \frac{k_{+3}+k_{+4}}{k_{-3}}$
$K_{iq} = \frac{Const}{Coef_Q} = \frac{k_{+4}}{k_{-4}}$	$K_{eq} = \frac{Num_1}{Num_2} = \frac{k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}}{k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}}$	

$$K_{iq} = \left(\frac{V_1}{V_2} \right)^2 \frac{K_{ip}K_{mQ}}{K_{mA}K_{ib}} \quad (3.22)$$

Eine weitere wurde von Straathof & Hejnen (1996) gezeigt:

$$\frac{K_{mA}}{K_{ia}} = 1 + \frac{V_1}{V_2} \left(1 - \frac{K_{mQ}}{K_{iq}} \right) - \frac{K_{mP}K_{iq}}{K_{ip}K_{mQ}} \quad (3.23)$$

Das King-Altman-Verfahren ist jedoch nicht das einzige Verfahren, um komplexe Geschwindigkeitsgleichungen herzuleiten. So existieren unter anderem Methoden, die auf der Graphentheorie beruhen als auch automatisierte Methoden (Fromm, 1970; Indge & Childs, 1976).

3.2.6 Substratinhibition im ordered bi-bi-Enzymmechanismus

Im ordered bi-bi-Mechanismus existieren drei mögliche Mechanismen für Substratinhibition: EB-Substratinhibition, EA₂-Substratinhibition und EBQ-Substratinhibition (Segel, 1993).

Bei der EB-Substratinhibition bindet ein Molekül des zweitbindenden Substrats (B) an das freie Enzym und bildet mit diesem einen dead-end-EB-Komplex aus. Die Geschwindigkeitsgleichung für die Hinreaktion ist wie folgt:

$$v = v_{max} \cdot \frac{[A][B]}{K_{ia}K_{mB} \left(1 + \frac{[B]}{K_i} \right) + K_{mA}[B] \left(1 + \frac{[B]}{K_i} \right) + K_{mB}[A] + [A][B]} \quad (3.24)$$

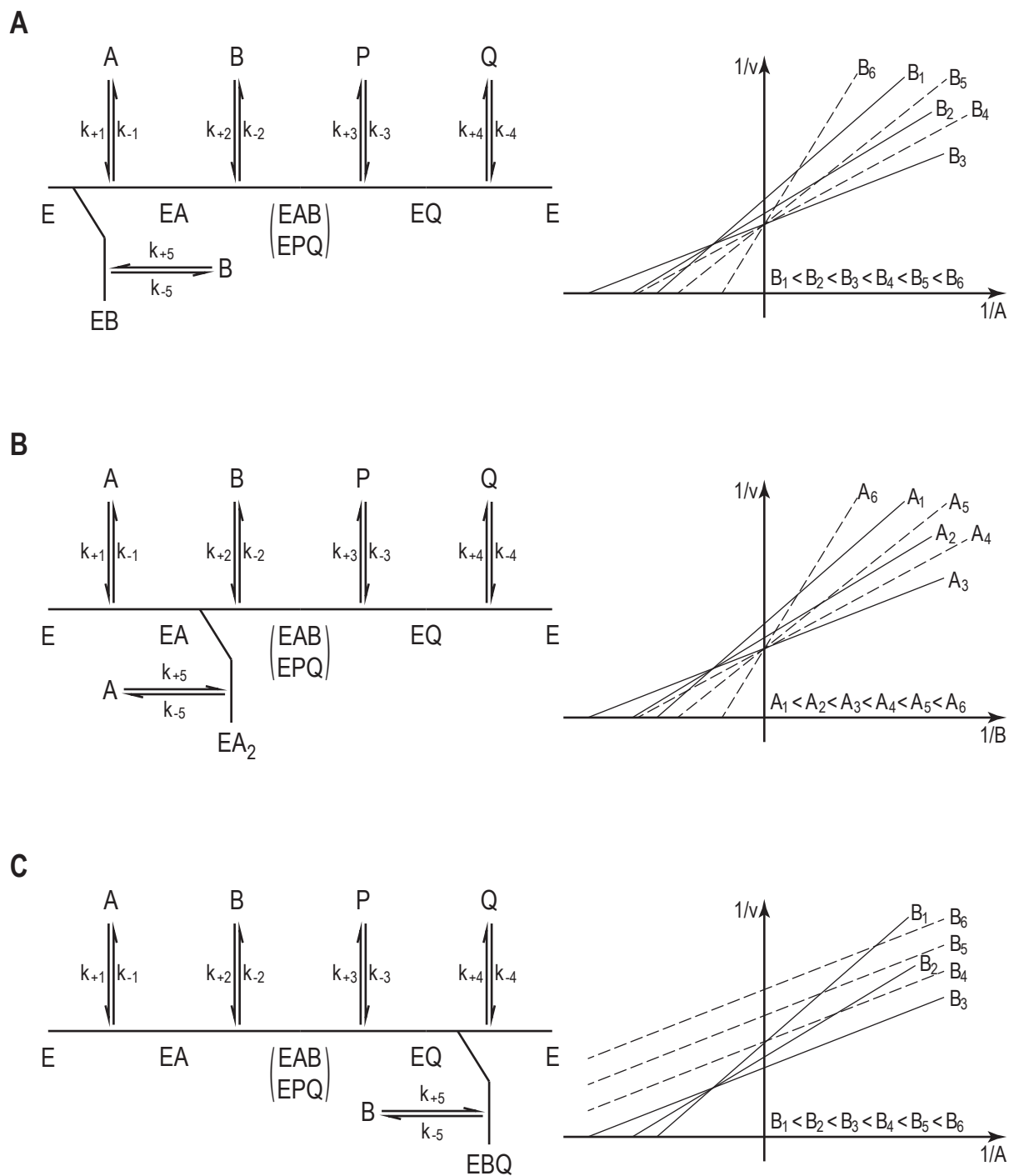


Abbildung 3.8: Schemata und Lineweaver-Burk-Plots verschiedener Substratinhibitionstypen im ordered bi-bi-Mechanismus. **A:** kompetitive EB-Inhibition, **B:** kompetitive EA₂-Inhibition, **C:** unkompetitive EBQ-Inhibition.

Bei der EA₂-Substratinhibition bindet ein zusätzliches A-Molekül an den binären EA-Komplex und bildet mit diesem einen ternären dead-end-EA₂-Komplex. Die Hinreaktion hat folgende Geschwindigkeitsgleichung:

$$v = v_{max} \cdot \frac{[A][B]}{K_{ia}K_{mB} + K_{mA}[B] + K_{mB}[A] \left(1 + \frac{[A]}{K_i}\right) + [A][B]} \quad (3.25)$$

Bei der EBQ-Substratinhibition bindet nach der Umsetzung der Substrate und nach Dissoziation des Produkts [P] ein B-Molekül an den binären EQ-Komplex bevor das Produkt Q dissoziiert und bildet mit diesem einen dead-end-EBQ-Komplex aus. Hier gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben zur Geschwindigkeitsgleichung. Während in Segel (1993) explizit konstatiert wird, dass keine Geschwindigkeitsgleichung für diesen Mechanismus existiert, ist in Cornish-Bowden (2012) eine Geschwindigkeitsgleichung für die Hinreaktion angegeben, die folgende Form hat:

$$v = v_{max} \cdot \frac{[A][B]}{K_{ia}K_{mB} + K_{mA}[B] + K_{mB}[A] + [A][B] \left(1 + \frac{[B]}{K_i}\right)} \quad (3.26)$$

Die Schemata dieser drei Substratinhibitionsmechanismen sind in Abbildung 3.8 gezeigt. Die EB-Substratinhibition ist eine kompetitive Inhibition, da B mit A um die Bindestelle am freien Enzym konkurriert. Ebenfalls kompetitiv ist die EA₂-Substratinhibition, da das zweite A-Molekül mit B um die Bindestelle am EA konkurriert. Wird das inhibierende Substrat bei unterschiedlichen Konzentrationen konstant gehalten, während das nichtinhibierende Substrat variiert wird, zeigen beide Mechanismen ein ähnliches Muster im Lineweaver-Burk-Plot. Bei niedrigen Konzentrationen des inhibierenden Substrates verringern sich die Steigungen der Geraden mit zunehmender Konzentration des inhibierenden Substrats, während sich sämtliche Geraden in einem Punkt im zweiten Quadranten schneiden; bei hohen Konzentrationen des inhibierenden Substrats werden die Steigungen der Geraden wieder größer und der Schnittpunkt verschiebt sich auf die Ordinate (vgl. Abbildung 3.8). Die EBQ-Substratinhibition ist hingegen eine unkompetitive Inhibition. Bei niedrigen Konzentrationen des inhibierenden Substrats verhalten sich die Geraden im Lineweaver-Burk-Plot wie bei den anderen beiden Mechanismen,

bei hohen Konzentrationen des inhibierenden Substrats bleibt die Steigung der Geraden jedoch konstant, diese verschieben sich allerdings parallel in y-Richtung (Segel, 1993).

3.2.7 Enzymkinetische Modelle als Prozessmodelle

Mit der zunehmenden Bedeutung von Biokatalysatoren in der chemischen Industrie finden auf der anderen Seite zunehmend Prinzipien der chemischen Reaktionstechnik Anwendung bei der Entwicklung biokatalytischer Prozesse (Hogan & Woodley, 2000). Bereits in den 1990er Jahren wurden Modelle enzymatischer Prozesse bei der Verfahrensentwicklung genutzt, und mittlerweile wird eine solche Herangehensweise auch in der Industrie als Routinevorgang gesehen. Mathematische Modelle können hierbei genutzt werden, um optimale Betriebsbedingungen zu finden und die Produktivitäten zu erhöhen (Ikemi *et al.*, 1990; Kragl *et al.*, 1996; Vasic-Racki *et al.*, 2003). Dabei können enzymatische Modelle mit physikalischen, wie dem Gaseintrag ins Reaktionsmedium, oder chemischen Modellen, wie dem Zerfall von Reaktanden, kombiniert werden (Hogan & Woodley, 2000; Van Hecke *et al.*, 2009).

Häufig werden Michaelis-Menten-Modelle verwendet, um Enzymreaktionen zu beschreiben, bei denen die kinetischen Parameter durch Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit einzeln bestimmt werden (Hogan & Woodley, 2000; Vasic-Racki *et al.*, 2003; Findrik *et al.*, 2005; Findrik & Vasić-Racki, 2007). Dabei ist das Michaelis-Menten-Modell als flexible Näherung an den tatsächlichen Mechanismus zu betrachten, das zusätzlich durch Terme für Substrat- und Produktinhibition erweitert werden kann, wodurch sehr akkurate Vorhersagen getroffen werden können, die sogar mechanistische Modelle übertreffen können (Vasic-Racki *et al.*, 2003). Mit einer solchen Vorgehensweise wurden bereits Prozesse mit bis zu fünf beteiligten Enzymen modelliert (Vasic-Racki *et al.*, 2003).

Eine Alternative ist der mechanistische Ansatz, bei dem Geschwindigkeitsgleichungen verwendet werden, die auf dem jeweiligen Enzymmechanismus beruhen und auch Rückreaktionen zulassen (Schmidt *et al.*, 2010; Braun *et al.*, 2011; Groher & Hoelsch, 2012). Hierbei werden die Parameter vorwiegend simultan durch Verlaufskurvenanalyse bestimmt (Cornish-Bowden, 1972; Orsi & Tipton, 1979; Duggleby, 2001). Dieser Ansatz setzt jedoch Kenntnis über den Enzymmechanismus voraus, der gegebenenfalls zunächst experimentell bestimmt werden muss (Groher & Hoelsch, 2012). Alternativ dazu kann die Identifikation auch anhand experimenteller

Daten mit Hilfe eines Satzes verschiedener Modellkandidaten erfolgen (Bardow & Marquardt, 2004; Brendel *et al.*, 2006; Michalik *et al.*, 2007).

3.3 Synthese von Ursodesoxycholsäure (UDCA)

3.3.1 Struktur und Bedeutung von Gallensalzen

Die Galle ist eine Körperflüssigkeit, die in der Leber produziert wird. Sie besteht hauptsächlich aus Wasser (82 %), in dem die Elektrolyte Natrium (130-165 mM), Chlorid (90–120 mM) und Hydrogencarbonat (30 mM) gelöst sind. Der funktionelle Anteil der Gallenflüssigkeit besteht aus Gallensalzen (12 %), die synonym auch als Gallensäuren bezeichnet werden (Löffler & Petrides, 1998). Ihre gelbliche bis grünliche Färbung erhält sie durch Anteile an Bilirubin und Biliverdin. Zusätzlich finden sich Anteile an Alkalischer Phosphatase, Lecithin und anderen Phospholipiden, Cholesterin und weiteren Lebermetaboliten (Löffler & Petrides, 1998; Begley *et al.*, 2005). Bei den meisten Wirbeltieren, darunter dem Menschen, wird die Gallenflüssigkeit in der Gallenblase gespeichert. In den Zwölffingerdarm sekretiert, erfüllen Gallensalze ihre Hauptaufgabe in der Fettverdauung, indem sie Lipide und andere lipophile Stoffe emulgieren. Ein großer Anteil der Gallensalze wird anschließend im Darm resorbiert und erneut der Galle zugefügt, womit diese dem enterohepatischen Kreislauf unterliegen (Silbernagl & Agamemnon, 2003; Ridlon *et al.*, 2006).

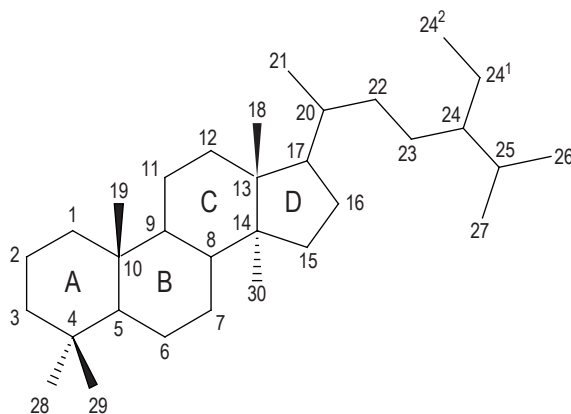


Abbildung 3.9: Allgemeine Struktur von Steroiden. Die 4 Ringe werden mit den Buchstaben A–D bezeichnet, die Kohlenstoffatome sind durchnummeriert.

Gallensalze gehören zu der Stoffgruppe der Steroide, welche wiederum zu der Stoffklasse der Lipide zählen. Sämtliche Steroide bestehen aus einem Grundgerüst aus Cyclopentanoperhydrophenanthren (Steran). Sie weisen allgemein eine starre Molekülgestalt auf und sind in Folge dessen gut kristallisierbar. In ihrer Nomenklatur werden ihre vier Kohlenstoffringe mit A, B, C und D bezeichnet, während die Kohlenstoffatome durchnummeriert sind (vgl. Abbildung 3.9). Die Position der Substituenten am Sterangerüst werden abhängig von ihrer Position entsprechend der Darstellung in Abbildung 3.9 benannt. Dabei befinden sich Substituenten unterhalb der Zeichenebene in α -Konfiguration und oberhalb der Zeichenebene in β -Konfiguration (Fieser, 1950a).

Charakteristisch für Gallensalze sind 1 – 3 Hydroxylierungen an den Positionen C3, C7 und C12, meist in α -Konfiguration, sowie eine 5 Kohlenstoffatome umfassende Acyl-Seitenkette an C17, was die im Vergleich zu anderen Steroiden hohe Löslichkeit von Gallensalzen bedingt (Begley *et al.*, 2005). Durch ihren Aufbau erhalten Gallensalze grenzflächenaktive Eigenschaften, wobei die Acylgruppe und die Hydroxylgruppen in α -Konfiguration unterhalb der Zeichenebene den hydrophilen Teil und die hydrophoben Methylgruppen an C18 und C19 auf der β -Seite den hydrophoben Bereich ausmachen (Helenius & Simons, 1975; Hofmann & Mysels, 1988). In wässrigen Lösungen bilden sie deshalb Micellen aus 4 – 50 Molekülen, wenn eine kritische Konzentration (*critical micellar concentration*, CMC) überschritten wird (Begley *et al.*, 2005).

Eine Unterteilung der Gallensalze erfolgt weiterhin anhand ihrer Biosynthese. Dabei werden in der Leber aus Cholesterol synthetisierte Gallensalze als primäre Gallensalze bezeichnet,

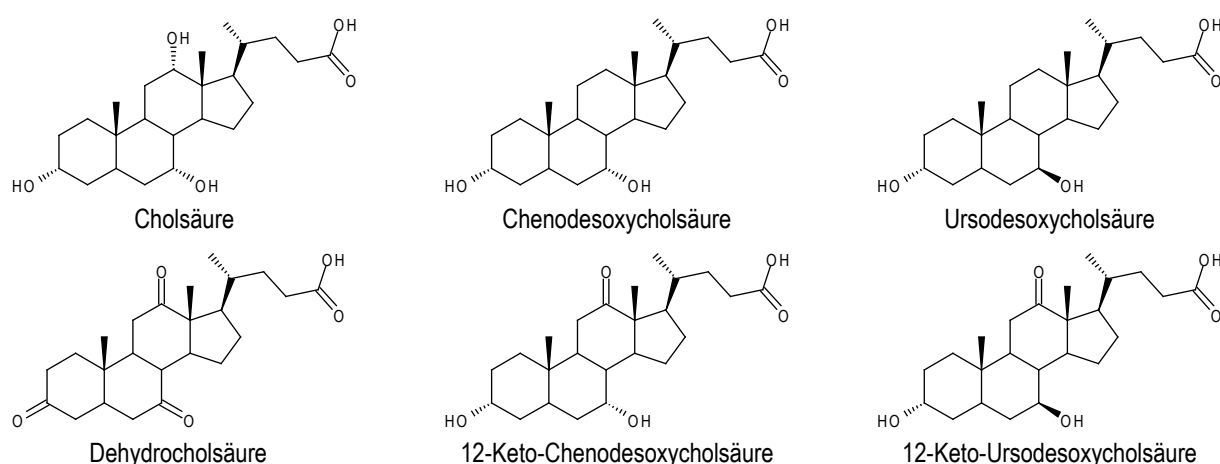


Abbildung 3.10: Auswahl einiger für diese Forschungsarbeit wichtige Gallensalze.

während im Darm durch mikrobielle Umwandlung entstandene sekundäre Gallensalze genannt werden (Hofmann, 1999). In der menschlichen Galle kommen vor allem die primären Gallensalze Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA) vor, die überwiegend als Glycin- oder Taurin-Konjugate vorliegen (Bortolini *et al.*, 1997). Die N-Acyamidierung erfolgt dabei in der Leber und führt zu einer Verringerung des pK_S (Hofmann & Roda, 1984; Hofmann & Mysels, 1992; Ridlon *et al.*, 2006). Eine Übersicht wichtiger Gallensalze ist in Abbildung 3.10 zu sehen.

3.3.2 Ursodesoxycholsäure als Pharmazeutikum

Während Ursodesoxycholsäure (UDCA) bei Bären als primäres Gallensalz gebildet wird, zählt sie beim Menschen zu den sekundären Gallensalzen. Sie ist ein Epimer der Chenodesoxycholsäure (CDCA) und verfügt über zwei Hydroxylierungen an C3 (in α -Konfiguration) und C7 (in β -Konfiguration). Da sie als Pharmazeutikum im Gegensatz zu CDCA nahezu frei von unerwünschten Arzneimittelwirkungen ist (Gleeson *et al.*, 1990), wird sie vor allem zur medikamentösen Auflösung von Cholesteroll-Gallensteinen verwendet (Stiehl *et al.*, 1978; Salen *et al.*, 1980; Igimi & Carey, 1981). Weiterhin erfährt UDCA Anwendung in der Behandlung von primär sklerosierender Cholangitis (Beuers *et al.*, 1992), primärer bilärer Zirrhose (Nguyen *et al.*, 2010), akuter viraler Hepatitis (Galský *et al.*, 1999), bei der Prävention von Darmkrebs (Khare *et al.*, 2003; Im & Martinez, 2004) und zur Verringerung von Abstoßungsreaktionen nach Lebertransplantationen (Friman *et al.*, 1992). Kommerziell erhältlich ist UDCA u.a. unter den Markennamen Cholofalk[®], Ursochol[®] und Cholit-Ursan[®].

3.3.3 Gewinnung und chemische Darstellung von Ursodesoxycholsäure

Neben der bereits angesprochenen Möglichkeit der natürlichen Gewinnung wird UDCA seit Jahrzehnten chemisch mit CA als Ausgangsstoff dargestellt. Die Synthese umfasst einen siebenstufigen Prozess, bei dem in den ersten fünf Schritten die 12α -Hydroxygruppe entfernt und somit das Zwischenprodukt CDCA erhalten wird (Fieser & Rajagopalan, 1950b; Hofmann, 1963), anschließend erfolgt in zwei Schritten die Epimerisierung der 7α -Hydroxygruppe in die β -Konfiguration, so dass UDCA gebildet wird (Fieser *et al.*, 1952; Samuelsson, 1960). Die große Anzahl an Schritten ist bedingt durch die schwierige Stereochemie der Synthese und re-

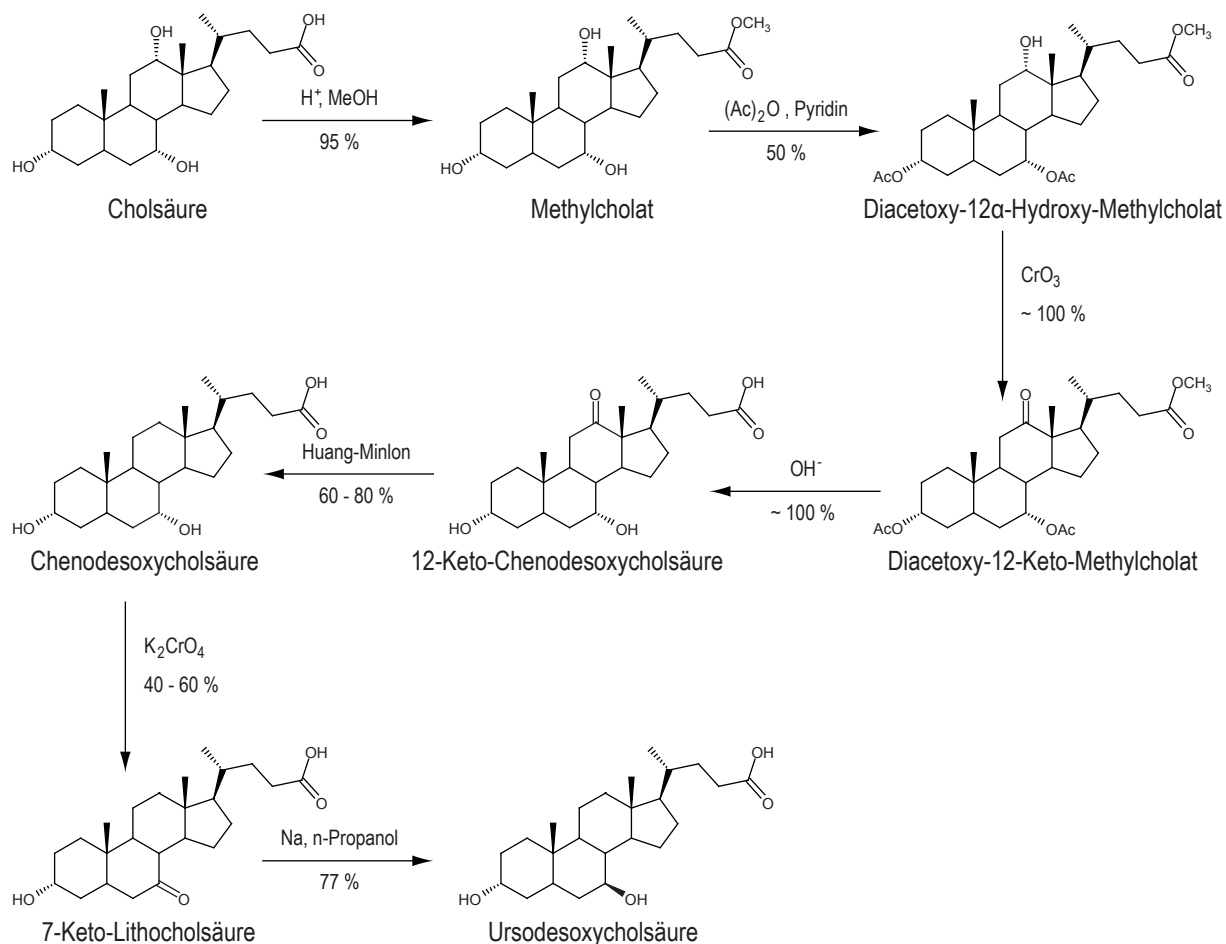


Abbildung 3.11: Chemische Darstellung von Ursodesoxycholsäure nach Hofmann (1963).

sulziert in geringen Gesamtausbeuten von lediglich 30 % (Carrea *et al.*, 1992). Der chemische Syntheseweg ist in Abbildung 3.11 gezeigt.

3.3.4 Mikrobielle Umwandlung von Gallensalzen

Sekretierte Gallensalze können im Darm durch Mikroorganismen umgewandelt werden. Als Gründe für eine solche Umwandlung gelten zum einen der erzielbare Energiegewinn (Sherrod & Hylemon, 1977; Ridlon *et al.*, 2006), zum anderen eine möglichen Detoxifikation der zellmembranschädigenden Gallensalze (De Boever *et al.*, 2000; De Smet *et al.*, 1995; Albalak *et al.*, 1996). Die Dekonjugation der Peptidbindung an C24 ist eine häufige Umwandlung (Lundeen & Savage, 1990; Christiaens *et al.*, 1992; Grill *et al.*, 1995), weiterhin können die Hydroxygruppen an C3, C7 und C12 zu Ketogruppen oxidiert werden (Ridlon *et al.*, 2006), die wiederum von anderen Organismen zu Hydroxygruppen in α - oder β -Konfiguration reduziert werden können

(Hirano & Masuda, 1982; Batta *et al.*, 1985, 1991). Weiterhin kann eine Dehydroxylierung an C7 erfolgen (Doerner *et al.*, 1997; Wells & Hylemon, 2000).

3.3.5 Mikrobielle Hydroxysteroiddehydrogenasen

Die Oxidation und Epimerisierung der C3-, C7-, und C12-Hydroxygruppen an Gallensalzen werden von mikrobiellen Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDH) katalysiert. Diese gehören zur Gruppe der Oxidoreduktasen und sind in der Natur weit verbreitet (Ridlon *et al.*, 2006). Einige wichtige HSDH werden im Folgenden vorgestellt.

3 α -Hydroxysteroiddehydrogenasen (3 α -HSDH)

3 α -HSDH (EC 1.1.1.50 und EC 1.1.1.213) katalysieren die Oxidation der 3 α -Hydroxygruppe am Steroidgrundgerüst sowie deren Rückreaktion und nutzen in der Regel NADH als Kofaktor. Mikrobielle Vertreter wurden u. a. in *Clostridium perfringens* (Macdonald *et al.*, 1976), *Peptostreptococcus productus* (Edenharder *et al.*, 1989a) und *Comamonas testosteroni* (Talalay *et al.*, 1952) gefunden. Allgemein konnte gezeigt werden, dass Dihydroxygallensäuren bessere Substrate für 3 α -HSDH darstellen als Trihydroxygallensäuren (Macdonald *et al.*, 1983; Edenharder *et al.*, 1989a).

Die in dieser Arbeit verwendete 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni* wurde bereits kinetisch charakterisiert (Oppermann & Maser, 1996; Maser *et al.*, 2000), rekombinant exprimiert und deren Struktur im binären Komplex mit NAD aufgeklärt (Grimm *et al.*, 2000).

7 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen (7 β -HSDH)

7 β -HSDH (EC 1.1.1.201) katalysieren die Oxidation der 7 β -Hydroxygruppe am Steroidgrundgerüst sowie deren Rückreaktion. Sie nutzen in der Regel NADPH als Kofaktor, wobei auch NADH-abhängige Varianten bekannt sind. NADPH-abhängige Vertreter wurden u. a. in *Peptostreptococcus productus* (Hirano & Masuda, 1982; Edenharder *et al.*, 1989a) und *Clostridium species 25.11.c.* (Edenharder *et al.*, 1989b) gefunden. Ein NADH-abhängiger Vertreter wurde in *Xanthomonas maltophilia* entdeckt (Pedrini *et al.*, 2006). Drei NADPH-abhängige Vertreter aus *Collinsella aerofaciens*, *Clostridium absonum* und *Ruminococcus gnavus* N53 wurden

bislang rekombinant exprimiert und kinetisch charakterisiert (Liu *et al.*, 2010; Ferrandi *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit wird mit der 7β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* gearbeitet.

7α -Hydroxysteroiddehydrogenasen (7α -HSDH)

7α -HSDH (EC 1.1.1.159) katalysieren die Oxidation der 7α -Hydroxygruppe am Steroidgerüst sowie deren Rückreaktion und nutzen mit wenigen Ausnahmen NADPH als Kofaktor. Weit verbreitet sind sie unter Bacteroiden und Clostridien, aber auch in *E. coli* und *Ruminococcus* sp. finden sich Exemplare (Macdonald *et al.*, 1976; Yoshimoto *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 2003). Von der NADH-abhängigen Variante aus *E. coli* wurde von Tanaka *et al.* (1996b) eine Kristallstruktur im binären Komplex mit NAD bzw. im ternären Komplex mit NADH und 7-Oxoglyco-Chenodesoxycholsäure aufgeklärt. Dabei konnte auch ihr katalytischer Mechanismus identifiziert werden (Tanaka *et al.*, 1996b).

3.3.6 Möglichkeiten der enzymatischen Synthese von Ursodesoxycholsäure

Aufgrund der hohen Anforderung an die Stereo- und Regioselektivität bei der Synthese von UDCA wurden bereits vor Jahrzehnten enzymatische Schritte unter Verwendung mikrobieller HSDH vorgeschlagen. Diese Synthesewege lassen sich ausgehend von Cholsäure als Substrat in zwei Gruppen zusammenfassen. Beide Reaktionswege sind in Abbildung 3.12 gezeigt.

Ein möglicher Syntheseweg beinhaltet drei enzymatische Schritte: die Oxidation der 7α -Hydroxygruppe zur Ketogruppe durch eine 7α -HSDH, die Oxidation der 12α -Hydroxygruppe zur Ketogruppe durch eine 12α -HSDH und die Reduktion der 7-Ketogruppe zur 7β -Hydroxygruppe durch eine 7β -HSDH (Sutherland & Macdonald, 1982a; Sutherland *et al.*, 1982b; Macdonald *et al.*, 1982; Bortolini *et al.*, 1997). Als Zwischenprodukt wird 12-Keto-Ursodesoxycholsäure (12-Keto-UDCA) erhalten, die durch eine chemische Wolff-Kishner-Reduktion zur UDCA umgewandelt werden kann (Wolff, 1912; Huang, 1946, 1949). Dieser Syntheseweg wurde in vorherigen Arbeiten bereits eingehend untersucht. Bovara *et al.* (1996) untersuchte diese Umsetzung mit isolierten Enzymen in zwei konsekutiven Schritten, einem Reduktionsschritt mit 7α -HSDH und 12α -HSDH und einem Oxidationsschritt mit 7β -HSDH. Die Epimerisierung der 7α -Hy-

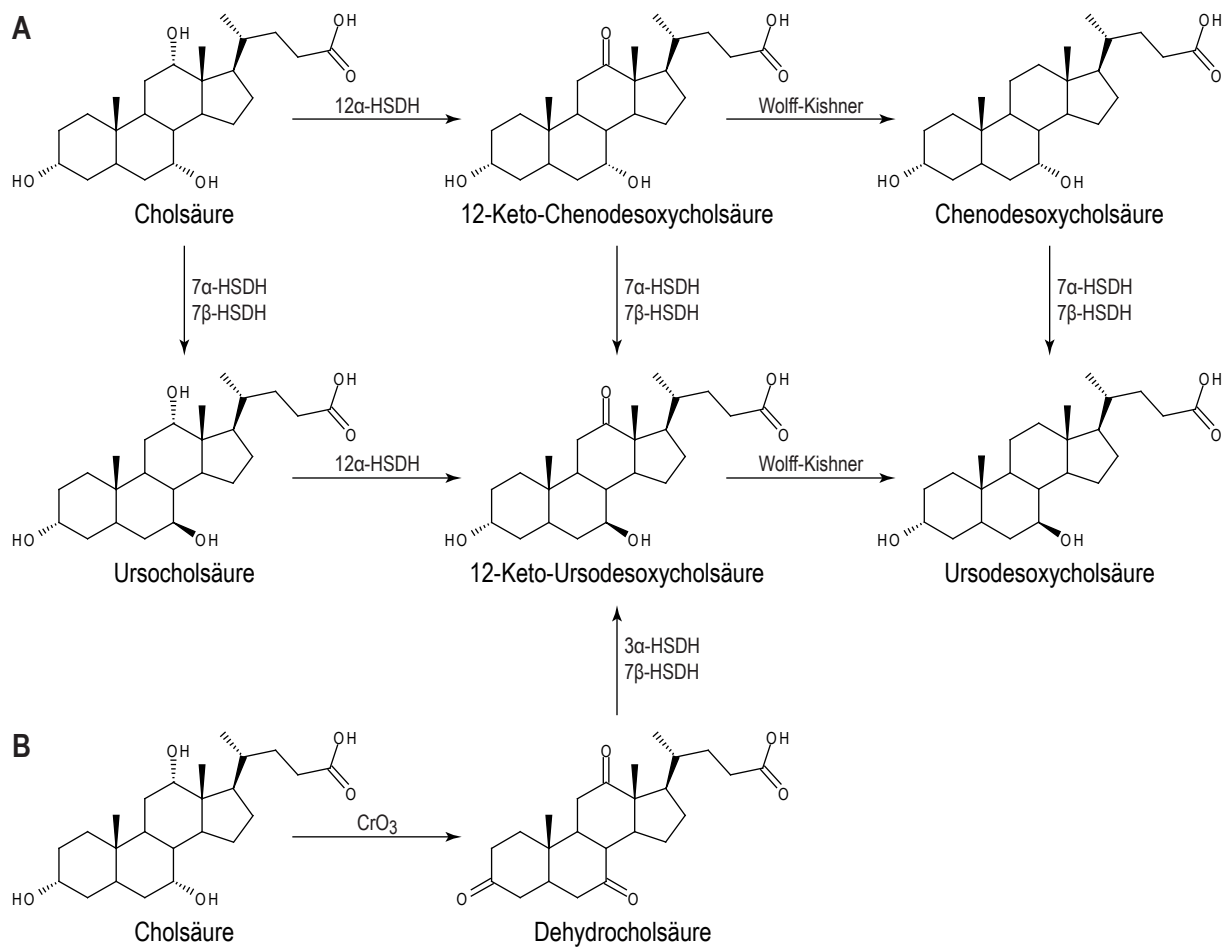


Abbildung 3.12: Chemo-Enzymatische Synthesewege für Ursodesoxycholsäure. **A:** Synthesewege nach Sutherland & Macdonald (1982a), **B:** Syntheseweg nach Carrea *et al.* (1992).

droxygruppe durch *Xanthomonas maltophilia* wurde von Medici *et al.* (2002) gezeigt. Mit der Oxidation der 12 α -Hydroxygruppe beschäftigten sich unter anderem Fossati *et al.* (2006), und am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der TU München gelang Michael Braun mit Hilfe eines rekombinanten Ganzzellbiokatalysators die vollständige Umsetzung von 102 mM Cholsäure zu 12-Keto-Chenodesoxycholsäure innerhalb von 96 h im Litermaßstab (Braun, 2011). Weiterhin wurde durch Monti *et al.* (2009) versucht, sämtliche Reaktionsschritte simultan in einer Multi-Enzym-Kaskade durchzuführen. Dabei konnten 12,5 mM Cholsäure innerhalb von 5 h vollständig zu 12-Keto-UDCA umgesetzt werden.

Ein zweiter Weg wurde von von Carrea *et al.* (1992) vorgeschlagen. Dabei wird die Cholsäure zunächst in einem chemischen Verfahren zu Dehydrocholsäure (DHCA) oxidiert, wobei sämtliche drei Hydroxygruppen zu Ketogruppen umgewandelt werden. Anschließend erfolgen zwei enzymatische Reduktionsschritte an C3 und C7 mit einer 3 α -HSDH und einer 7 β -

HSDH zu 12-Keto-UDCA, das wiederum durch eine Wolff-Kishner-Reduktion in UDCA umgewandelt werden kann. Carrea *et al.* (1992) konnte mit isolierten Enzymen 12,5 mM DHCA innerhalb von 15 h vollständig zu 12-Keto-UDCA umsetzen. Am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik untersuchte Braun *et al.* (2012) die einstufige Reduktion mit einer 7 β -HSDH und konnte mit einem rekombinanten Ganzzellbiokatalysator 70 mM innerhalb von 1 h vollständig zum Intermediat 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure umsetzen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine zweistufige Umsetzung von DHCA zu 12-Keto-UDCA mit rekombinanten Biokatalysatoren grundsätzlich möglich ist.

3.3.7 Zweistufige Reduktion von Dehydrocholsäure zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure

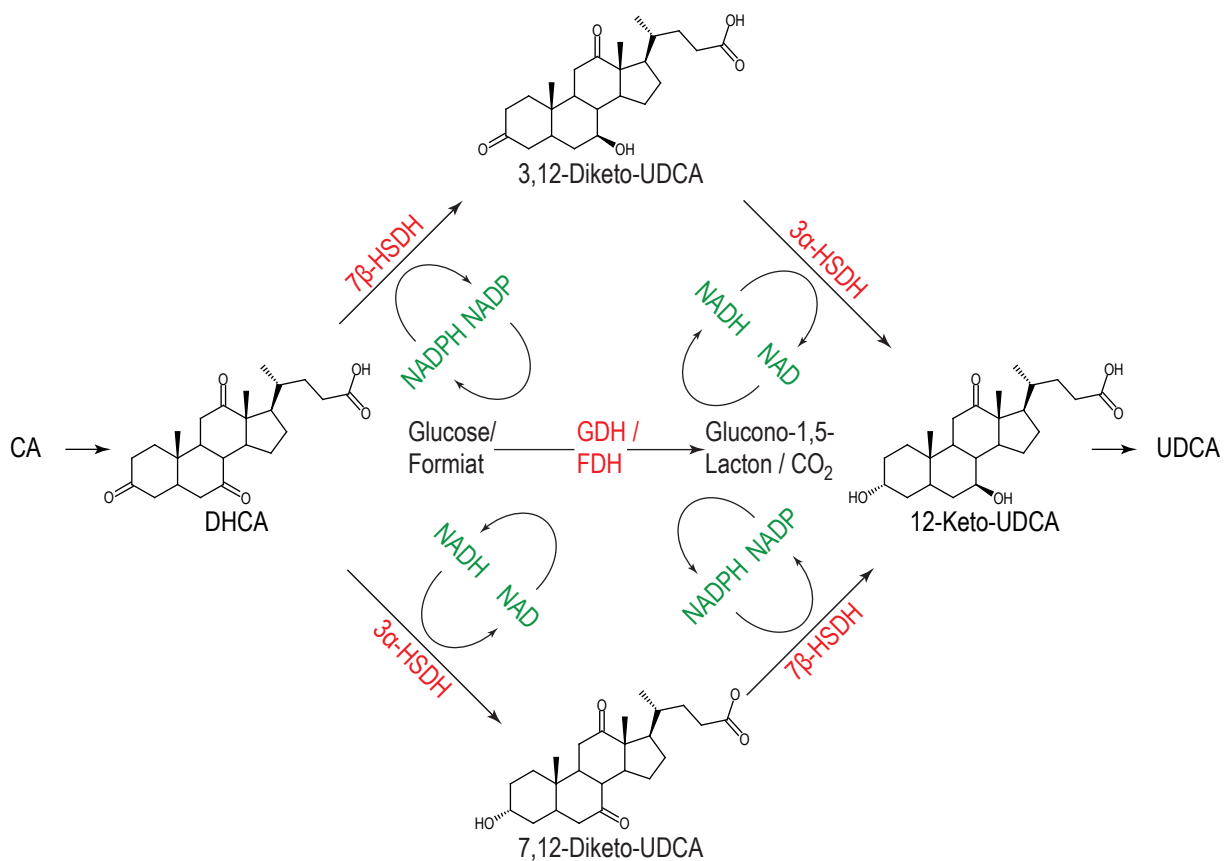


Abbildung 3.13: Schema der zweistufigen Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA unter Beteiligung eines bispezifischen Kofaktorregenerationsenzym.

Aus biotechnologischer Sicht, bildet die zweistufige Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA das Kernstück dieses Synthesewegs. An ihm sind die beiden Hydroxysteroiddehydrogenasen 3 α -HSDH und 7 β -HSDH beteiligt, die die Umsetzungen am Gallensalz katalysieren. Während

der Umsetzung werden Nicotinamid-Kofaktoren verbraucht, die für einen wirtschaftlichen Prozess *in situ* regeneriert werden müssen. Sowohl Carrea *et al.* (1992) als auch Braun *et al.* (2012) setzten eine NADH-abhängige 3 α -HSDH und eine NADPH-abhängige 7 β -HSDH ein, was bedeutet, dass zwei verschiedene Kofaktoren regeneriert werden müssen. Dies kann durch Verwendung zweier verschiedener Regenerationsenzyme realisiert werden oder durch die Verwendung eines Enzyms, das beide Kofaktoren regenerieren kann. Bei Carrea *et al.* (1992) wurde eine bispezifische GDH aus *B. megaterium* gewählt, während bei Braun *et al.* (2012) eine modifizierte, bispezifische FDH aus *M. vaccae* verwendet wurde.

Insgesamt existieren zwei Wege, um von DHCA zu 12-Keto-UDCA zu gelangen. Je nach Reihenfolge der Reduktionen kann dies entweder über das Intermediat 3,12-Diketo-UDCA oder das Intermediat 7,12-Diketo-UDCA führen (vgl. Abbildung 3.13). Vorarbeiten haben gezeigt, dass beide Wege tatsächlich existieren und zudem simultan beschriftet werden (Braun *et al.*, 2012), so dass für beide HSDH zwei miteinander konkurrierende Substrate vorliegen, die DHCA und das jeweilige Intermediat. Bei Verwendung eines bispezifischen Regenerationsenzym konkurrieren zusätzlich die beiden Kofaktoren NAD und NADP miteinander.

4 Material und Methoden

4.1 Allgemeines Material

Die üblicherweise für biotechnologische Arbeiten verwendeten Materialien sind in Anhang A aufgelistet. Diese untergliedern sich in Geräte (Anhang A.1), Chemikalien (Anhang A.2), Enzyme (Anhang A.3), Sonstige Verbrauchsmaterialien (Anhang A.4), Standards und Kits (Anhang A.5), Oligonukleotide (Anhang A.6) sowie Medien und Puffer (Anhang A.7). Spezielle Materialien, die einer besonderen Erwähnung bedürfen, sind in Abschnitt 4.2 aufgeführt.

4.2 Spezielles Material

4.2.1 Basisvektoren

Für die Expression von Proteinen wurden die Basisvektoren pET21a(+), pET22b(+), pET28a(+), pCOLADuet-1 verwendet (Novagen, Madison, USA). Der Vektor pCOLADuet-1 lag in einer modifizierten Version vor, bei der das Gen für die Kanamycinresistenz gegen ein Chloramphenicolresistenzgen ausgetauscht wurde. Die modifizierte Variante wird als pCOLA(mod) bezeichnet.

4.2.2 Vektorkonstrukte

Vektorkonstrukte, die in dieser Arbeit verwendet wurden, folgen einer systematischen Nomenklatur, hierbei steht „p“ für Plasmid, „F“ für FDH, „G“ für GDH, „3“ für 3 α -HSDH, „7“ für 7 β -HSDH, „r“ für eine eingefügte ribosomale Bindestelle (rbs) und „T“ für einen eingefügten T7-Promotor mit rbs. Weiterhin bezeichnen in Klammern gesetzte Buchstaben hinter den Enzymsymbolen die jeweils eingesetzte Enzymvariante. Beispielsweise steht „(w)“ für Wildtyp-

Enzym, „(G)“ im Falle der FDH für die D221G-Mutante und „(A)“ bzw. „(S)“ bei der 7 β -HSDH für die G39A- bzw. G39S-Mutante. Die Anhänge „-A“, „-K“ und „-C“ bezeichnen hierbei das Plasmidrückgrat und dessen Selektionsmarker, „-A“ steht für einen pET21a(+)- oder pET22b(+)-Vektor mit Ampicillinresistenz, „-K“ für einen pET28a(+)-Vektor mit Kanamycinresistenz und „-C“ für einen pCOLA(mod)-Vektor mit Chloramphenicolresistenz. Die Anordnung der Symbole in der Bezeichnung entspricht der Anordnung der Elemente in der Expressionskassette des Plasmids. Diese Nomenklatur gilt sowohl für zu Beginn der Arbeit bereits vorliegende als auch für während dieser Forschungsarbeit hergestellte Vektorkonstrukte. Die zu Beginn der Arbeit vorliegenden Vektorkonstrukte sind im Folgenden aufgelistet und zudem in Tabelle 4.1 zusammengefasst:

p7(w)-A: pET22b(+)-Vektor, in den die 7 β -HSDH (Wildtyp) aus *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 über die Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* einkloniert wurde (Braun, 2011).

p7(A)-A: pET22b(+)-Vektor, in den die 7 β -HSDH (G39A) aus *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 über die Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* einkloniert wurde (Braun, 2011).

p7(S)-A: pET22b(+)-Vektor, in den die 7 β -HSDH (G39S) aus *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 über die Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* einkloniert wurde (Braun, 2011).

p7(w)-C: pCOLA(mod)-Vektor, in den die 7 β -HSDH (Wildtyp) aus *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 über die Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* einkloniert wurde (Braun, 2011).

p3-A: pET22b(+)-Vektor, in das den 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni* über die Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* einkloniert wurde (Braun, 2011).

p3-C: pCOLA(mod)-Vektor, in das den 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni* über die Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* einkloniert wurde (Braun, 2011).

pF(G)-A: pET22b(+)-Vektor, in den die FDH (D221G) aus *Mycobacterium vaccae* N10 über die Schnittstellen *NdeI* und *EcoRI* einkloniert wurde. Durch Basendeletion an Position 1202 ist zudem ein C-terminaler His-Tag aktiviert (Hölsch, 2009).

p7(w)rF(G)-A: p7(w)-A-Vektor, in den die FDH (D221G) aus *Mycobacterium vaccae* N10 über die Schnittstellen *HindIII* und *NotI* einkloniert wurde (Braun, 2011).

pF(G)r7(w)-A: pF(G)-A, in den die 7 β -HSDH (Wildtyp) aus *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 über die Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* einkloniert wurde. Der C-terminale His-Tag an der FDH wurde durch die Insertion der 7 β -HSDH deaktiviert (Braun, 2011).

Tabelle 4.1: Zu Beginn der Arbeit vorliegende Vektorkonstrukte

Bezeichnung	Gene	Basisvektor
p7(w)-A	7 β -HSDH _{Wildtyp}	pET22b(+)
p7(w)-C	7 β -HSDH _{Wildtyp}	pCOLA(mod)
p7(A)-A	7 β -HSDH _{G39A}	pET22b(+)
p7(S)-A	7 β -HSDH _{G39S}	pET22b(+)
p3-A	3 α -HSDH	pET22b(+)
p3-C	3 α -HSDH	pCOLA(mod)
pF(G)-A	FDH _{D221G}	pET21a(+)
pF(G)r7(w)-A	FDH _{D221G} , 7 β -HSDH _{Wildtyp}	pET21a(+)
p7(w)rF(G)-A	7 β -HSDH _{Wildtyp} , FDH _{D221G}	pET22b(+)

4.2.3 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<i>Escherichia coli</i> BL49	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) hdhA::KanR
<i>Escherichia coli</i> BLLiu	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) Δ hdhA
<i>Escherichia coli</i> NovaBlue(DE3)	endA1 hsdR17(r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1lac [F' proA ⁺ B ⁺ lacIqZ Δ M15::Tn10(Tc ^R)]
<i>Escherichia coli</i> NB13	endA1 hsdR17(r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1lac [F' proA ⁺ B ⁺ lacIqZ Δ M15::Tn10(Tc ^R)] hdhA::KanR

4.3 Mikrobiologische Methoden

4.3.1 Kultivierung von *Escherichia coli* im Schüttelkolben

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden zunächst 5 mL LB-Medium mit Zugabe des entsprechenden Antibiotikums mit einer Bakterienkolonie oder einer Kryokultur inokuliert und anschließend über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100-200 mL TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit 1-5 mL der Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C, 250 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur bei 25 °C, 160 rpm weitere 21 h inkubiert.

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

Die Kultivierung von Ganzzellbiokatalysatoren im Litermaßstab erfolgte in einem Rührkesselreaktor (V = 7,5 L) der Firma Infors AG (Infors 3, Bottmingen, Schweiz). Der Reaktor war mit Sonden für Temperatur, pH und pO₂ ausgestattet, so dass diese Parameter von einer Steuerungseinheit online abgelesen und gegebenenfalls geregelt werden konnten. Temperiert wurde der Reaktor über einen an die Steuerungseinheit angeschlossenen Doppelmantel. Die Begasung erfolgte über ein Tauchrohr und die Durchmischung erfolgte durch drei Sechsstab-Scheibenrührer, die über einen Motor am Deckel des Reaktors angetrieben wurden. Zudem konnte über Zulaufpumpen Substrat und Base (Ammoniumhydroxidlösung, 25 % (w/v)) in den Reaktor zugegeben werden.

Vorkultur

Für die Kultivierung im 7,5 L Rührkesselreaktor wurden insgesamt zwei Vorkulturstufen angesetzt. Die erste Vorkultur erfolgte in einem Reagenzglas mit 5 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum. Diese wurde morgens mit 100 µL einer Kryokultur angeimpft und 6-10 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert, bis eine sichtbare Trübung auftritt. Anschließend wurden 500-1000 µL der ersten Vorkultur in einen mit 200 mL Minimalmedium nach Wilms *et al.* (2001)

gefüllten 1 L-Enghals-Erlenmeyerkolben überführt, welcher über Nacht bei 37 °C, 250 rpm (Exzentrizität 5 cm) inkubiert wurde.

Satzphase

Für die Rührkesselkultivierung wurde ein mit 2,8–3,8 L Minimalmedium und 1,5 mL Antischaummittel (Antifoam 204, Sigma-Aldrich, München) befüllter, sterilisierter Rührkesselreaktor verwendet, dessen Sonden vor Beginn der Kultivierung nach gängigem Verfahren kalibriert wurden. Dieser wurde mit Satzglucose (Endkonzentration 2 g L⁻¹) und entsprechendem Antibiotikum versetzt und anschließend mit 200 mL der zweiten Vorkulturstufe inokuliert. Begast wurde zu Beginn mit 2 L min⁻¹ Druckluft und die Rührerdrehzahl betrug am Anfang der Kultivierung 200 rpm. Bei Unterschreiten eines Schwellenwerts von 30 % pO₂ wurde die Rührerdrehzahl inkrementell um 5 rpm bis zu einem theoretischen Maximalwert von 1100 rpm erhöht. Der pH wurde einseitig durch Basenzugabe (25 % Ammoniumhydroxid, w/v) auf 7,0 geregelt, während die Temperatur auf 37 °C gehalten wurde. Nach Verbrauch der Satzglucose, was durch plötzlichen Anstieg des pO₂ festgestellt werden konnte, erfolgte der Übergang zur substratlimitierten Zulaufphase.

Substratlimitierte Wachstumsphase

Zu Beginn der Zulaufphase wurde die Begasung mit Druckluft auf 5 L min⁻¹ erhöht, die Temperatur auf 30 °C verringert und der Schwellenwert für die inkrementelle Rührerdrehzahlerhöhung auf 20 % pO₂ verringert. Die Zudosierung des Substratzulaufs erfolgte anhand Gleichung 4.1 (Jenzsch *et al.*, 2006), basierend auf einer festgelegten Wachstumsrate von $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$. Das Zulaufmedium enthielt 500 g L⁻¹ Glucose und 99 g L⁻¹ Diammoniumhydrogenphosphat. Der Biomassenertrag wurde mit 0,45 g_{BTM} g_{Glc}⁻¹ angenommen.

$$F(t) = \frac{\mu \cdot V_0 \cdot c_{X0}}{Y_{X,S} \cdot c_S} \cdot e^{\mu t} \quad (4.1)$$

mit: F Zulaufvolumenstrom, L h⁻¹
 μ eingestellte Wachstumsrate, h⁻¹

V_0	Medienvolumen zu Beginn der Zulaufphase, L
c_{X0}	Biotrockenmassekonzentration zu Beginn der Zulaufphase, g L^{-1}
$Y_{X,S}$	Biomasseertragskoeffizient, $\text{g}_{BTM} \text{g}_{Glc}^{-1}$
c_S	Glucosekonzentration im Zulaufmedium, g L^{-1}
t	Prozesszeit nach Beginn der Zulaufphase, h

Die Dauer der substratlimitierten Wachstumsphase betrug 19 h. Eine Stunde vor Ende dieser Phase wurde die Temperatur auf 20 °C verringert, weiterhin wurden 3 mL L^{-1} Spurenelementlösung und 2 mL L^{-1} Magnesiumsulfatlösung (1 M) zugegeben, jeweils bezogen auf V_0 . Wurde Ampicillin als Selektionsantibiotikum verwendet, wurden zudem jeweils zu Beginn und 1 h vor Ende der substratlimitierten Wachstumsphase 50 mg L^{-1} Ampicillin zugegeben.

Expressionsphase

Nach Beendigung der substratlimitierten Wachstumsphase erfolgte zu Beginn der Expressionsphase die Zugabe von 0,5 mM IPTG (bezogen auf V_0). Die Temperatur wurde auf 20 °C gehalten und die eingestellte Wachstumsrate auf $\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$ verringert. Nach 18 h wurde der Zulaufvolumenstrom auf den zuletzt eingestellten Wert konstant gehalten, da ansonsten eine Sauerstoffsättigung von $\text{pO}_2 \geq 20 \%$ nicht gewährleistet werden konnte. Eine weitere Zugabe von 3 mL L^{-1} Spurenelementlösung, 2 mL L^{-1} Magnesiumsulfatlösung (1 M) und gegebenenfalls 50 mg L^{-1} Ampicillin erfolgte 8 h nach Beginn der Expressionsphase. Die Zellen wurden 24 h nach Beginn der Expressionsphase geerntet, gegebenenfalls mit 30 % Glycerin (v/v) versetzt und bei -20 °C gelagert.

4.3.3 Kultivierung von *Escherichia coli* im 75 L Rührkesselreaktor

Für die präparative Herstellung von Dehydrogenasen und Ganzzellbiokatalysatoren wurden Kultivierungen im 75 L Rührkesselbioreaktor durchgeführt. Diese erfolgten in einem SIP- und CIP-fähigem Edelstahlreaktor der Firma Bioengineering (Bioengineering AG, Wald, Schweiz), welcher über Sonden für die Online-Verfolgung von Temperatur, pH und pO_2 , eine Abgasanalytik zur Online-Erfassung von O_2 und CO_2 , automatische Antischaumzudosierung, und eine fest verbaute Rührerwelle mit 2 Sechsstab-Scheibenrührern verfügte. Temperiert wurde der Reaktor

über einen Doppelmantel; die Begasung erfolgte über eine ringförmige Begasungseinheit unterhalb der Rührblätter. Über Zulaufpumpen konnten Substrat, Base, Säure und Antischaummittel zudosiert werden.

Die Prozessführung im 75 L-Bioreaktor erfolgte – abgesehen vom Maßstab – in gleicher Weise wie unter Abschnitt 4.3.2 beschrieben. Im Folgenden werden lediglich die maßstabsbedingten Abweichungen erwähnt.

Mediumzelldichtekultivierung zur Herstellung von Dehydrogenasen

Zu Beginn der Satzphase wurden 30-35 L Minimalmedium mit 1,6 L Vorkultur aus der Vorkulturstufe II inokuliert. Die Satzglucosekonzentration war gegenüber der Kultivierung im Laborbioreaktor auf 5 g L^{-1} erhöht. In der substratlimitierten Wachstumsphase wurde der Zulaufvolumenstrom so eingestellt, dass eine Wachstumsrate von $0,13 \text{ h}^{-1}$ erreicht wurde. Hierbei hatte das Zulaufmedium eine Zusammensetzung von 400 bzw. 500 g L^{-1} Glucose und 99 g L^{-1} Diammoniumhydrogenphosphat. Der Übergang zur Expressionsphase erfolgte 17 h nach Beginn der substratlimitierten Wachstumsphase durch Zugabe von $0,2 \text{ mM IPTG}$. Die in der Expressionsphase zunächst exponentielle Zudosierung des Zulaufmediums wurde 13-16 h nach Beginn der Expressionsphase auf dem zuletzt eingestellten Wert konstant gehalten. Die Zellernte erfolgte wie in den Kultivierungen im Laborbioreaktor 24 h nach Beginn der Expressionsphase.

Hochzelldichtekultivierung zur Herstellung von Ganzzellbiokatalysatoren

Die Hochzelldichtekultivierung des Ganzzellbiokatalysators erfolgte analog zur Mediumzelldichtekultivierung. Zu Beginn der Satzphase wurden 35 L Minimalmedium mit einer Satzglucosekonzentration von 10 g L^{-1} mit 1,6 L Vorkultur aus der Vorkulturstufe II inokuliert. In der substratlimitierten Wachstumsphase wurde der Zulaufvolumenstrom auf eine konstante Wachstumsrate auf $0,13 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Hierbei hatte das Zulaufmedium eine Zusammensetzung von 500 g L^{-1} Glucose und 99 g L^{-1} Diammoniumhydrogenphosphat. Der Übergang zur Expressionsphase erfolgte 14 h nach Beginn der substratlimitierten Wachstumsphase durch Zugabe von $0,5 \text{ mM IPTG}$. Der Zulaufvolumenstrom wurde zu Beginn der Expressionsphase auf 67%

des zuletzt in der substratlimitierten Wachstumsphase eingestellten Werts konstant gehalten. Die Zellernte erfolgte erneut 24 h nach Beginn der Expressionsphase.

4.3.4 Kultivierung von *Escherichia coli*-Bibliotheken in *Deep Well*-Platten

Für die Kultivierung von *E. coli*-Bibliotheken in *Deep Well*-Platten wurde zunächst eine Vorkultur in sterilen Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen angesetzt. Hierzu werden jeweils 150 µL Vorkulturmedium (TB-Medium versetzt mit 5 % (v/v) DMSO) in die Vertiefungen gegeben. Anschließend wurden die Vertiefungen mit Kolonien von Agarplatten mit Hilfe von sterilen Zahnstochern inokuliert. Abschließend wurden die Mikrotiterplatten mit sterilen, atmungsaktiven Verschlussfolien (Breathe-Easy, Diversified Biotech, USA) versiegelt und bei 37 °C über Nacht bei 200-250 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Mikrotiterplatten als Stammplatten steril bei -80 °C gelagert.

Die Proteinexpression erfolgte in sterilen *Deep Well*-Platten mit 96 Vertiefungen bei 2,2 mL Vertiefungsvolumen und quadratischen Vertiefungsöffnungen. Hierzu wurden jeweils 600 µL steriles TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in die Vertiefungen überführt, anschließend wurden die Vertiefungen mit je 10 µL Vorkultur aus der Stammplatte inokuliert. Die *Deep Well*-Platten wurden mit sterilen, atmungsaktiven Verschlussfolien versiegelt und bei 37 °C für 9 h bei 200-250 rpm inkubiert. Nach 9 h Inkubation wurden die Kulturen mit jeweils 100 µL Induktionslösung versetzt. Anschließend wurden die *Deep Well*-Platten mit sterilen, atmungsaktiven Verschlussfolien versiegelt und bei 30 °C für weitere 21 h bei 200-250 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (30 min, 3000 g). Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.3.5 Stammhaltung

Die kurz- und mittelfristige Stammhaltung von *E. coli* erfolgte auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Selektionsantibiotika bei 4 °C. Für eine langfristige Stammhaltung wurden Kryokulturen hergestellt, indem *E. coli*-Kulturen in LB-Medium angezogen wurden und in der exponentiellen Wachstumsphase ($OD \leq 0,8$) mit 20 % sterilem Glycerin (v/v) versetzt und in sterilen 1,5 mL-Reaktionsgefäßen bei -80 °C gelagert wurden.

4.3.6 Zellaufschluss von *Escherichia coli* in der Schwingmühle

Der Zellaufschluss von *E. coli* in der Schwingmühle erfolgte in 2 mL-Reaktionsgefäßen. Hierzu wurden jeweils 1 mL Glasperlen (Durchmesser 0,25-0,5 mm, Carl Roth, Karlsruhe) und 1 mL der aufzuschließenden Bakteriensuspension in das Reaktionsgefäß gegeben, welches anschließend in eine Schwingmühle (MM 200, Retsch, Haan) eingespannt und 6 min bei 30 Hz geschüttelt wurde. Anschließend wurden die Gefäße 10 min bei 4 °C und 17880 g in einer Tischzentrifuge (Biofuge Stratos, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) zentrifugiert. Der Überstand konnte für weitere Anwendungen verwendet werden.

4.3.7 Zellaufschluss von *Escherichia coli* im Hochdruckhomogenisator

Zellen aus Kultivierungen im 75 L-Bioreaktor wurden mit einem Hochdruckhomogenisator (Ariete, GEA Niro Soavi, Lübeck) aufgeschlossen. Hierzu wurde die Zellsuspension zunächst in einen mit 50 L Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,4) befüllten und auf 4 °C gekühlten 200 L-Edelstahltank überführt. Der Aufschluss erfolgte bei einem Druck von 950 bar und einem Volumenstrom von 300-350 L h⁻¹, welcher nach 15-20 min auf 150 L h⁻¹ gedrosselt wurde. Die Zellbrühe wurde nach der ersten Passage in einem zweiten, auf 4 °C gekühlten 200 L-Edelstahltank gesammelt, auf unter 20 °C gekühlt und in einen dritten, mit 50 L Kaliumphosphatpuffer befüllten und auf 4 °C gekühlten 200 L-Edelstahltank überführt. Anschließend wurde eine zweite Passage durch den Hochdruckhomogenisators nach obiger Beschreibung durchgeführt. Diese Vorgehensweise sollte gewährleisten, dass die Temperatur der Zellbrühe während des Aufschlusses 35 °C nicht übersteigt, da eine Passage durch den Hochdruckhomogenisator zu einer Erwärmung des Mediums um 10–15 °C führte.

Im Anschluss an den Zellaufschluss wurde in einem ersten Schritt Zelldebris mit einem Tellerseparator (CSA 08, GEA Westfalia, Oelde) abgetrennt. Dieser wurde bei einem Volumenstrom von 100 L h⁻¹, einem Gegendruck von 0-3 bar und einem Teilentleerungsintervall des Feststoffauswurfes von 999 s betrieben. Die geklärte Zellbrühe wurde in 10 L-Plastikkanister aliquotiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.3.8 Zellaufschluss von *Escherichia coli* mit Lysozym

Für den enzymatischen Zellaufschluss mit Lysozym wurden in *Deep Well*-Platten pelletierte Zellen in 600 μL Aufschlusspuffer (50 mM KPi, 10 mM MgCl_2 , 70000 U mL^{-1} Lysozym, 50 U mL^{-1} DNaseI) resuspendiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zelldebris durch Zentrifugation (30 min, 3000 g, 4 °C) in einer Standzentrifuge (Rotixa 50 RS, Hettich, Tuttlingen) abgetrennt. Der Überstand wurde für weitere Untersuchungen verwendet.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA wurde mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, München) durchgeführt. Hierzu wurden 5 mL einer LB-Übernachtskultur von *E. coli* nach Herstellerangaben behandelt. Zur Elution der isolierten Plasmid-DNA wurden 100 μL auf 70 °C temperiertes, steriles, doppelt destilliertes Wasser verwendet.

4.4.2 Polymerasekettenreaktion

Polymerasekettenreaktionen (PCR) zur präparativen Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden nach der Methode von Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 1-2,5 μL Templat-DNA, je 0,5 μM Oligonukleotid, je 0,2 mM der Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs) sowie 0,02 U μL^{-1} *Phusion* DNA-Polymerase. Das Temperaturprogramm für die DNA-Amplifikation richtete sich nach den Angaben des Polymerasenherstellers und den Schmelztemperaturen der Oligonukleotide.

4.4.3 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Für die Trennung von DNA-Molekülen wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 1 % Agarose (*w/v*) verwendet. Dabei wurde 1 g Agarose in 100 mL 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, mit 5 μL Ethidiumbromid (≥ 98 %) oder alternativ 5 μL Roti®-GelStain (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt und anschließend in eine Gelkammer (C.B.S. Scientific, San Diego, USA)

gegossen. Die aufzutrennende DNA wurde vor dem Auftragen mit 5x-Agarose-Gelladepuffer nach Sambrook & Russell (2001) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard diente eine 100 bp DNA-Leiter extended (Carl Roth, Karlsruhe). Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 120 V.

4.4.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelextraktion

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, München) verwendet. Hierzu wurde nach Herstellerangaben verfahren. Zur Elution der isolierten DNA-Fragmente wurden 50 µL auf 70 °C temperiertes, steriles, doppelt destilliertes Wasser verwendet.

4.4.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels PCR Clean-Up Kit

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, München) erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Elution der aufgereinigten DNA-Fragmente wurden 50 µL auf 70 °C temperiertes, steriles, doppelt destilliertes Wasser verwendet.

4.4.6 Restriktion mit Endonukleasen

Für die Restriktion von DNA wurden 40–45 µL der zu schneidenden DNA mit 10-20 U der jeweiligen Restriktionsenzyme versetzt und in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit entsprechenden Zusätzen für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Fragmente entweder durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion oder unter Verwendung des PCR Clean-Up Kits aufgereinigt.

4.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden zuvor bereits restringierte und aufgereinigte DNA-Fragmente verwendet. Die Ligation erfolgte unter Verwendung von 12 µL geschnittener Vektor-DNA, 4 µL geschnittener Insert-DNA, 20 U mL⁻¹ T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt) unter Zusatz von 0,5 mM ATP in dem vom Hersteller dafür vorgesehenen Puffer

bei 16 °C. Alternativ wurde die Ligation mit dem Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs, Frankfurt) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden 6 µL geschnittene Vektor-DNA und 3 µL geschnittene Insert-DNA verwendet.

4.4.8 Positionsgerichtete Mutagenese

Positionsgerichtete Mutagenesen an Plasmid-DNA wurden wahlweise mit einer Methode nach Sanchis *et al.* (2008) oder Liu & Naismith (2008) durchgeführt. Sollte eine Sättigungsmutagenese durchgeführt werden, wurden Primer mit degenerierten Codons verwendet.

Im Falle der Methode nach Sanchis *et al.* (2008) bestand der Reaktionsansatz aus 0,4 µL Templat-DNA, je 0,1 µM Oligonukleotid, je 0,2 mM der dNTPs sowie 0,02 U µL⁻¹ *Phusion Hot Start* DNA-Polymerase. Das Temperaturprogramm für die DNA-Amplifikation richtete sich nach der publizierten Methode und wurde lediglich entsprechend den Angaben des Polymerasenherstellers und den Schmelztemperaturen der Oligonukleotide angepasst.

Bei der Methode nach Liu & Naismith (2008) bestand der Reaktionsansatz aus 0,2 µL Templat-DNA, je 1 µM Oligonukleotid, je 0,2 mM der dNTPs sowie 0,02 U µL⁻¹ *Phusion Hot Start* DNA-Polymerase. Das Temperaturprogramm für die DNA-Amplifikation richtete sich nach der publizierten Methode und wurde lediglich entsprechend den Angaben des Polymerasenherstellers und den Schmelztemperaturen der Oligonukleotide angepasst.

Im Anschluss an die Mutagenese-PCR wurde die parentale DNA restringiert, indem zweimal hintereinander jeweils 0,5 U µL⁻¹ *DpnI* zugegeben und im Anschluss 1 h bei 37 °C inkubiert wurde.

4.4.9 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen

Für die Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurde eine 100 mL-LB-Flüssigkultur im exponentiellen Wachstumsstadium (OD 0,5) in 50 mL-Reaktionsgefäße überführt und durch Zentrifugation (3220 g, 4 °C, 10 min) pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 40 mL eiskühlem TFB1-Medium resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation (3220 g, 4 °C,

10 min) pelletiert, der Überstand verworfen, die Zellen mit 4 mL eisgekühltem TFB2-Medium resuspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µL-Aliquots in sterile 1,5 mL-Reaktionsgefäße gegeben und bei -80 °C eingefroren.

Für die Transformation wurde jeweils ein Aliquot aufgetaut, mit 1-10 µL DNA-Lösung versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C, 1:30 min) im Thermomixer (RiO, QUANTIFOIL Instruments, Jena) wurden die Zellen erneut 1-2 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden 600 µL steriles LB-Medium zugegeben und im Thermomixer weitere 45 min bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Nach einer milden Zentrifugation (3000 rpm, 1 min) wurde der Überstand bis auf 50–100 µL verworfen, das Pellet im verbliebenen Überstand resuspendiert und auf entsprechende Agar-Platten ausplattiert. Diese wurden anschließend im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.4.10 Herstellung und Transformation elektrokompenter Zellen

Für die Herstellung von elektrokompenten *E. coli*-Zellen wurde eine 200 mL-LB-Flüssigkultur im exponentiellen Wachstumsstadium (OD 0,5) in eisgekühlte 50 mL-Reaktionsgefäße überführt, 20 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation (4000 g, 4 °C, 15 min) pelletiert. Die Zellen wurden anschließend dreifach gewaschen, indem das Pellet nachfolgend in 200 mL, 100 mL und 8 mL eisgekühlter 10 %-iger Glycerinlösung (v/v) resuspendiert und erneut durch Zentrifugation (6000 g, 4 °C, 15 min) pelletiert wurden. Im Anschluss wurden die Zellen auf ein Gesamtvolumen von 0,4–0,8 mL mit eisgekühltem 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert und in Aliquots à 20 µL in eisgekühlten, sterilen 1,5 mL-Reaktionsgefäßen abgefüllt und bei -80 °C eingefroren.

Für die Transformation wurden die Zellen mit 2-10 µL entsalzter DNA-Lösung versetzt und in Elektroporationsküvetten mit 1-2 mm Elektrodenabstand nach Herstellerprotokoll des Elektroporators (Gene Pulser Xcell™, Bio-Rad, München.) elektroporiert. Anschließend wurden sofort 1 mL LB-Medium zu den Zellen gegeben, die Suspension in sterile 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und 60 min bei 37 °C und 600 rpm im Thermomixer (RiO, QUANTIFOIL Instruments, Jena) inkubiert. Nach einer milden Zentrifugation (3000 rpm, 1 min) wurde der Überstand bis auf 50–100 µL verworfen, das Pellet im verbliebenen Überstand resuspendiert

und auf entsprechende Agar-Platten ausplattiert. Diese wurden anschließend im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.4.11 Kolonie-Polymerasekettenreaktion

Präparative Kolonie-Polymerasekettenreaktionen (Kolonie-PCR) wurden durchgeführt, um das Gen für die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis* zu isolieren. Die Vorgehensweise entspricht der in Abschnitt 4.4.2 angegebenen, mit der Abwandlung, dass anstelle von Templat-DNA ein Bakterienabstrich von einer auf Agarplatten kultivierten Einzelkolonie zum Reaktionsansatz zugegeben wurde.

Analytische Kolonie-PCR dienten zur Kontrolle einer korrekt erfolgten Ligation. Auch hierbei diente ein Abstrich einer einzelnen Bakterienkolonie als Templat. Primer für die Kolonie-PCR wurden so gewählt, dass diese an der Ziel-DNA mit zur Insertionsstelle flankierenden Regionen hybridisieren, so dass anhand der Länge des Amplifikats abgeschätzt werden kann, ob die Insertion erfolgreich war. Der Reaktionsansatz bestand aus je 0,5 µM Oligonukleotid, je 0,2 mM der dNTPs sowie 0,05 U µL⁻¹ Taq DNA-Polymerase. Das Temperaturprogramm für die DNA-Amplifikation richtete sich nach den Angaben des Polymerasenherstellers und den Schmelztemperaturen der Oligonukleotide.

4.4.12 Spezifische Ausschaltung chromosomaler Gene

Die spezifische Ausschaltung der chromosomalen 7α-HSDH in *E. coli* erfolgte mit Hilfe des Kits TargeTron™ Gene Knockout System von Sigma Aldrich (München). Das für die Ausschaltung benötigte Plasmid pMB13 lag zu Beginn der Arbeit bereits vor und dessen Herstellung ist in Braun (2011) beschrieben. Dieses Plasmid wurde in chemisch kompetente *E. coli* transformiert und das Ausschalten des Zielgens nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch Selektion auf LB-Agarplatten mit Kanamycin sowie Kolonie-PCR konnte das erfolgreiche Ausschalten nachgewiesen werden. Um das im Bakterium verbliebene Plasmid zu entfernen, wurde eine Über-Nacht-Kultur der Zellen in LB-Medium mit Kanamycin (50 mg L⁻¹) und Novobiocin (62 mg L⁻¹) bei 37 °C angesetzt. Anschließend wurde die Kultur auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Vorhandensein des zu entfer-

nenden Plasmids wurde untersucht, indem einzelne Kolonien auf Chloramphenicol-Sensitivität untersucht werden. Dies erfolgte in paralleler Über-Nacht-Kultivierung bei 37 °C in LB-Medium, einmal unter Zugabe von 33 mg L⁻¹ Chloramphenicol, einmal ohne dessen Zugabe.

4.4.13 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden entweder bei GATC Biotech (Konstanz) oder Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben entsprachen den jeweiligen Angaben des Dienstleisters.

4.5 Proteinchemische Methoden

4.5.1 Aufreinigung von Proteinen im mL-Maßstab

Die Aufreinigung der Proteine im mL-Maßstab erfolgte nach dem Prinzip der Immobilisierten Metallaffinitätschromatographie (IMAC). Das Trennprinzip beruht auf der spezifischen Wechselwirkung matrixgebundener Metallliganden mit Histidinresten am aufzureinigenden Zielprotein. Zu diesem Zweck wird bei der Expression des Zielproteins ein His₆-Anker entweder N- oder C-terminal fusioniert.

Für die Aufreinigung an der *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)-Anlage wurden HisTrap-Säulen (1 mL oder 5 mL Säulenvolumen) verwendet, deren Agarosematrix mit Ni²⁺-Ionen beladen war. Die Flussraten der mobilen Phase wurden jeweils auf ein Säulenvolumen (CV) pro Minute eingestellt. Die Proteinkonzentration im Eluatstrom konnte hierbei über die UV-Extinktion bei 280 nm verfolgt werden. Zunächst wurden die Säulen mit mindestens 5 CV Bindepuffer äquilibriert, anschließend erfolgte die Auftragung der Proben. Danach erfolgte das Waschen der Säule mit Bindepuffer zur Entfernung nicht spezifisch bindender Fremdproteine. Das Waschen wurde so lange durchgeführt, bis wieder eine Basislinie des UV-Signals erreicht wurde. Die Elution des Zielproteins wurde durch einen von 0 % auf 100 % über 20 min linear ansteigenden Elutionspuffergradienten erreicht, wobei Eluatfraktionen von jeweils 2 CV gesammelt wurden. Die Fraktionen, die das Zielprotein enthalten, können über das UV-Signal identifiziert werden. Anschließend wurde die Säule nochmal mit 10 CV Elutionspuffer nach-

gewaschen. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden anschließend über Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren (Ausschlussgröße 10 kDa) aufkonzentriert und durch dreimaliges Auffüllen und Aufkonzentrieren mit dem Zielpuffer umgepuffert. Der Zielpuffer entsprach in der Regel dem für die weitere Verwendung des Proteins benötigten Reaktionspuffer.

Für die Aufreinigung mit Zentrifugaleinheiten wurden HisPur™Ni-NTA Resin Spin Columns (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) mit einem Bettvolumen von 3 mL verwendet. Die Vorgehensweise entsprach dabei den Herstellerangaben. Die Aufkonzentrierung und Umpufferung entsprach der zuvor beschriebenen Durchführung.

4.5.2 Aufreinigung von Proteinen im L-Maßstab

Die Aufreinigung von Proteinen im L-Maßstab erfolgte ebenfalls auf Basis der IMAC. Hierfür wurde eine Chromatographie-Säule mit 600 mL-Volumen und einem Durchmesser von 50 mm verwendet, die mit Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Schweden) befüllt wurde.

Vor dem Packen wurde das in 20 % Ethanol gelagerte Säulenmaterial durch dreimaliges Dekantieren, Wiederauffüllen mit Wasser, Aufschlänmen und Sedimentieren gewaschen. Anschließend wurde das aufgeschlänmte Medium in die leere Säule gegeben und die Säule bei einer maximalen Flussrate von 150 mL min^{-1} und einem maximalen Druck von 1,5 bar gepackt. Die fertig gepackte Säule wurde danach mit 5 CV Bindepuffer bei einem maximalen Druck von 1,2 bar äquilibriert.

Die aufzutragende Probe wurde nach dem Auftauen zunächst mit 500 mM NaCl versetzt und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend erfolgte eine Querstromfiltration mit zwei Sartocoon® Slice Hydrosart® Filterkassetten (0,2 µm Ausschlussgröße, je 0,1 m² Filterfläche, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) mit in Reihe geschaltetem Sterilfilter (0,2 µm Ausschlussgröße), um die Probe zu klären. Die Proben wurden danach mit einem maximalen Druck von 1,2 bar entgegen der Elutionsrichtung auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule in Elutionsrichtung mit Bindepuffer gewaschen, bis das UV-Signal des Eluatstroms wieder eine Basislinie anzeigt. Die Elution des Proteins erfolgte über einen von 0 % bis 100 % über 180 min linear ansteigenden Elutionspuffergradienten, wobei Fraktionen von jeweils 2 L gesamt-

melt wurden. Durch das UV-Signal des Detektors konnten die Fraktionen identifiziert werden, die das Zielprotein enthalten. Diese Fraktionen wurden im Anschluss mittels Querstromfiltration mit zwei Sartocoon[®] Slice Hydrosart[®] Filterkassetten (10 kDa Ausschlussgröße, je 0,1 m² Filterfläche, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) zunächst aufkonzentriert und anschließend durch Diafiltration mit 5-10-fachem Austauschvolumen an Zielpuffer umgepuffert.

4.5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte mittels einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit 12,5 %-igem Trenn- und 3 %-igem Sammelgel (Laemmli, 1970; Fling & Gregerson, 1986). Für das Trenngel wurde 17,5 mL destilliertes Wasser mit 10 mL Trenngelpuffer (4x) und 12,5 mL Acrylamid (40 %) vermischt und die Polymerisation mit 100 µL Ammoniumpersulfat (APS, 10 %) und 10 µL Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestartet. Die Zusammensetzung des Sammelgels besteht aus 15 mL destilliertem Wasser, 20 mL Sammelgelpuffer (2x), 5 mL Acrylamid (40 %), 100 µL APS und 10 µL TEMED.

Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden diese auf das Gel aufgetragen, als Größenstandard diente Roti[®] -Mark Standard (14-212 kDa, Carl Roth, Karlsruhe). Die Elektrophorese erfolgte in einer Elektrophoresekammer (PEQLAB, Erlangen) mit Rotiphorese[®] SDS-PAGE (Carl Roth, Karlsruhe) als Laufmittel bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel. Zur Färbung der Proteinbanden wurde Roti[®] -Blue-Färbelösung (Carl Roth, Karlsruhe) gemäß Herstellerangaben verwendet.

4.5.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)

Gesamtproteinkonzentrationen wurden mit dem Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) nach Herstellerangaben gemessen. Als Proteinstandard diente ein im Kit enthaltener Standard aus Bovinem Serumalbumin (BSA).

4.5.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten im Mikrotiterplattenphotometer

Enzymaktivitätsbestimmungen wurden im Mikrotiterplattenphotometer mit einem Probenvolumen von 250 μL bei 30 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt, bei der die Änderung der NAD(P)H-Konzentration ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ nm}$ verfolgt wurde. Die Aktivitäten wurden hierbei durch lineare Regression im linear verlaufenden Teil der Reaktion ermittelt. Dabei wurde die zu untersuchende Probe mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) entsprechend verdünnt und mit Substrat und Kofaktor versetzt. Die Endkonzentrationen an Substrat und Kofaktor waren für 7β -HSDH 10 mM DHCA und 100 μM NADPH, für 3α -HSDH 10 mM DHCA und 100 μM NADH, für FDH 100 mM Natriumformiat und 250 μM NAD(P) und für GDH 200 mM Glucose und 1000 μM NAD(P). Sämtliche Substrate und Kofaktoren waren in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) gelöst. Sämtliche Messungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt, anschließend wurde der Mittelwert ermittelt.

Bei der Bestimmung der *Artificial Units* (AU) für die mechanistische Modellierung der multienzymatischen Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA wurde das Protokoll zur Enzymaktivitätsbestimmung modifiziert. Hierbei diente als Reaktionspuffer ein Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,0), dem 20 % (v/v) Glycerin, 0,6 % (w/v) BSA und 0,006 % (v/v) Antifoam 204 (Sigma-Aldrich, München) beigemischt wurde. Die Konzentrationen an Substrat und Kofaktor war 500 μM DHCA und 200 μM NADH für 3α -HSDH, 500 μM DHCA und 200 μM NADPH für 7β -HSDH sowie 200 mM Glucose und 1000 μM NAD für GDH. Die Enzyme wurden in Verdünnungen eingesetzt, bei denen die gemessene anfängliche Extinktionsveränderung bei der GDH im Bereich 0,0005 – 0,0020 s^{-1} und bei den HSDH 0,00025 – 0,00100 s^{-1} betrug. Sämtliche Messungen wurden im Achtfachansatz durchgeführt, anschließend wurde der 25 % gestutzte Mittelwert ermittelt. Ein AU wird hierbei als die Menge an aktivem Enzym definiert, die unter diesen genannten Reaktionsbedingungen die Umsetzung von 1 μmol Substrat bzw. Kofaktor innerhalb von 1 min katalysiert.

4.5.6 Bestimmung von Enzymkinetiken und Enzymmechanismen

Die Bestimmung von Enzymkinetiken der 7β -HSDH erfolgte mit nach Abschnitt 4.5.1 aufgereinigten Enzymen. Dabei entsprach die Vorgehensweise im Wesentlichen der unter Abschnitt

4.5.5 beschriebenen, allerdings wurden hierbei die Konzentrationen an Substrat und Kofaktor variiert. Für die Bestimmung von DHCA-Kinetiken NADPH-abhängiger 7β -HSDH wurde eine konstante NADPH-Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ eingesetzt, während eine geometrische 7:10-Verdünnungsreihe der DHCA mit einer Maximalkonzentration von $7\ \text{mM}$ und einer Minimalkonzentration von $5,6\ \mu\text{M}$ DHCA verwendet wurde. Bei NADH-abhängigen Mutanten wurde ein verringertes Reaktionsvolumen von $100\ \mu\text{L}$ verwendet. Dabei betrug die konstante NADH-Konzentration $500\ \mu\text{M}$, während eine geometrische 6:10-Verdünnungsreihe mit einer Maximalkonzentration von $10\ \text{mM}$ und einer Minimalkonzentration von $36\ \mu\text{M}$ DHCA eingesetzt wurde. NADPH-Kinetiken wurden ebenfalls bei $100\ \mu\text{L}$ Reaktionsvolumen und bei einer konstanten DHCA-Konzentration von $0,5\ \text{mM}$ aufgezeichnet, während eine geometrische 7:10-Verdünnungsreihe von maximal $500\ \mu\text{M}$ und minimal $2,4\ \mu\text{M}$ NADPH verwendet wurde. Bei NADH-Kinetiken wurden erneut $100\ \mu\text{L}$ Reaktionsvolumen verwendet. Hierbei wurden konstant $10\ \text{mM}$ DHCA und eine geometrische 7:10-Verdünnungsreihe von NADH mit einer Maximalkonzentration von $500\ \mu\text{M}$ und einer Minimalkonzentration von $2,4\ \mu\text{M}$ eingesetzt. Sämtliche Kinetikmessungen mit NADPH wurden im Dreifach-, mit NADH im Vierfachansatz durchgeführt. Die Ermittlung der kinetischen Parameter erfolgte durch nichtlineare Regression mit MATLAB, dabei wurde das Michaelis-Menten-Modell, wahlweise mit der Erweiterung für Substratinhibition, verwendet.

Für die Bestimmung von Enzymmechanismen der 3α -HSDH und 7β -HSDH wurden Enzyme verwendet, die wie unter Abschnitt 4.5.2 aufgereinigt wurden. Hierbei wurden Sättigungskinetiken für die jeweiligen Kofaktoren bei verschiedenen konstanten DHCA-Konzentrationen aufgezeichnet. Anders als zuvor beschrieben, waren alle Enzyme und Reaktanden in Kaliumphosphatpuffer ($100\ \text{mM}$, $\text{pH } 7,0$) gelöst. Für die Kofaktoren wurden geometrische Verdünnungsreihen mit jeweiliger 7:10-Verdünnung verwendet, bei der die Maximalkonzentration $500\ \mu\text{M}$ und die Minimalkonzentration $2,4\ \mu\text{M}$ beträgt. Die konstanten DHCA-Konzentrationen waren für die 3α -HSDH $100\ \mu\text{M}$, $200\ \mu\text{M}$, $300\ \mu\text{M}$, $600\ \mu\text{M}$ und $1250\ \mu\text{M}$; für die 7β -HSDH waren es $100\ \mu\text{M}$, $150\ \mu\text{M}$, $200\ \mu\text{M}$, $300\ \mu\text{M}$, $400\ \mu\text{M}$ und $1000\ \mu\text{M}$. Sämtliche Messungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Für jede DHCA-Konzentration wurde eine NAD(P)H-Kinetik ermittelt, bei der die kinetischen Parameter K_m und v_{max} durch nichtlineare Regression mit Hilfe von MATLAB abgeschätzt wurden. Die kinetischen Kurven der Messungen bei verschiedenen DHCA-Konzentrationen wurden anschließend in der doppelt reziproken

Darstellung (Lineweaver & Burk, 1934) gemeinsam aufgetragen, um anhand deren Musters den Mechanismus des Enzyms zu bestimmen.

4.5.7 Aufzeichnung von Verlaufskurven für die mechanistische Modellierung

Verlaufskurven für die mechanistische Modellierung der multienzymatischen Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA wurden für jedes Enzym gesondert aufgezeichnet. Die Reaktionen fanden in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen statt. Als Reaktionspuffer diente ein Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,0), dem 20 % (v/v) Glycerin, 0,6 % (w/v) BSA und 0,006 % (v/v) Antifoam 204 (Sigma-Aldrich, München) beigemischt wurde. Für die GDH wurden für NAD und NADP jeweils 18 verschiedene Reaktionsbedingungen untersucht, die in Tabelle 4.3 aufgelistet sind, für die beiden HSDH wurden jeweils 40 verschiedene Reaktionsbedingungen untersucht, die in Tabelle 4.4 aufgelistet sind. Die eingesetzten Mengen an Enzym wurden, wie im Abschnitt 4.5.5 beschrieben, parallel zur Verlaufskurvenaufzeichnung auf derselben Mikrotiterplatte ermittelt. Die Messungen wurden über einen Zeitraum von 25 min mit einer Abtastzeit von 15 s durchgeführt. Die Messungen für die 3 α -HSDH und 7 β -HSDH erfolgten als Duplikatansätze, die der GDH als Triplikatansätze.

Tabelle 4.3: Reaktionsbedingungen für die Aufzeichnung von GDH-Verlaufskurven. Reaktionen wurden sowohl mit NAD als auch mit NADP als Kofaktor durchgeführt.

Ansatz	NAD(P), mM	Glucose, mM	Ansatz	NAD(P), mM	Glucose, mM
1	0,01	1	10	0,3	3
2	0,01	10	11	0,3	30
3	0,01	100	12	0,3	300
4	0,03	3	13	1	1
5	0,03	30	14	1	10
6	0,03	300	15	1	100
7	0,1	1	16	3	3
8	0,1	10	17	3	30
9	0,1	100	18	3	300

Tabelle 4.4: Reaktionsbedingungen für die Aufzeichnung von HSDH-Verlaufskurven. Für die 3 α -HSDH wurden als Kofaktoren NAD und NADH und als Gallensalze DHCA und 7,12-Diketo-UDCA eingesetzt, für die 7 β -HSDH als Kofaktoren NADP und NADPH sowie als Gallensalze DHCA und 3,12-Diketo-UDCA.

Ansatz	NAD(P)H, mM	NAD(P), mM	DHCA, mM	3,12-Diketo-UDCA/ 7,12-Diketo-UDCA, mM
1	0	0,025	0	0,1
2	0	0,025	0	3
3	0	0,25	0	0,1
4	0	0,25	0	3
5	0	0,1	0	0,3
6	0	0,1	0	1
7	0,025	0	0,1	0
8	0,025	0	3	0
9	0,25	0	0,1	0
10	0,25	0	3	0
11	0,1	0	0,3	0
12	0,1	0	1	0
13	0,025	0,025	0	0,1
14	0,25	0,025	0	0,1
15	0,025	0,25	0	3
16	0,25	0,25	0	3
17	0,1	0,1	0	0,3
18	0,025	0,025	0,1	0
19	0,025	0,25	0,1	0
20	0,25	0,025	3	0
21	0,25	0,25	3	0
22	0,1	0,1	0,3	0
23	0	0,025	0,3	0,1
24	0	0,025	3	0,1
25	0	0,25	0,3	3
26	0	0,25	3	3
27	0	0,1	1	0,3
28	0,025	0	0,1	0,3
29	0,025	0	0,1	3
30	0,25	0	3	0,3
31	0,25	0	3	3
32	0,1	0	0,3	1
33	0,025	0,025	0,1	0,1
34	0,025	0,25	0,1	3
35	0,25	0,025	0,1	3
36	0,25	0,25	0,1	0,1
37	0,025	0,025	3	3
38	0,025	0,25	3	0,1
39	0,25	0,025	3	0,1
40	0,25	0,25	3	3

4.6 Analytische Methoden

4.6.1 Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen

Die optische Dichte von *E. coli*-Suspensionen wurde in einem Küvettenphotometer in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm gemessen. Die Bakteriensuspension wurde gegebenenfalls mit entsprechendem Medium oder Puffer verdünnt, so dass die gemessene Extinktion 0,5 nicht überstieg.

4.6.2 Bestimmung der Biotrockenmassenkonzentration von Bakteriensuspensionen

Die Bestimmung der Biotrockenmassenkonzentration erfolgte gravimetrisch, sofern nicht anders angegeben. Hierzu wurde 1 mL der entsprechenden Bakteriensuspension in vorgetrocknete und vorgewogene 1,5 mL-Reaktionsgefäße gegeben, anschließend wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm 10 min bei Raumtemperatur pelletiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Gefäße bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und erneut gewogen. Die Biotrockenmassenkonzentration konnte anschließend mittels Gleichung 4.2 berechnet werden.

$$c_X = \frac{m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}}}{V} \quad (4.2)$$

mit:

- c_X Biotrockenmassenkonzentration, $g_{BTM} L^{-1}$
- m_{voll} Masse des mit Probenmaterial gefüllten Reaktionsgefäßes nach der Trocknung, g
- m_{leer} Masse des leeren Reaktionsgefäßes nach der Trocknung, g
- V Volumen der Zellsuspension vor der Sedimentation, L

4.6.3 Photometrische Bestimmung von Kofaktorkonzentrationen

Konzentrationen von NAD(P) und NADP(H) wurden photometrisch in einem Küvettenphotometer nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz bestimmt. Hierzu wurde eine

Quarzküvette (Hellma Analytics, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet, die mit 1 mL Probe gefüllt war. Die Bestimmung der NAD(P)-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 259$ nm durchgeführt, wobei der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{259 \text{ nm}} = 16,9 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ betrug. Die Konzentrationen von NAD(P)H wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm bestimmt, hierbei betrug der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,22 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.6.4 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die qualitative und quantitative Analytik von Gallensalzen erfolgte durch eine Auftrennung der Substanzen mittels HPLC. Hierzu wurde das HPLC-System Finnigan Surveyor Plus (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) mit einer Umkehrphasen-Chromatographiesäule des Typs Hibar[®] 125-4 RP-18e (5 μm) (Merck, Darmstadt) verwendet. Als mobile Phase diente ein Laufmittelgemisch aus phosphorsaurem Wasser (pH 2,6) und Acetonitril, wobei für die Auftrennung ein Laufmittelgradient verwendet wurde. Die Flussrate der mobilen Phase beträgt 1 mL min^{-1} und es wurden jeweils 20 μL Probe injiziert. Detektiert werden die Gallensalze mittels UV-Extinktion bei $\lambda = 200$ nm. Kalibriert wurde die Methode mit Referenzsubstanzen nach gängigen Methoden. Das Gradientenprofil war wie folgt:

0–3 min: konstanter Anteil an Acetonitril von 35 % (v/v), 3–7 min: lineare Zunahme des Acetonitrilanteils auf 39 % (v/v), 7–8 min: lineare Zunahme des Acetonitrilanteils auf 70 % (v/v), 8–9,5 min: konstanter Anteil an Acetonitril von 70 % (v/v), 9,5–10,5 min: lineare Abnahme des Acetonitrilanteils auf 35 % (v/v), 10,5–14 min: konstanter Anteil an Acetonitril von 35 % (v/v).

4.6.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence-activated cell sorting*, FACS) wurde verwendet, um die Zellintegrität von Ganzzellbiokatalysatoren zu untersuchen. Hierzu wurden die Zellen mit PBS auf eine Partikeldichte von ca. 10^9 mL^{-1} verdünnt, was bei einer Flussrate von 1 mL s^{-1} 1000 Signalen s^{-1} entspricht. Diese Zellen wurden mit 0,75 mM des Farbstoffs bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)-Trimethinoxonol (Dibac₄[3]) versetzt, welcher depolarisierte Zellmembranen überwindet und durch Bindung an intrazelluläre Proteine und Membranen eine ge-

steigerte Fluoreszenz erzeugt. Durch Auftragung der Dibac₄[3]-vermittelten Fluoreszenz gegen die Lichtstreuung der Partikel, welche ein Indikator für die Partikelgröße ist, konnten Hinweise auf die Zellintegrität bezogen werden (Suller & Lloyd, 1999; Langemann *et al.*, 2010).

4.7 Stereoselektive Reduktion von Dehydrocholsäure

4.7.1 Satz-Reduktion im 2 mL-Maßstab

Satz-Reduktionen im 2 mL-Maßstab wurden für die mechanistische Modellierung der multi-enzymatischen Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA als Validierungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden *Deep Well*-Platten mit quadratischen Vertiefungsöffnungen und V-förmigen Boden mit einem Nennvolumen von 2,0 mL pro Vertiefung verwendet. Zur Durchmischung wurden die Deep-Well-Platte auf einem Laborschüttler bei 500 rpm geschüttelt. Um Temperaturkonstanz zu gewährleisten, befand sich der gesamte Aufbau in einem auf 30 °C temperierten Inkubationsschrank. Die Reaktionsgemische, bestehend aus DHCA, NAD, NADP, 3 α -HSDH, 7 β -HSDH und GDH lagen in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,0) mit Zusatz von 0,6 % ((w)/v) BSA vor und wurden direkt in den Vertiefungen angesetzt. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von Glucoselösung und anschließendem dreimaligen Invertieren der Deep-Well-Platte. Verwendet wurden Enzyme, die gemäß Abschnitt 4.5.2 aufgereinigt wurden. Die Probenahme erfolgte halbstündlich durch Entnahme von 100 μ L Reaktionsansatz, welcher direkt mit 900 μ L Methanol (77 %, v/v) versetzt wurde. Die mit Methanol versetzten Proben wurden anschließend durch Vortexen vermischt und 10 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde danach mittels HPLC analysiert. Sämtliche Reaktionen wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

4.7.2 Satz-Reduktion im 20 mL-Maßstab

Stereoselektive Reduktionen von DHCA im 20 mL-Maßstab erfolgten in Enghals-Schraubverschlussflaschen (DURAN Group, Wertheim/Main) mit einem Nennvolumen von 50 mL, einem Innendurchmesser von 41 mm und einem GL32-Schraubverschlussgewinde. Für die Durchmischung sorgte ein kreuzförmiger Magnetprüher bei 450 rpm, der von einer Mehrfachrührplatte

(Variomag Multipoint, Thermo Scientific, Waltham, USA) angetrieben wurde. Um Temperaturkonstanz zu gewährleisten, befand sich der gesamte Aufbau in einem temperierten Inkubationsschrank. Für die Reaktionsansätze wurde das Substrat DHCA zunächst mit äquimolarer Menge an NaOH vorgelöst. Der Reaktionsansatz, bestehend aus DHCA, Kosubstrat (Glucose oder Formiat), und gegebenenfalls weiteren Zusätzen wie NAD(P), Glycerin, MgCl_2 wurde vor Beginn der Reaktion zusammengemischt. Als Puffer diente Kaliumphosphat (50 mM) und der pH wurde wahlweise mit Natronlauge, Phosphorsäure oder Ameisensäure (jeweils 5 M) auf den gewünschten Wert eingestellt. Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe von Ganzzellbiokatalysatoren. Während der Reaktion wurde der pH in 30-minütigen Abständen mit einem Hand-pH-Meter (pH-Tester Checker[®], Carl Roth, Karlsruhe) gemessen und gegebenenfalls mit Natronlauge, Phosphorsäure oder Ameisensäure (jeweils 5 M) auf den Ausgangswert eingestellt. Die Probenahme erfolgte in Abständen von 30 oder 60 Minuten, indem 300 μL Reaktionsansatz entnommen und mit 700 μL Methanol ($\geq 99,9\%$) vermischt wurden. Anschließend wurde das Proben-Methanol-Gemisch 3:10 mit 70 %-igem Methanol (v/v) verdünnt und 10 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Vom Überstand wurde eine Probe entnommen und 1:10 mit Methanol (70 %, v/v) verdünnt, in Probengläser gegeben und mittels HPLC analysiert. Sämtliche Reaktionen erfolgten im Dreifachansatz.

Für die Versuche in Kapitel 6 kamen, soweit nicht anders erwähnt, jeweils OD 20 Zellen, 100 mM DHCA und 500 – 750 mM Natriumformiat bzw. 500 mM Glucose zum Einsatz. Der pH betrug 6,5 und wurde im weiteren Verlauf der Biotransformation nicht geregelt. Die Versuche in Kapitel 7 wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit 70 mM DHCA, 350 mM Glucose, 10 mM MgCl_2 , 50 μM NADP, 10 μM NAD bei pH 7,0 durchgeführt, wobei der pH manuell geregelt wurde. Abweichend davon kamen in Abschnitt 7.4 200 mM Glucose, 5 mM MgCl_2 und zusätzlich 4 % (v/v) Glycerin zum Einsatz.

4.7.3 Satz-Reduktion im 1 L-Maßstab

Stereoselektive Reduktionen von DHCA im 1 L-Maßstab erfolgten in einem 1,5 L Rührkesselreaktor der Firma Infors AG (Infors 3, Bottmingen, Schweiz) ohne Strömungsbrecher. Der Reaktor war mit Sonden für Temperatur und pH ausgestattet, so dass diese Parameter von einer Steuerungseinheit online abgelesen und gegebenenfalls ge-

regelt werden konnten. Temperiert wurde der Reaktor über einen an die Steuerungseinheit angeschlossenen Doppelmantel und die Durchmischung erfolgte durch zwei Sechsstab-Scheibenrührer bei 500 – 1000 rpm, die über einen Motor am Deckel des Reaktors angetrieben wurden. Zudem konnte über Zulaufpumpen Säure (Phosphorsäure, 5 M) oder Base (Natronlauge, 5 M) zur pH-Regulation in den Reaktor zugegeben werden. Das Substrat DHCA wurde entweder in äquimolarer Natronlauge vorgelöst oder direkt als freie Säure in Pulverform zugegeben. Sämtliche weitere Bestandteile wurden ebenfalls entweder als Feststoff oder als Stammlösung zugegeben. Nach Auffüllen auf das entsprechende Volumen und der Einstellung des gewünschten pH wurde die Reaktion mittels Zugabe von Ganzzellbiokatalysatoren gestartet. Die Probenahme erfolgte im Abstand von 30 oder 60 min wie unter Abschnitt 4.7.2 beschrieben.

4.7.4 Präparative Darstellung von Monoketo- und Diketo-Gallensalzen

Für die mechanistische Modellierung der multienzymatischen Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA wurden die Gallensalze 3,12-Diketo-UDCA, 7,12-Diketo-UDCCA und 12-Keto-UDCA in Mengen benötigt, die nicht kommerziell zu beziehen waren. Aus dem Grund mussten diese selber synthetisiert werden. Die präparative Darstellung von Monoketo- und Diketo-Gallensalzen erfolgte im L-Maßstab mit gleichem Aufbau wie unter Abschnitt 4.7.3 beschrieben, allerdings wurden isolierte Enzyme anstelle von Ganzzellbiokatalysatoren verwendet, die nach Abschnitt 4.5.2 aufgereinigt wurden. Die Reaktionsgemische bestanden aus 70 mM DHCA, 200 mM Glucose, 1 mM MgCl_2 und 50 mM Kaliumphosphat. Die Temperatur wurde auf 30 °C und der pH auf 7,0 geregelt. Für die Darstellung von 3,12-Diketo-UDCA wurde zudem 20 μM NADP, 2,2 kU L^{-1} 7 β -HSDH sowie 1,2 kU L^{-1} GDH zugesetzt; für die Darstellung von 7,12-diketo-UDCA bestand der Zusatz aus 100 μM NAD, 1,8 kU L^{-1} 3 α -HSDH und 1,6 kU L^{-1} GDH. Bei der Darstellung von 12-Keto-UDCA wurden je 100 μM NAD und NADP, 1,8 kU L^{-1} 3 α -HSDH, 2,3 kU L^{-1} 7 β -HSDH sowie 2,1 kU L^{-1} (NAD) GDH zugegeben. Die Probenahme erfolgte wie unter Abschnitt 4.7.2 beschrieben. Der Fortschritt der Reaktion wurde während des Prozesses mittels HPLC verfolgt. Der Abbruch erfolgte 1 h nachdem keine anderen Gallensalze als das gewünschte Produkt nachzuweisen waren. Das Gallensalz wurde anschließend, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, isoliert.

4.7.5 Isolation von Gallensalzen durch Säurepräzipitation

Die Isolation von Gallensalzen beruht auf der geringen Löslichkeit von Gallensalzen in ihrer protonierten Form bei saurem pH. Hierzu wird ein Gemisch mit gelösten Gallensalzen im gerührten Zustand mit Salzsäure (6 M) tröpfchenweise auf $\text{pH} \leq 2,0$ titriert. Die gelösten Gallensalze fallen hierbei nahezu vollständig als Feststoff aus. Dieser wurde anschließend mit Hilfe eines Büchnertrichters mit eingesetztem Filterpapier (\varnothing 150 mm, Rückhaltebereich $\geq 4 \mu\text{m}$) von der restlichen Lösung getrennt. Bei Bedarf konnte das Gallensalz gewaschen werden, indem es in Reinstwasser gegeben und durch Titration mit Natronlauge (5 M) auf $\text{pH} 8 - 9$ gelöst, mit dem Büchnertrichter filtriert und anschließend wieder durch Säurepräzipitation isoliert wurde. Für die Darstellung von 7,12-Diketo-UDCA und 12-Keto-UDCA erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang, für die Darstellung von 3,12-Diketo-UDCA erfolgte der Waschvorgang einmal. Anschließend wurde das isolierte Gallensalz bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

4.8 Statistische und computerbasierte Methoden

4.8.1 Bioinformatische Methoden

Sequenzanalysen von DNA-Sequenzen wie das Auffinden von Restriktionsschnittstellen, Erstellung paarweiser Sequenzalignments, simulierte PCR, Restriktionsverdau und Ligation wurden mit den Programmen SerialCloner (Serial Basics, Paris, Frankreich) und ApE (The University of Utah, Salt Lake City, USA) durchgeführt. Datenbanksuchen von DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1990). Für die Homologie-Modellierung von Proteinstrukturen wurden zunächst Alignments mit HHpred erstellt (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred#>, Söding 2005; Söding *et al.* 2005), die Erzeugung der Tertiärstruktur erfolgte mit dem Tool MODELLER (UCSF, San Francisco, USA, Sali & Blundell 1993). Für Proteinstrukturvisualisierung und -alignment wurde das Programm Chimera verwendet (UCSF, San Francisco, USA, Pettersen *et al.* 2004).

4.8.2 Statistische Versuchsplanung

Für die empirische Modellierung der Ganzzellbiokatalyse wurden Bedingungen der Einzelversuche nach dem Prinzip der statistischen Versuchsplanung ausgewählt. Hintergrund dessen war, dass die Einflüsse mehrerer Faktoren in einer Versuchsreihe simultan untersucht und somit simultan variiert werden sollten. In der vorliegenden Arbeit wurden *Full Factorial Designs*, *Fractional Factorial Designs* und dreidimensionale *Central Composite Designs* des Typs *circumscribed* gewählt (Montgomery, 2009).

Für eine Durchmusterung verschiedener Reaktionszusätze in Abschnitt 6.1.4 wurde ein 2^{8-4} *Fractional Factorial Design* verwendet, womit sich mit wenigen Experimenten viele Einflussfaktoren untersuchen lassen. Die Codierung ist in Tabelle 4.5 gezeigt, die Bedeutung der jeweiligen Codierung in Tabelle 4.6.

Ein *Central Composite Designs* des Typs *circumscribed* wurde für die Erstellung empirischer Modelle genutzt, da es eine gute Modellierung des gesamten Designraums ermöglicht (Box & Wilson, 1951). Bei diesem Design liegt ein Datenpunkt im Zentrum des Designraums. Zusätzlich liegen acht Datenpunkte an dessen Ecken (*Factorial Points*). Der Abstand dieser *Factorial Points* vom Zentrum beträgt ± 1 Einheit für jeden Faktor. Darüber hinaus sind sechs weitere Datenpunkte vom Zentrum aus gesehen in den axialen Richtungen außerhalb des Designraums angeordnet (*star points*), wobei der Abstand zwischen Zentrum und *star points* $\pm \alpha$ beträgt. Diese bilden die Mittelpunkte der Grenzflächen des Modellraums. Der Wert α ist hierbei abhängig von der Anzahl an Faktoren (k) und wird über die Gleichung 4.3 ermittelt (Montgomery, 2009).

$$\alpha = 2^{k/4} \quad (4.3)$$

Für das empirische Modell in Abschnitt 7.4 wurden drei unabhängige Einflussgrößen untersucht, wodurch sich ein Wert von $\alpha = 1,682$ ergibt. Die Codierung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 4.7 angegeben.

Weitere statistische Versuchsdesigns sind in den entsprechenden Ergebnisabschnitten beschrieben.

Tabelle 4.5: Versuchsplan zur Untersuchung des Einflusses der Substanzen Glucose, Glycerin, Ammoniumchlorid (NH_4Cl), Natriumsulfat (Na_2SO_4), Magnesiumchlorid (MgCl_2), Spurenelementlösung (TES), IPTG und Citrat auf die Ganzzelbiotransformation.

Ansatz	Glucose A	Glycerin B	NH_4Cl C	Na_2SO_4 D	MgCl_2 E	TES F	IPTG G	Citrat H
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
4	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
10	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
11	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
13	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
15	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
16	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabelle 4.6: Codierung und reale Werte der Faktoren Glucose, Glycerin, Ammoniumchlorid (NH_4Cl), Natriumsulfat (Na_2SO_4), Magnesiumchlorid (MgCl_2), Spurenelementlösung (TES), IPTG und Citrat

Substanz	Codierung	
	-1	1
Glucose	0 g L ⁻¹	3 g L ⁻¹
Glycerin	0 % (v/v)	8,7 % (v/v)
NH_4Cl	0 mM	60 mM
Na_2SO_4	0 mM	35 mM
MgCl_2	0 mM	1 mM
TES	0 % (v/v)	0,15 % (v/v)
IPTG	0 mM	0,5 mM
Citrat	0 g L ⁻¹	3 g L ⁻¹

Tabelle 4.7: Versuchsplan für die Erstellung des empirischen Prozessmodells mit den natürlichen Variablen OD₆₀₀, NAD-Konzentration und NADP-Konzentration und den codierten Variablen x_1 , x_2 und x_3 .

Ansatz	codierte Variablen			natürliche Variablen		
	x_1	x_2	x_3	OD ₆₀₀ , –	NAD, μM	NADP, μM
1	-1	-1	-1	2,0	40,0	7,5
2	-1	-1	1	2,0	40,0	10,0
3	-1	1	-1	2,0	60,0	7,5
4	-1	1	1	2,0	60,0	10,0
5	1	-1	-1	3,0	40,0	7,5
6	1	-1	1	3,0	40,0	10,0
7	1	1	-1	3,0	60,0	7,5
8	1	1	1	3,0	60,0	10,0
9	$-\alpha$	0	0	1,7	50,0	8,7
10	α	0	0	3,3	50,0	8,7
11	0	$-\alpha$	0	2,5	33,2	8,7
12	0	α	0	2,5	66,8	8,7
13	0	0	$-\alpha$	2,5	50,0	6,6
14	0	0	α	2,5	50,0	10,8
15	0	0	0	2,5	50,0	8,7

4.8.3 Parameteridentifikation von statistischen Polynommodellen

Für die empirische Modellierung der Ganzzellbiokatalyse wurde ein statistisches Polynommodell folgender Form verwendet:

$$\eta = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j=2}^k \sum_{i=2}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (4.4)$$

Hierbei beschreibt η eine Antwortgröße, die von diversen unabhängigen Prozessparametern (x_i) beeinflusst wird. Die einzelnen Parameter β_i beschreiben hierbei die Art und Größe des Einflusses. Vorteil solcher quadratischer Polynommodelle ist, dass diese sehr flexibel sind und sich an eine Vielzahl von Funktionen annähern können (Carley *et al.*, 2004). Die Werte der einzelnen Modellparameter wurden zunächst durch nichtlineare Regression mit dem Programm MATLAB (MathWorks, Natick, USA) ermittelt, anschließend wurden iterativ die Parameter mit dem geringsten Signifikanzwert (p-Wert) aus dem Modell entfernt, bis durch Entfernung weiterer Modellparameter keine Erhöhung des korrigierten Bestimmtheitsmaßes ($\overline{R^2}$) des Gesamtmodells mehr erzielt werden konnte.

4.8.4 Herleitung mechanistischer Modelle

Für die mechanistische Modellierung der multienzymatischen Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA mussten Geschwindigkeitsgleichungen, die nicht in der Literatur zu finden sind, hergeleitet werden. Die Herleitung der Geschwindigkeitsgleichung erfolgte mit dem in Abschnitt 3.2.5 beschriebenen King-Altman-Verfahren. Hierfür wurde das Internetprogramm BioKin King Altman (<http://biokin.com/king-altman/index.html>, Biokin Ltd., Watertown, USA) verwendet. Dabei muss der jeweilige Enzymmechanismus durch die Eingabe aller vorhandenen Einzelreaktionen zunächst spezifiziert werden, anschließend generiert das Programm die entsprechende Geschwindigkeitsgleichung, die durch Geschwindigkeitskonstanten ($k_{+1}, k_{-1} \dots$) definiert ist (Cornish-Bowden, 1977). Die entsprechenden kinetischen Parameter ($V_1, K_{mA} \dots$) können anschließend gemäß der Cleland-Definition ermittelt werden (Cleland, 1963a), so dass durch Substitution der Geschwindigkeitskonstanten die Geschwindigkeitsgleichung durch kinetische Konstanten dargestellt werden konnte.

4.8.5 Parameteridentifikation von mechanistischen Modellen

Die Parameter der mechanistischen Modelle wurden für jedes Enzym unabhängig durch Verlaufskurvenanalyse abgeschätzt. Hierfür wurde jeweils ein gemäß Abschnitt 4.5.7 aufgezeichneter Verlaufskurvensatz verwendet. Um eine schnellere Datenverarbeitung zu ermöglichen, wurde jede Verlaufskurve auf 11 Datenpunkte reduziert, wobei das Zeitintervall zwischen den einzelnen Datenpunkten sich an der Geschwindigkeit der jeweiligen Reaktion orientierte. Grundsätzlich wurden die Zeitintervalle so gewählt, dass sich über die gesamten 11 Datenpunkte hinweg eine Reaktion beobachten ließ. Ansätze, bei denen sich keine Reaktion beobachten ließen, wurden für die Parameteridentifikation ausgelassen. Dies betraf bei der 3α -HSDH die Ansätze 14, 16 und 17 sowie bei der 7β -HSDH die Ansätze 13, 14, 16 und 17. Bei der GDH wurden keine Ansätze ausgelassen.

Weiterhin tritt bei enzymatischen Reaktionen manchmal eine Verzögerungsphase zu Beginn der Reaktion auf. Da das Modell eine solche Phase nicht vorsieht, wurde dieser Effekt herausgerechnet. Für den Fall dass:

$$\left| \frac{E_2 - E_1}{t_2 - t_1} \right| < \left| \frac{E_3 - E_2}{t_3 - t_2} \right| \quad (4.5)$$

mit: E_i gemessene Extinktion am Datenpunkt i , –
 t_i Messzeit am Datenpunkt i , s

wurden für alle Datenpunkte D_i ($i \geq 2$) neue Messzeiten t_i^* angenommen, so dass folgendes gilt:

$$t_i^* = t_i - (t_2 - t_1) \cdot \left(1 - \frac{E_2 - E_1}{E_3 - E_2} \right) \quad (4.6)$$

Damit werden für den Fall, dass eine Verzögerungsphase vorliegt, sämtliche Datenpunkte außer dem Datenpunkt zum Zeitpunkt $t = 0$ (t_1) an der Zeitachse vorverschoben, so dass die Steigung zwischen den ersten beiden Datenpunkten nicht kleiner ist als die Steigung zwischen den darauffolgenden beiden Datenpunkten.

Für das simultane Abschätzen aller Parameter unter sämtlichen Reaktionsbedingungen wurde das Programm PottersWheel (Maiwald & Timmer, 2008) in einer MATLAB-Umgebung verwendet. Die Abschätzung erfolgte im logarithmischen Suchraum, als Suchalgorithmus wurde ein Levenberg-Marquardt-Algorithmus verwendet und als Integrator RADAU5 (Maiwald & Timmer, 2008). Die zu minimierende Zielfunktion ist eine gewichtete χ^2 -Funktion der folgenden Form:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(y_{Modell}(i) - y_{Exp}(i))^2}{\sigma_{Exp}^2(i)} \quad (4.7)$$

bei der N die Anzahl aller Datenpunkte, $y_{Modell}(i)$ die vorhergesagten Modellwerte, $y_{Exp}(i)$ die experimentellen Messwerte und $\sigma_{Exp}^2(i)$ deren Varianz ist. Die Standardabweichungen der einzelnen Datenpunkte wurde hierbei über folgendes Fehlermodell abgeschätzt:

$$\sigma_{Exp}(j) = 0,0005 + 0,05 \cdot (\max(y(j)) - \min(y(j))) \quad (4.8)$$

bei der $\sigma_{Exp}(j)$ die Standardabweichung der Datenpunkte einer Verlaufskurve j , $\max(y(j))$ der maximale und $\min(y(j))$ der minimale y -Wert aller Datenpunkte der Verlaufskurve j darstellen. Dabei setzt sich das Fehlermodell aus einem konstanten Term und einem variablen, von dem Dynamikumfang der Messung abhängigen, Term zusammen. Der konstante Term soll die Messgenauigkeit darstellen. Der variable Term soll hingegen Fehler abbilden, die beim Ansetzen der Reaktion entstehen. Der Grund, warum diese Bewertungsfunktion einer nicht-gewichteten *least square*-Zielfunktion vorgezogen wurde, ist, dass bei einer nicht-gewichteten *least square*-Zielfunktion Reaktionen mit größeren Konzentrationsveränderungen stärker gewichtet werden würden als Reaktionen mit geringen Konzentrationsveränderungen.

Für jedes Enzym wurde eine Sequenz von 100 Einzelanpassungen durchgeführt, bei der die Startwerte der Parameter innerhalb eines Intervalls zufallsgeneriert wurden. Die jeweiligen Intervalle sind in Tabelle 4.9 angegeben. Gegenüber der Verwendung eines genetischen Algorithmus hatte diese Vorgehensweise die Vorteile, dass der Levenberg-Marquardt-Algorithmus eine dramatische Verkürzung der Rechenzeit ermöglichte (ca. 1 h anstatt ca. 1 d pro Sequenz) und dass Minima genauer bestimmt wurden (Maiwald & Timmer, 2008). Programmbedingt ergab sich außerdem der Vorteil, dass bei der Verwendung eines Levenberg-Marquardt-Algorithmus die abgeschätzten Parameterwerte, im Gegensatz zur Verwendung eines stochastischen Algorithmus, nicht auf ein vorher zu definierendes Intervall begrenzt waren. Der Vorteil einer stochastischen Abtastung wurde hierbei durch die Zufallsgenerierung der Startwerte erreicht.

Nach Beendigung der Anpassungssequenz wurden die abgeschätzten Parameter der 50 % besten Schätzungen (geringste χ^2) analysiert, indem die Verteilung der Parameterwerte, die Histogramme der Start- und Endwerte sowie die paarweisen Korrelationen der Parameterwerte betrachtet wurden. Dabei sollte die Bestimmbarkeit der jeweiligen Parameter evaluiert werden. Parameter, deren Endwerte unabhängig von ihren Startwerten eine scharfe Verteilung aufwei-

Tabelle 4.9: Intervalle der zufallsgenerierten Parameterstartwerte für die mechanistische Modellierung von 3 α -HSDH, 7 β -HSDH und GDH.

7β-HSDH	Min	Max	3α-HSDH	Min	Max
$k_{+1}, s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$	1	10000	$k_{+1}, s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$	10	10000
$k_{-1}, s^{-1} AU^{-1}$	0,001	1000	$k_{-1}, s^{-1} AU^{-1}$	0,01	100
$k_{-2}/k_{+2}, mM$	0,1	10	$k_{-2}/k_{+2}, mM$	0,1	10
$k_{+3}, s^{-1} AU^{-1}$	0,1	10000	$k_{+3}/k_{-3}, mM$	0,1	10
$k_{-3}, s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$	0,1	10000			
$k_{+4}, s^{-1} AU^{-1}$	0,01	1000	$k_{+4}, s^{-1} AU^{-1}$	0,01	100
$k_{-4}, s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$	0,01	1000	$k_{-4}, s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$	0,03	300
$k_{-5}/k_{+5}, mM$	0,1	100	$k_{-5}/k_{+5}, mM$	0,01	10
GDH (NAD)	Min	Max	GDH (NADP)	Min	Max
$V1, U AU^{-1}$	1	1,2	$V1, U AU^{-1}$	1	1,3
KmA, mM	0,001	0,1	KmA, mM	0,001	0,1
Kia, mM	0,001	100	Kia, mM	0,001	100
KmB, mM	1	100	KmB, mM	1	100
Kiq, mM	0,001	100	Kiq, mM	0,001	100

sen, gelten als bestimmbar, während Parameter mit breiten Endwertverteilungen, die häufig mit den Startwertverteilungen korrelieren oder ins Unendliche abdriften, als unbestimmbar gelten. Die Betrachtung von paarweisen Korrelationen kann zur Identifikation von Parameterpaaren führen, die zwar einzeln unbestimmbar, aber paarweise bestimmbar sind, z.B. als Quotient oder Produkt. Im Falle des Vorliegens von unbestimmbaren Parametern musste das Modell entsprechend modifiziert werden, so dass sämtliche im Modell enthaltenen Parameter bestimmbar waren. Die Konfidenzintervalle der Einzelparameter wurden im Anschluss auf Basis der Hesse-Matrix berechnet (Marsili-Libelli *et al.*, 2003).

4.8.6 Simulation und Konfidenzintervallbestimmung von mechanistischen

Prozessmodellen

Die Simulation von Reaktionsverläufen wurde ebenfalls mit dem Programm PottersWheel durchgeführt. Hierbei wurden die ermittelten kinetischen Parameter der Einzelenzymmodelle in ein kombiniertes Prozessmodell übertragen. Somit konnten Prozessverläufe bei unterschiedlichen Startbedingungen an Substraten, Produkten und Kofaktoren berechnet werden.

Die 95 %-Konfidenzintervalle der Reaktionsverläufe wurden durch Bootstrapping ermittelt. Hierzu wurden neue Enzymparametersätze simuliert, wobei sämtliche Enzymparameter durch zufallsgenerierte Werte ersetzt wurden, bei denen die Verteilungen der simulierten Werte einer Normalverteilung um die jeweils ermittelten Parameterwerte entsprachen, deren Breite sich

aus den jeweiligen ermittelten Konfidenzintervallen ergaben. Insgesamt wurden für jede Reaktionsbedingung 10000 Parametersätze generiert und damit Simulationen der Reaktionsverläufe durchgeführt. Die simulierten Gallensalzkonzentrationen über die Zeit wurden in eine Matrix übertragen und der Größe nach sortiert, so dass sich die 95 %-Intervalle direkt aus den Daten auslesen ließen.

5 Änderung der Kofaktorspezifität der 7 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7 β -HSDH)

5.1 Erstellung einer NADH-abhängiger Mutante durch rationales Protein-Design

Die verwendeten Synthesenzyme 3 α -HSDH und 7 β -HSDH weisen unterschiedliche Kofaktorspezifitäten auf: während die 3 α -HSDH NADH benötigt, bevorzugt die vorliegende 7 β -HSDH NADPH als Kofaktor. Aufgrund der einfacheren Kofaktorregenerierung ist es jedoch zu bevorzugen, wenn beide Enzyme die gleiche Spezifität hätten. Da NADH-Regenerierung durch die native NAD-Aktivität der FDH besser durchzuführen ist und NAD zudem kostengünstiger als NADP ist (Weckbecker *et al.*, 2010), soll durch Protein-Engineering versucht werden, die Kofaktorspezifität der 7 β -HSDH zu NADH zu ändern.

5.1.1 Identifizierung der kofaktordeterminierenden Aminosäureposition

Die Enzymfamilie der SDR ist in der Literatur gut beschrieben und diverse Quellen berichten, dass die Kofaktorspezifität hauptsächlich von nur wenigen Aminosäurepositionen abhängig ist. Der entscheidende Aminosäurerest in NADH-abhängigen Vertretern ist ein Aspartat am Ende des zweiten β -Strangs (Tanaka *et al.*, 1996a; Kallberg *et al.*, 2002; Persson, 2003), während NADPH-abhängige Enzyme an dieser Position zumeist einen kleinen aliphatischen Rest aufweisen. Durch multiples Sequenzalignment der NADH-abhängigen HSDH 3 α /20 β -HSDH aus *Streptomyces exfoliatus* (Marekov *et al.*, 1990), 7 α -HSDH aus *E. coli* (Yoshimoto *et al.*, 1991), 3 β /17 β -HSDH aus *C. testosteronei* (Abalain *et al.*, 1993) und 3 α -HSDH aus *C. testosteronei* (Möbus & Maser, 1998) sowie der NADPH-abhängigen Enzyme 12 α -HSDH aus *Clostridium*

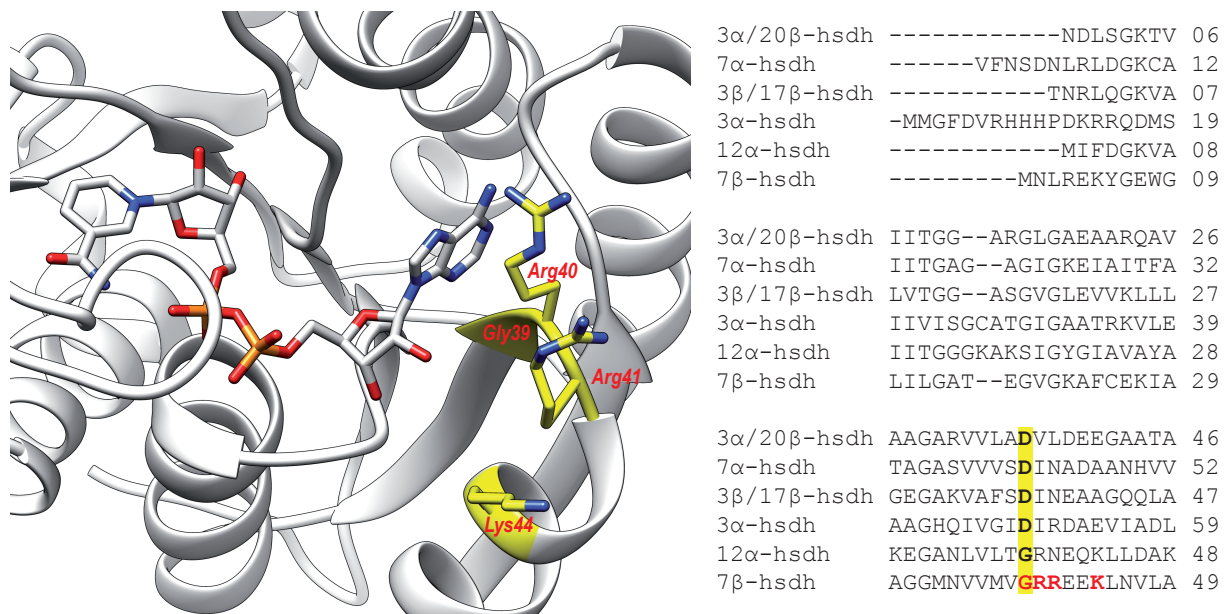


Abbildung 5.1: Struktur der Kofaktorbindetasche der 7 β -HSDH und multiples Sequenzalignment verschiedener HSDH. Links ist die die Kofaktor-Bindetasche der 7 β -HSDH mit NAD gezeigt. Die Aminosäurereste G39, R40, R41 und K44 sind hierbei gelb markiert. Rechts ist ein multiples Sequenzalignment der NADH-abhängigen Enzyme 3 α /20 β -HSDH aus *Streptomyces exfoliatus*, 7 α -HSDH aus *E. coli*, 3 β /17 β -HSDH aus *C. testosteroni* und 3 α -HSDH aus *C. testosteroni* und der NADPH-abhängigen Enzyme 12 α -HSDH aus *Clostridium* group P, Strain C48-50 und 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* gezeigt. Die kofaktordeterminierende Position ist gelb hinterlegt, während die zu mutierenden Positionen rot markiert sind.

group P, Strain C48-50 (Braun, 2011) und 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* (Liu *et al.*, 2010) konnte G39 als entsprechende Position in der 7 β -HSDH identifiziert werden (vgl. Abbildung 5.1).

5.1.2 Herstellung und Charakterisierung der NADH-abhängigen Einfachmutante

Nach Identifikation der entsprechenden Aminosäureposition wurde durch ortsgerichtete Mutagenese eine G39D-Mutante der 7 β -HSDH erstellt, und deren Erfolg durch Sequenzierung bestätigt. Das Protein wurde mit N-terminalem His-Tag exprimiert und über IMAC aufgereinigt. Ein erster Aktivitätsassay zeigte nur sehr geringe NADPH-Aktivität ($0,040 \pm 0,005$ U mg $^{-1}$ bei 10 mM DHCA, 0,5 mM NADPH und pH 8,0). Dafür war eine deutliche NADH-Aktivität zu beobachten.

Anschließend wurde diese Mutante kinetisch charakterisiert. Als Vergleich wurden die drei vorliegenden NADPH-abhängigen 7 β -HSDH-Enzyme – Wildtyp, G39A-Mutante und G39S-Mutante – ebenfalls mit N-terminalem His-Tag exprimiert, aufgereinigt und charakterisiert (Braun, 2011).

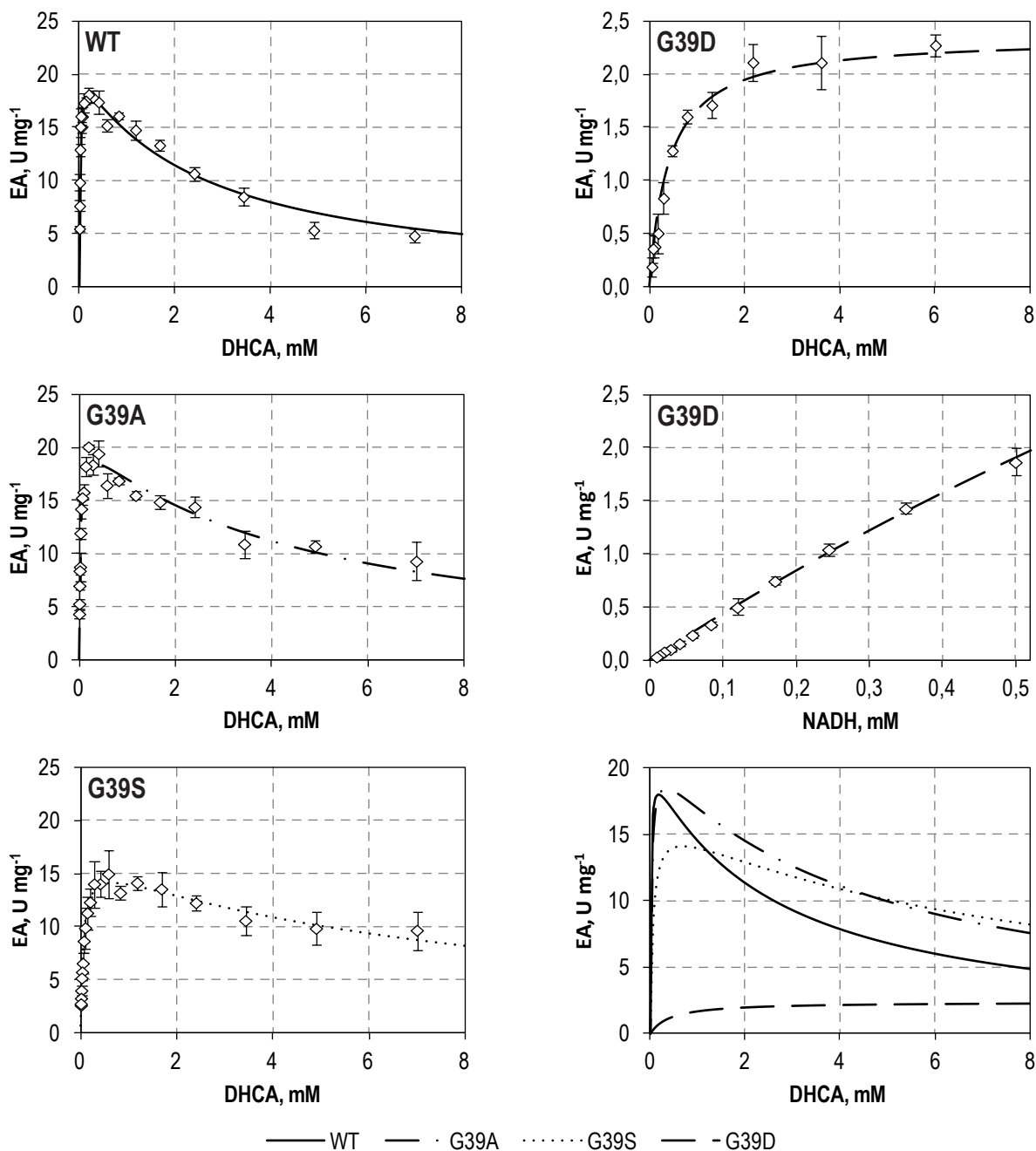


Abbildung 5.2: Kinetikmessungen der NADPH-abhängigen 7 β -HSDH-Varianten und der NADH-abhängigen 7 β -HSDH (G39D). Dabei sind die DHCA- bzw. NADH-Konzentrationen gegen die spezifische Enzymaktivität (EA) aufgetragen. Gezeigt sind die DHCA-Kinetiken des Wildtyps (links oben), der G39A-Mutante (links mittig), der G39S-Mutante (links unten) und der G39D-Mutante (rechts oben), die NADH-Kinetik der G39D-Mutante (rechts mittig) und die Überlagerung sämtlicher DHCA-Kinetiken (rechts unten). Dargestellt sind Messdaten und nach Gleichung 3.1 bzw. 3.10 angepasste Kinetikkurven. Die Reaktionen wurden im 250 μ L-Maßstab (NADPH-abhängige 7 β -HSDH) bzw. 100 μ L-Maßstab (NADH-abhängige 7 β -HSDH) in Mikrotiterplatten bei 30 °C und pH 8,0 durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.5.5 und 4.5.6. Die Standardabweichung der Dreifachmessungen sind mit Fehlerindikatoren gekennzeichnet.

Tabelle 5.1: Kinetische Konstanten der NADPH-abhängigen 7 β -HSDH-Varianten und der NADH-abhängigen 7 β -HSDH (G39D). Für die G39D-Mutante ist ein v_{\max} bei 0,5 mM NADH angegeben. Nicht bestimmbare Parameter sind mit „n.b.“ gekennzeichnet.

Mutante	v_{\max} , U mg ⁻¹	K_m ,DHCA, μ M	K_i ,DHCA, mM	K_m , NAD(P)H, μ M
WT	20,4 \pm 0,7	11,7 \pm 1,5	0,5 \pm 0,3	12,1 \pm 1,2
G39A	21,2 \pm 0,7	25 \pm 2,9	4,5 \pm 0,6	22,3 \pm 2,3
G39S	16,5 \pm 0,6	57 \pm 6	8,0 \pm 1,3	15,1 \pm 1,5
G39D	2,35 \pm 0,07	420 \pm 50	–	n.b.

In Abbildung 5.2 sind die DHCA-Kinetikkurven der vier Enzymvarianten gezeigt und zusätzlich die NADH-Kinetikkurve der G39D-Mutante. Die NADPH-Kurven der anderen Enzymvarianten wurden auch aufgezeichnet, sind jedoch nicht gezeigt. Darüber hinaus ist ein Vergleich der ermittelten DHCA-Kinetiken der vier Enzymvarianten zu sehen. Die ermittelten kinetischen Parameter sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Wie schon von Braun (2011) durch Messungen mit Zellysat gezeigt, weisen sämtliche NADPH-abhängigen Enzymvarianten eine deutliche Substratinhibierung durch DHCA auf, die in der Reihenfolge Wildtyp, G39A, G39S abnimmt. Die G39D-Mutante hingegen zeigt keine Substratinhibierung, allerdings ist deren v_{\max} deutlich geringer als der der NADPH-abhängigen Varianten (2,35 \pm 0,07 gegenüber 16,5 – 21,2 U mg⁻¹). Die NADH-Kinetik der G39D-Mutante zeigt jedoch, dass die spezifische Aktivität mit zunehmender NADH-Konzentration bis 0,5 mM quasi linear zunimmt, was bedeutet, dass der K_m für NADH sehr groß und dessen Bestimmung im Rahmen der gewählten, photometrischen Messmethode unmöglich ist, da die hierzu benötigten Kofaktorkonzentrationen außerhalb des messbaren Bereichs liegen. Dies bedeutet ebenfalls, dass der ermittelte v_{\max} kein absoluter v_{\max} sondern einer für die Messung mit 0,5 mM NADH darstellt. Der hohe K_m für NADH deutet auf eine geringe Bindeaffinität von NADH hin, was die Abwesenheit einer Substratinhibition erklärt. Eine Hypothese zum Mechanismus der Substratinhibition ist, dass es sich um eine EBQ-Inhibition handelt, bei dem ein oxidiertes Substrat an den binären Komplex aus Enzym und oxidiertem Kofaktor bindet und dadurch einen *dead-end*-Komplex ausbildet. Solche Mechanismen sind an Dehydrogenasen schon beschrieben, und ebenfalls, dass sich die Substratinhibition durch eine Destabilisierung des Enzym-Kofaktor-Komplexes verringern lässt, da hierdurch auch der ternäre, *dead-end*-Komplex destabilisiert wird (Eszes *et al.*, 1996; Gangloff *et al.*, 2001; Braun, 2011). Die geringe Affinität zu NADH führt jedoch vermutlich auch zur geringen spezifischen Enzymaktivität, so dass diese im weiteren Verlauf der Arbeit weiter erhöht werden soll.

5.2 Gerichtete Evolution der NADH-abhängigen 7 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7 β -HSDH)

5.2.1 Herstellung des Wirtsstamms für die Mutantenbibliothek

Die weitere Mutagenese soll nach dem Prinzip der iterativen Sättigungsmutagenese erfolgen (Reetz *et al.*, 2009). Für die Herstellung einer Mutantenbibliothek wird hierzu ein *E. coli*-Wirtsstamm benötigt, der über eine hohe Transformationseffizienz verfügt und gleichzeitig gut für eine Durchmusterung mit Zelllysate geeignet ist. Da *E. coli* über eine genomisch codierte 7 α -HSDH verfügt, welche in der Durchmusterung eine Nebenreaktion katalysiert und somit Messdaten verfälschen kann, muss auf einen Wirtsstamm zurückgegriffen werden, bei dem dieses Gen ausgeschaltet ist. Die beiden vorhandenen Knockout-Stämme BL49 und BLLiu sind jedoch beides *E. coli*-BL21(DE3)-Derivate, die über eine geringe Transformationseffizienz verfügen. Somit musste zunächst ein geeigneter Wirtsstamm hergestellt werden, indem die genomische 7 α -HSDH ausgeschaltet wird.

Als Ausgangsstamm für den Knockout wurde *E. coli* NovaBlue(DE3) gewählt, einem K-12-Derivat mit hoher Transformationseffizienz. Gleichzeitig ermöglicht die DE3-Kassette eine Expression von Fremdprotein mit dem T7-Expressionssystem, wodurch sich dieser von *E. coli* DH5 α unterscheidet. Die erfolgreiche Ausschaltung des Gens für die 7 α -HSDH und das anschließende Ausschleusen des Knockout-Plasmids wurden durch Kultivierung auf entsprechenden Selektionsantibiotika, PCR und Sequenzierung bestätigt. Dieser Stamm trägt die Bezeichnung *E. coli* NB13.

5.2.2 Auswahl der zu mutierenden Positionen

Zu den konservierten Bereichen in NADPH-bindenden SDR zählen vor allem basische Aminosäurereste in der Kofaktorbindetasche, welche die NADP(H)-Bindung durch Säure-Base-Interaktion mit der 2'-Phosphatgruppe an der Adenosinribose des NADP(H) stabilisieren (Carugo & Argos, 1997a,b; Woodyer *et al.*, 2003). Allen voran ist die zur Position 39 benachbarte Position 40 zu betrachten, an der sich bei NADPH-bindenden SDR in der Regel ein Arginin oder ein Lysin befindet (Bellamacina, 1996; Kallberg *et al.*, 2002; Persson, 2003).

Bei der 7 β -HSDH befindet sich an der zur G39 benachbarten Position mit R40 ebenfalls eine basische Aminosäure. Zusätzlich wurden mit R41 und K44 zwei weitere basische Aminosäuren in unmittelbare Nähe zur Bindetasche identifiziert. Diese drei Positionen wurden als Zielpositionen für die iterative Sättigungsmutagenese festgelegt. Die räumliche Anordnung dieser drei erwähnten Aminosäureresten ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

5.2.3 Durchführung der gerichteten Evolution

Die gerichtete Evolution wurde in drei Mutageneserunden durchgeführt, bei der jeweils eine Position mutiert wurde. Die Mutante jeder Runde, die bei der Durchmusterung die höchste NADH-Aktivität zeigte, wurde zur Identifikation der Mutation sequenziert und diente bei der darauffolgenden Runde als Ausgangsmutante. Die Mutagenese erfolgte ausgehend von 7 β -HSDH G39D (D) zunächst an Position R40. Die hierbei beste Mutante war 7 β -HSDH G39D R40F (DF). Danach erfolgte die Mutagenese an der Position R41 mit 7 β -HSDH G39D R40F R41K (DFK) als beste Mutante und zum Schluss an der Position K44 mit 7 β -HSDH G39D R40F R41K K44G (DFKG) als beste Mutante. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Gerichtete Evolution der 7 β -HSDH. Aufgelistet ist die jeweils mutierte Position, der Aminosäureaustausch der Mutante mit der höchsten Enzymaktivität sowie deren Kurzbezeichnung.

Runde	Position	Mutation	Bezeichnung
1	G39	G39D	D
2	R40	G39D R40F	DF
3	R41	G39D R40F R41K	DFK
4	K44	G39D R40F R41K K44G	DFKG

5.2.4 Vergleichende Charakterisierung der NADH-abhängigen Mutanten

Die jeweils besten Mutanten jeder Mutageneserunde wurden zusammen mit dem Wildtyp-Enzym mit N-terminalem His-Tag exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Anschließend wurden diese auf NADPH-Aktivität untersucht und hinsichtlich ihrer Aktivität mit NADH kinetisch charakterisiert. Die Daten für die G39D-Mutante sind bereits in Abschnitt 5.1.2 gezeigt und werden hier lediglich aus Gründen der Vollständigkeit aufgeführt.

Bei der Analyse der NADPH-Aktivität zeigte sich, dass neben dem Wildtyp-Enzym ($12,2 \pm 0,9$ U mg⁻¹ bei 0,5 mM NADPH, 10 mM DHCA und pH 8,0) lediglich bei der G39D-

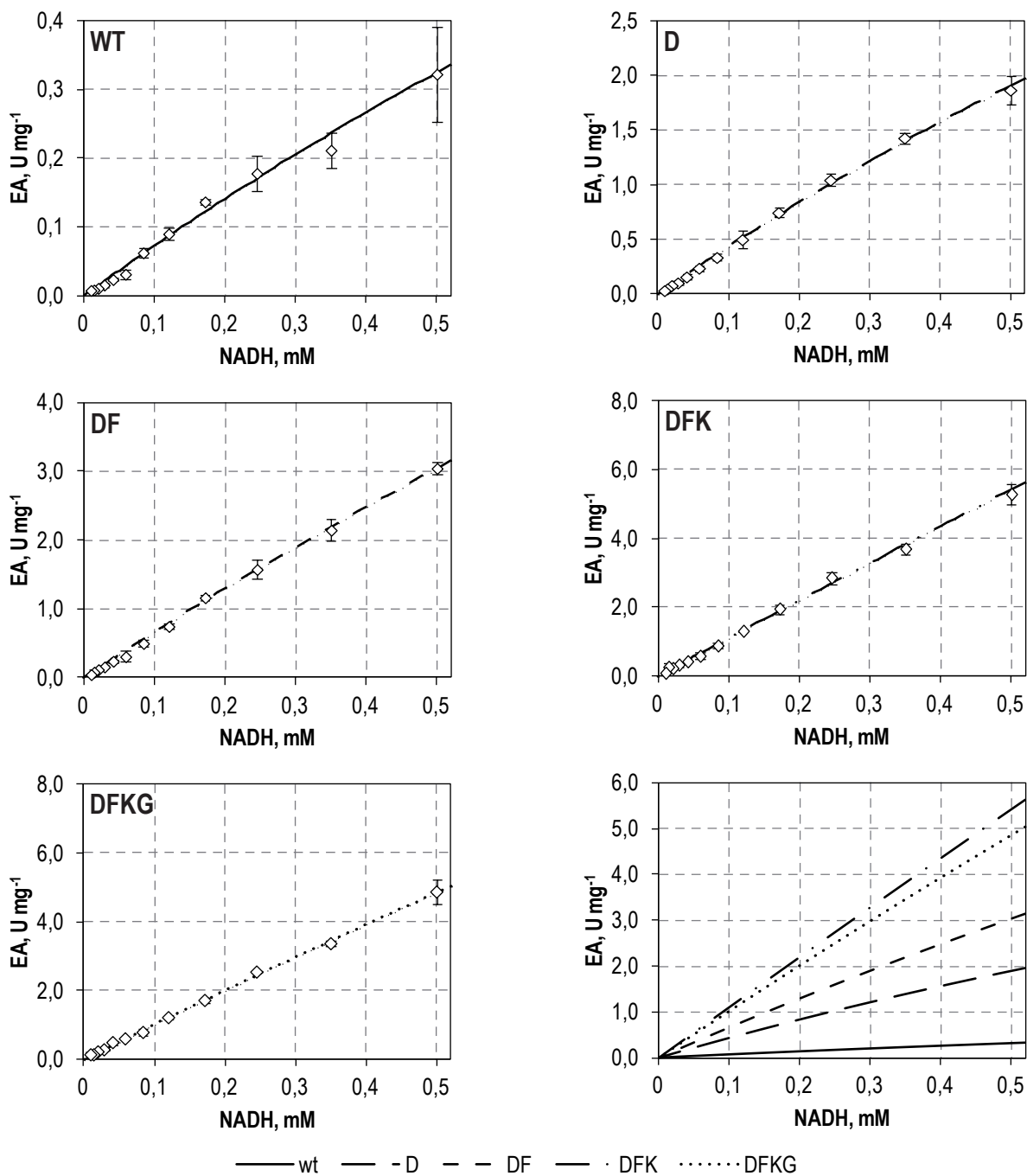


Abbildung 5.3: NADH-Kinetiken der NADH-abhängigen 7 β -HSDH-Varianten und des NADPH-abhängigen Wildtyp-Enzyms. Gezeigt sind die Kinetikmessungen des Wildtyps (links oben), der D-Mutante (rechts oben), der DF-Mutante (links mittig), der DFK-Mutante (rechts mittig) und der DFKG-Mutante (links unten) sowie die Überlagerung sämtlicher Kinetikkurven (rechts unten). Dargestellt sind Messdaten und nach Gleichung 3.1 angepasste Kinetikkurven. Die Reaktionen wurden im 100 μ L-Maßstab in Mikrotiterplatten bei 30 °C und pH 8,0 durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.5.5 und 4.5.6. Die Standardabweichung der Dreifachmessungen sind mit Fehlerindikatoren gekennzeichnet.

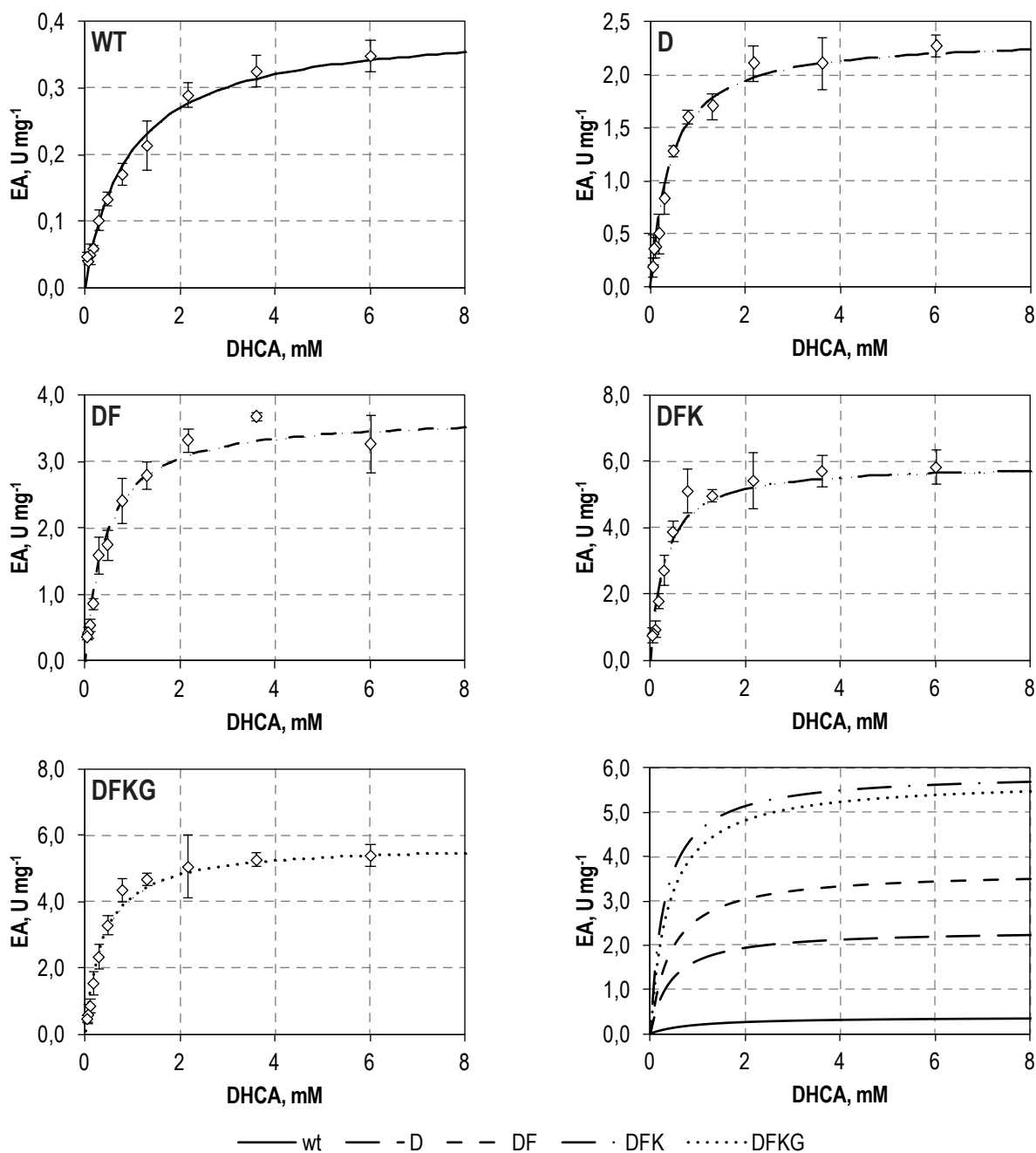


Abbildung 5.4: DHCA-Kinetiken der NADH-abhängigen 7 β -HSDH-Varianten und des NADPH-abhängigen Wildtyp-Enzyms. Gezeigt sind die Kinetikmessungen des Wildtyps (links oben), der D-Mutante (rechts oben), der DF-Mutante (links mittig), der DFK-Mutante (rechts mittig) und der DFKG-Mutante (links unten) sowie die Überlagerung sämtlicher Kinetikkurven (rechts unten). Dargestellt sind Messdaten und nach Gleichung 3.1 angepasste Kinetikkurven. Die Reaktionen wurden im 100 μ L-Maßstab in Mikrotiterplatten bei 30 °C und pH 8,0 durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.5.5 und 4.5.6. Die Standardabweichung der Dreifachmessungen sind mit Fehlerindikatoren gekennzeichnet.

Mutante noch NADPH-Aktivität nachgewiesen wurde ($0,040 \pm 0,005 \text{ U mg}^{-1}$), was darauf hindeutet, dass durch die weiteren Mutationen die Bindeaffinität von NADPH weiterhin verringert wurde bzw. komplett verloren ging (vgl. Tabelle 5.3). Hierbei ließ sich auch bei dem Wildtyp-Enzym eine geringe NADH-Aktivität erkennen. Die Ergebnisse für die Charakterisierung mit variierten NADH-Konzentrationen sind in Abbildung 5.3 und mit variierten DHCA-Konzentrationen in Abbildung 5.4 gezeigt und die ermittelten kinetischen Parameter in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Tabelle 5.3: Kinetische Konstanten und spezifische Enzymaktivität mit NADPH der NADH-abhängigen 7 β -HSDH-Varianten und des Wildtyp-Enzyms. die angegebenen v_{\max} sind hierbei v_{\max} für DHCA bei 0,5 mM NADH.

Mutante	$K_M, \text{DHCA, mM}$	$v_{\max, \text{DHCA, U mg}^{-1}}$	$EA_{\text{NADPH, U mg}^{-1}}$
WT	$0,92 \pm 0,10$	$0,394 \pm 0,012$	$12,2 \pm 0,9$
D	$0,42 \pm 0,05$	$2,35 \pm 0,07$	$0,040 \pm 0,005$
DF	$0,42 \pm 0,06$	$3,70 \pm 0,13$	$\leq 0,01$
DFK	$0,29 \pm 0,05$	$5,91 \pm 0,23$	$\leq 0,01$
DFKG	$0,38 \pm 0,05$	$5,72 \pm 0,19$	$\leq 0,01$

Aus den NADH-Kinetiken lässt sich erkennen, dass bei sämtlichen 7 β -Varianten die Zunahme der Aktivität bis 0,5 mM NADH quasi linear verläuft, so dass kein K_m bestimmt werden kann. Wie bereits beschrieben, deutet dies auf eine geringe NADH-Bindeaffinität hin. Beim Vergleich der einzelnen Enzymvarianten ist jedoch zu erkennen, dass die Steigungen der Kurven deutliche Unterschiede zeigen. Wie zu erwarten, ist die Steigung beim Wildtyp-Enzym am geringsten. Die höchste Steigung kann hingegen bei der DFK-Mutante beobachtet werden.

Die DHCA-Kinetiken zeigen hingegen ein anderes Bild und bei jeder Enzymvariante konnten sowohl K_m als auch v_{\max} ermittelt werden. Hervorzuheben ist, dass bei keiner Enzymvariante eine Substratinhibierung durch DHCA festgestellt werden kann. Die Werte für v_{\max} korrelieren erwartungsgemäß mit den Steigungen bei der NADH-Kinetik. Hierbei weist der Wildtyp erneut die geringste Aktivität auf ($v_{\max} = 0,394 \pm 0,012 \text{ U mg}^{-1}$) und die DFK-Mutante die höchste Aktivität ($v_{\max} = 5,91 \pm 0,23 \text{ U mg}^{-1}$).

5.3 Diskussion

Ziel des Protein-Engineerings war, 7 β -HSDH-Mutanten mit NADH-Aktivität herzustellen, die sich für den Einsatz in der Ganzzellreduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA eignen. Aufgrund

der limitierten Durchmusterungskapazität wurde, um Bibliotheksgrößen klein zu halten, auf eine semirationale Vorgehensweise zurückgegriffen (vgl. Abschnitt 3.1.6). Hierzu wurden zu mutagenisierende Positionen identifiziert und anschließend iterativ in mehreren Runden mutiert. Bereits durch den ersten zielgerichteten Aminosäureaustausch G39D ist es dabei gelungen, eine Mutante zu erzeugen, die eine um Faktor 60 höhere NADH- als NADPH-Aktivität aufweist und somit NADH als Kofaktor bevorzugt. Gegenüber dem Wildtyp-Enzym ist die NADH-Aktivität um Faktor 6 erhöht während die NADPH-Aktivität um Faktor 300 verringert ist.

In der nächsten Runde wurde die Mutante D39G R40F erhalten, die gegenüber der Einfachmutante eine um 60 % höhere spezifische Enzymaktivität aufweist. Bei dieser Mutante wurde der basische Argininrest durch einen aromatischen Phenylalaninrest ersetzt. Das Arginin ist hierbei eine in NADPH-abhängigen Enzymen konservierte Aminosäure, während NADH-abhängige Enzyme an dieser Stelle einen unpolaren Rest, häufig Leucin oder Isoleucin tragen. Während Arginin durch seine positive Ladung mit dem 2'-Phosphatrest an der Adenosinribose von NADP(H) interagiert, besteht die Wechselwirkung des aliphatischen Restes bei NADH-abhängigen Enzymen hingegen in der hydrophoben Interaktion mit der A-Seite des Adenins am NAD(H) (Carugo & Argos, 1997a). Das Phenylalanin, das bei der DF-Mutante eingefügt wurde, erfüllt hier diese Funktion und eventuell kann zusätzlich eine π - π -Interaktion zwischen den Aromaten eine stabilisierende Rolle spielen.

Bei der darauffolgenden Runde wurde die Mutante D39G R40F R41K erhalten, die gegenüber der Doppelmutante über eine nochmals um 60 % höhere spezifische Enzymaktivität verfügt. Da hierbei die eine basische Aminosäure Arginin durch eine andere basische Aminosäure Lysin ersetzt wurde, muss diese Verbesserung eine andere mechanistische Ursache als bei der Doppelmutante haben. Denkbar wären hier sterische Gründe, die eventuell eine bessere Ausrichtung des Phenylalanin- und des Aspartat-Restes ermöglichen. Bei der vierten Mutageneserunde wurde hingegen keine Mutante mit höher spezifischer Enzymaktivität mehr erreicht.

Hinsichtlich der Verwendung in der Biokatalyse ist jedoch noch ein anderer Aspekt von Belang, und zwar, dass keine der Mutanten eine Substratinhibierung durch DHCA zeigt, was im Gegensatz zu den NADPH-abhängigen Enzymvarianten steht und bei den industriell eingesetzten Substratkonzentrationen ein wichtiger Faktor ist. So ist beispielsweise bei 0,5 mM NADH der v_{\max} der DFK-Mutante bereits bei knapp 50 % der spezifischen Enzymaktivität des Wild-

typs bei 0,5 mM NADPH und 10 mM DHCA. Da dieser prozentuale Wert mit zunehmender DHCA-Konzentration mutmaßlich noch ansteigt, ist die Verwendbarkeit der DFK-Mutante in der Biokatalyse zumindest denkbar. Auch muss erwogen werden, ob die geringere Enzymaktivität der HSDH nicht durch Kostenvorteile beim Verzicht auf NADP(H) und der einfacheren Kofaktorregenerierung kompensiert wird.

6 Evaluation verschiedener Strategien zur Ganzzellbiokatalyse

Ein erster Schritt zur Etablierung eines Ganzzellbiokatalyseprozesses zur Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA ist die Entwicklung eines geeigneten Ganzzellbiokatalysators. In den nachfolgenden Abschnitten sollen hierzu verschiedene Strategien untersucht und miteinander verglichen werden. Hierbei liegt der Fokus auf der Verwendung verschiedener Kofaktorregenerierungssysteme, der Verwendung eines einzigen oder zweier unterschiedlicher Ganzzellbiokatalysatoren sowie der Verwendung von modifizierten Enzymen mit veränderter Kofaktorspezifität.

6.1 Ein-Zell-System mit bispezifischer Formiatdehydrogenase (FDH)

Die Strategie des Ein-Zell-Systems mit bispezifischer FDH basiert auf ersten Vorarbeiten von Braun (2011). Hierbei werden sämtliche benötigten Enzyme in einem Ganzzellbiokatalysator überexprimiert. Als Kofaktorregenerierungssystem dient eine modifizierte FDH, die sowohl NAD als auch NADP akzeptiert und somit beide Syntheseenzyme, 3 α -HSDH und 7 β -HSDH, bedient.

6.1.1 Stammentwicklung

Für die Entwicklung geeigneter Stämme liegen zu Beginn der Arbeiten die Enzyme FDH, 3 α -HSDH und 7 β -HSDH rekombinant vor. Bei der FDH handelt es sich hierbei um die D221G-Mutante einer FDH aus *M. vaccae* N10, die sowohl NAD als auch NADP akzeptiert (Hölsch, 2009). Die 3 α -HSDH ist ein aus *C. testosteroni* isoliertes Wildtyp-Enzym, während die 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* sowohl als Wildtyp-Enzym als auch als modifizierte Versionen G39A und G39S vorliegt, die beide im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eine verringerte Substratinhibition durch DHCA aufweisen (vgl. Abschnitt 5.1.2).

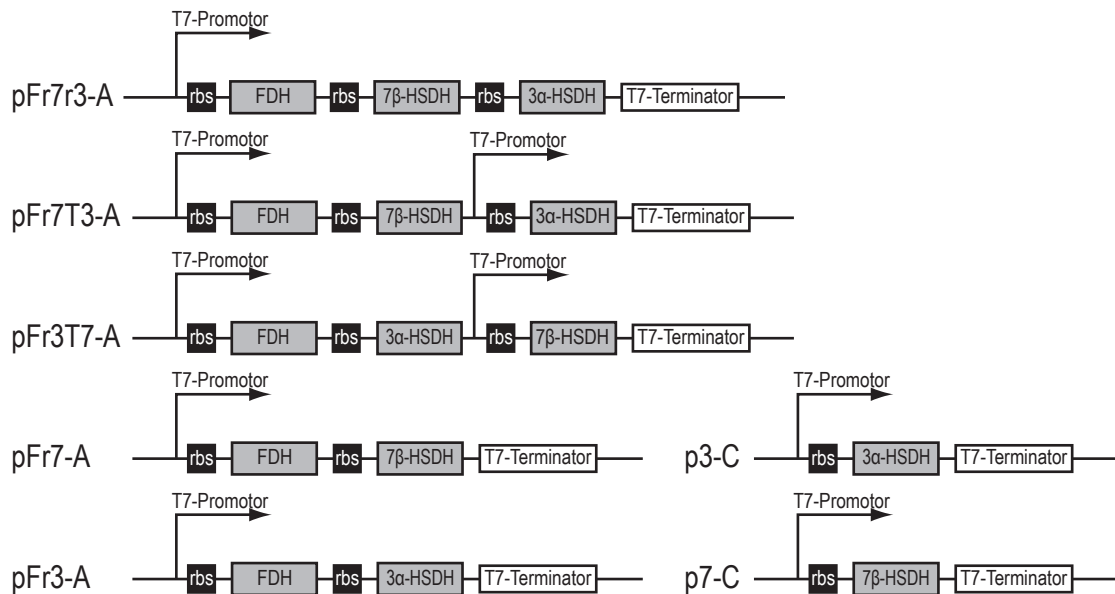


Abbildung 6.1: Vektorkonstrukte für das Ein-Zell-System mit bispezifischer FDH. Gezeigt sind Grundvarianten der Vektoren, deren Bezeichnung je nach verwendeter Variante der Enzyme noch entsprechend der in Abschnitt 4.2.2 eingeführten Nomenklatur weiter spezifiziert werden.

In Braun (2011) ist bereits ein Ganzzellbiokatalysator beschrieben, der die drei verwendeten Enzyme FDH_{D221G} , $3\alpha\text{-HSDH}$ und $7\beta\text{-HSDH}_{wt}$ überexprimiert. Hierbei wird der Wirtstamm *E. coli* BL49 verwendet, bei dem das genomisch codierte Gen für eine $7\alpha\text{-HSDH}$ ausgeschaltet wurde, und welcher als Wirtstamm für sämtliche anderen in diesem Abschnitt beschriebenen Ganzzellbiokatalysatoren dient. Weiterhin sind die drei exprimierten Enzyme beim Ganzzellbiokatalysator von Braun (2011) auf zwei Plasmide verteilt: einem pET21a-basierten Plasmid, welches die Gene für die FDH und die $7\beta\text{-HSDH}$ enthält (pF(G)r7(w)-A, vgl. Abbildung 6.1) sowie einem pCOLA(mod)-basiertem Plasmid, welches das Gen für die $3\alpha\text{-HSDH}$ trägt (p3-C, vgl. Abbildung 6.1).

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurden weitere Stämme hergestellt, welche auf verschiedenen Plasmidgerüsten beruhen, die sich im Allgemeinen in Ein-Plasmid-Systeme und Zwei-Plasmid-Systeme einteilen lassen. Zu den Ein-Plasmid-Systemen zählt die pFr7r3-A-Familie, bei der eine FDH direkt *downstream* zum T7-Promotor angeordnet ist. Darauf folgen die Gene für $7\beta\text{-HSDH}$ und $3\alpha\text{-HSDH}$, beide ohne zusätzlichen T7-Promotor, sondern lediglich mit jeweils einer vor dem Gen eingefügten ribosomalen Bindestelle (rbs). Die pFr7T3-A-Familie unterscheidet sich von der vorherigen dahingehend, dass vor dem Gen für die $3\alpha\text{-HSDH}$ ein zusätzlicher T7-Promotor eingefügt wurde, während die pFr3T7-A-Familie gegenüber der

Tabelle 6.1: Ganzzellbiokatalysatoren für das Ein-Zell-System mit bispezifischer FDH.

Ein-Plasmid-Systeme		Zwei-Plasmid-Systeme		
Wirtsstamm	Plasmid	Wirtsstamm	Plasmid 1	Plasmid 2
<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r7(w)r3-A	<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r7(w)-A	p3-C
<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r7(A)r3-A	<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r7(A)-A	p3-C
<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r7(S)r3-A	<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r7(S)-A	p3-C
<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r7(w)T3-A	<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r3-A	p7(w)-C
<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r7(S)T3-A	<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r3-A	p7(A)-C
<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r3T7(w)-A	<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r3-A	p7(S)-C
<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r3T7(A)-A			
<i>E. coli</i> BL49	pF(G)r3T7(S)-A			

pFr7T3-A-Familie über eine vertauschte Anordnung von 3α -HSDH und 7β -HSDH verfügt. Bei den Zwei-Plasmid-Systemen existiert zum einen die Variante, bei der ein pFr3-A-Plasmid mit einem Plasmid aus der p7-C-Familie kombiniert wird. Hierbei ist beim pET21a-basierten Plasmid pFr3-A das Gen für die FDH direkt *downstream* zum T7-Promotor angeordnet, auf welches eine 3α -HSDH mit eingefügter rbs folgt. Das pCOLA(mod) basierte Plasmid p7-C verfügt lediglich über eine 7β -HSDH in der T7-Expressionskassette. Dem gegenüber ist bei dem zweiten Zwei-Plasmid-System, pFr7-A und p3-C, die Lokalisation der beiden HSDH vertauscht. Zu letzterem zählt auch der von Braun (2011) beschriebene Ganzzellbiokatalysator. Die Expressionskassetten der entsprechenden Vektorkonstrukte sind in Abbildung 6.1 dargestellt.

Von „Plasmidfamilie“ wird gesprochen, da im Falle der 7β -HSDH die eingangs erwähnten drei Enzymvarianten zum Einsatz kamen. Die insgesamt 14 hergestellten Stämme sind in Tabelle 6.1 aufgelistet. Die Nomenklatur der Plasmide entspricht der in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen.

6.1.2 Vergleich der Ganzzellbiokatalysatoren in Schüttelkolbenexpression

Die in Abschnitt 6.1.1 beschriebenen Ganzzellbiokatalysatoren wurden in Schüttelkolben kultiviert und in Ganzzellbiotransformationsansätzen im 20 mL-Maßstab miteinander verglichen. In Abbildung 6.2 sind die 12-Keto-UDCA-Anteile am Gesamtgallensalz nach 5 h Biotransformation bei Verwendung der jeweiligen Stämme dargestellt. Die höchsten Ausbeuten konnten hierbei mit den Stämmen *E. coli* BL49 pF(G)r7(A)r3-A (48 %) und *E. coli* BL49 pF(G)r7(S)r3-A (38 %) erzielt werden, während mit keinem der anderen Stämme mehr als 12 % 12-Keto-

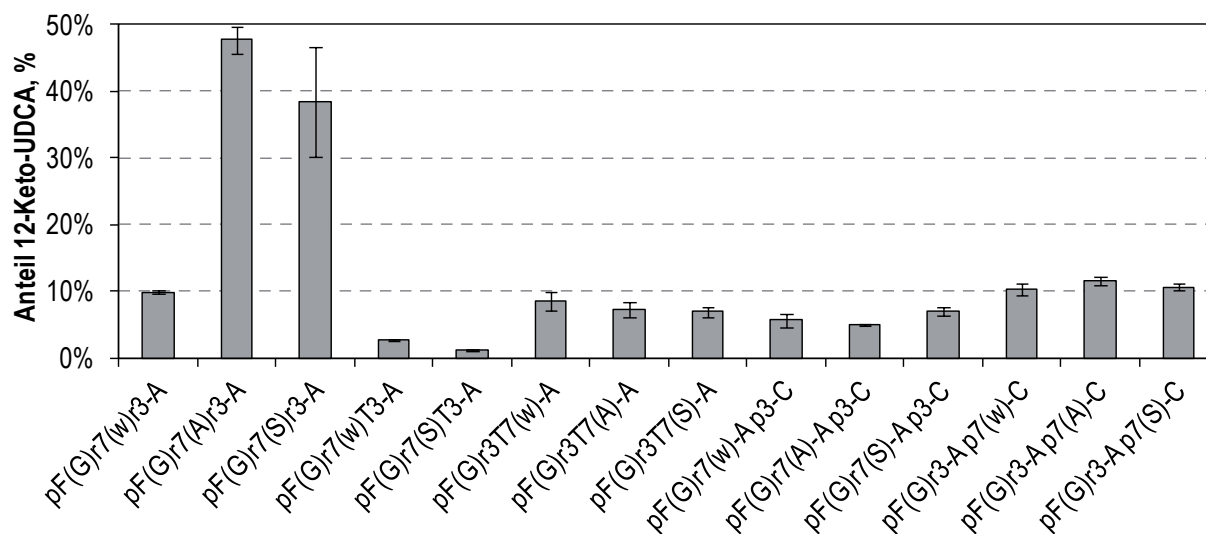


Abbildung 6.2: Vergleich verschiedener Stämme des Ein-Zell-Systems mit monospezifischer FDH. Dargestellt sind die 12-Keto-UDCA-Anteile am Gesamtgallensalz nach 5 h Biotransformation. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 25 °C und einem Anfangs-pH von 6,5 in einem Satzverfahren ohne pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in Abschnitt 4.7.2. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind mit Fehlerindikatoren gekennzeichnet.

UDCA-Anteil erreicht werden konnte. Mit dem Stamm *E. coli* BL49 pF(G)r3T7(A)-A wurde fortan weitergearbeitet.

6.1.3 Optimierung der Rührkesselkultivierung

Im Rahmen der Prozessentwicklung ist es notwendig, den Ganzzellbiokatalysator unter gut kontrollierbaren und skalierbaren Bedingungen im Litermaßstab herzustellen. Hierzu ist eine Kultivierung im Rührkesselreaktor erforderlich. Ausgehend von den Arbeiten von Braun (2011) wurden drei verschiedene Kultivierungsbedingungen untersucht. Die grundsätzliche Vorgehensweise ist in Abschnitt 4.3.2 beschrieben. Bei diesen drei Ansätzen sollten zum einen die Dauer der Expressionsphase und zum anderen die Expressionstemperatur untersucht werden. Hierbei wurde die Expressionstemperatur sukzessiv verringert (30 °C, 25 °C, 20 °C), während gleich-

Tabelle 6.2: Vergleich von finaler Biotrockenmassekonzentration (BTM), 7 β -HSDH-Aktivität, 3 α -HSDH-Aktivität und FDH-Aktivität bei unterschiedlichen Expressionstemperaturen und Expressionsdauer.

Temperatur, °C	Dauer, h	BTM, g _{BTM} L ⁻¹	7 β -HSDH, U g _{BTM} ⁻¹	3 α -HSDH, U g _{BTM} ⁻¹	FDH, U g _{BTM} ⁻¹
30	7	39±1	17±1	14±1	2,5±0,3
25	10	42±5	12±1	15±1	5,8±0,2
20	30	44±5	310±50	59±3	17,4±0,5

zeitig eine Verlängerung der Expressionsdauer (7 h, 10 h, 30 h) erfolgte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.2 zusammengestellt.

Wie aus den Daten ersichtlich, erfolgte mit Absenkung der Temperatur auf 20 °C und Verlängerung der Expressionsdauer auf 30 h eine Steigerung der spezifischen Enzymaktivitäten um die Faktoren 18 (7 β -HSDH), 4 (3 α -HSDH) und 7 (FDH) gegenüber dem Referenzprozess bei 30 °C und 7 h Expressionsdauer bei vergleichbaren Biomasseausbeuten.

6.1.4 Optimierung der Biotransformation

Für die Identifikation von vorteilhaften Zusätzen für die Biotransformationsreaktion wurde ein Durchmusterungsversuch durchgeführt, bei dem die Substanzen Glucose, Glycerin, Ammoniumchlorid, Natriumsulfat, Magnesiumchlorid, Spurenelementlösung (TES) nach Wilms *et al.* (2001), IPTG und Citrat auf ihren Einfluss auf die Biotransformation untersucht wurden. Dies geschah mit Hilfe statistischer Versuchsplanung, bei der ein 2^{8-4} *Fractional Factorial design* zum Einsatz kam. Das Versuchsdesign ist in Tabelle 4.5 angegeben, die Bedeutung der jeweiligen Codierung kann Tabelle 4.6 entnommen werden.

Die erzielten Gesamtumsätze nach 24 h sind in Abbildung 6.3 gezeigt, wobei Gesamtumsatz den Anteil der insgesamt reduzierten Ketogruppen an C3 und C7 der DHCA bezeichnet. Durch

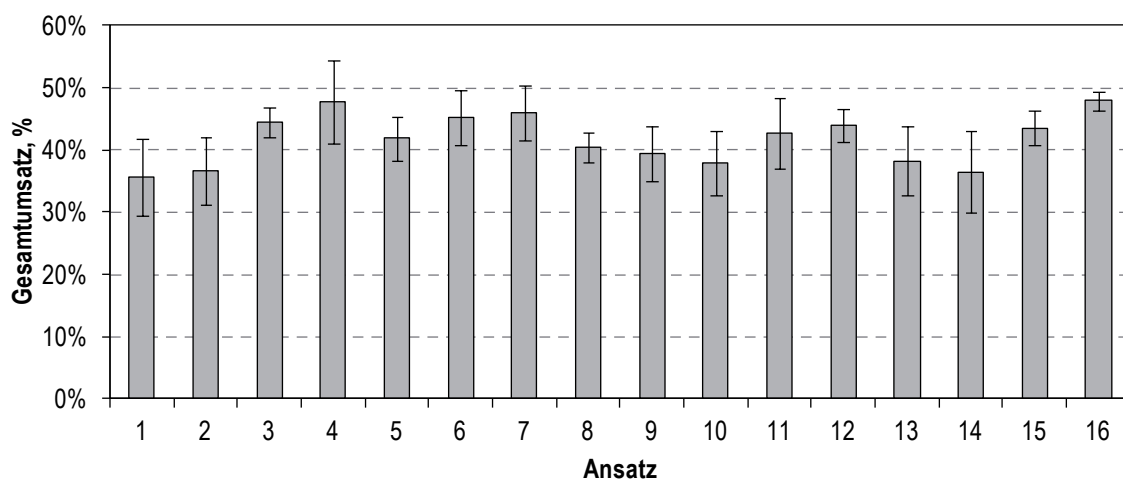


Abbildung 6.3: Erzielte Gesamtumsätze nach 24 h Biotransformation beim Durchmusterungsversuch nach vorteilhaften Zusätzen für die Biotransformation. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 25 °C und einem Anfangs-pH von 6,5 in einem Satzverfahren ohne pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.2 und 4.8.2. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind mit Fehlerindikatoren gekennzeichnet.

Tabelle 6.3: Regressionskoeffizienten der Einflussgrößen Glucose (A), Glycerin (B), Ammoniumchlorid (C), Natriumsulfat (D), Magnesiumchlorid (E), Spurenelementlösung (F), IPTG (G) und Citrat (H), sowie deren Interaktionen für Biotransformationen nach 24 h.

Variable	Koeffizient	p-Wert	Variable	Koeffizient	p-Wert
0	0,418	≤ 0,001	AB + EF + CG + DH	0,001	0,833
A	0,003	0,683	AC + DF + BG + EH	-0,002	0,745
B	0,028	≤ 0,001	AD + CF + EG + BH	0,000	0,959
C	0,007	0,315	AE + BF + DG + CH	0,009	0,183
D	-0,005	0,482	AF + CD + BE + GH	-0,004	0,516
E	0,017	0,014	AG + BC + DE + FH	-0,008	0,240
F	0,006	0,400	AH + BD + CE + FG	0,004	0,544
G	-0,005	0,477			
H	0,010	0,166			

Tabelle 6.4: Versuchsaufbau mit simultan variierten Glycerin- und Magnesiumchlorid-Konzentrationen. Die Anordnung der Datenpunkte entspricht einem *Central Composite Design* mit 2 Faktoren.

Ansatz	Glycerin, % (v/v)	MgCl ₂ , mM	12-Keto-UDCA-Anteil nach 24 h, %
1	17	15,00	51 ± 9 %
2	17	45,00	60 ± 15 %
3	35	15,00	57 ± 5 %
4	35	45,00	43 ± 4 %
5	14	30,00	24 ± 4 %
6	38	30,00	49 ± 4 %
7	26	8,79	55 ± 16 %
8	26	51,21	66 ± 16 %
9	26	30,00	62 ± 5 %
10	0	0,00	24 ± 4 %

lineare Regression konnten die Einflüsse jedes der Parameter ermittelt werden, die bestimmten Regressionskoeffizienten sind in Tabelle 6.3 aufgeführt. Anhand dieser Regressionskoeffizienten lässt sich erkennen, dass im untersuchten Konzentrationsbereich nur zwei der untersuchten Parameter, Glycerin und MgCl₂, mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ einen Effekt auf die Biotransformation erkennen lassen.

Beide Einflussgrößen wurden anschließend in einer weiteren Versuchsreihe erneut untersucht. Hierbei wurden die Konzentrationen an Glycerin (14 – 38 %, v/v) und MgCl₂ (9 – 51 mM) simultan variiert, wobei die Versuchsanordnung einem *Central Composite Design* entspricht. Als Referenz diente ein Ansatz ohne Zugabe von Glycerin und MgCl₂. Sämtliche Reaktionen wurden hierbei mit einer Zelldichte von OD 30 durchgeführt. Die einzelnen Reaktionsbedingungen und die 12-Keto-UDCA-Anteile nach 24 h Umsetzung sind in Tabelle 6.4 aufgezeigt. Zwar konnte aufgrund der hohen Standardabweichung kein zuverlässiges Regressionsmodell

erstellt werden, allerdings lässt sich aus den Daten erkennen, dass bei Einsatz von 26 % (v/v) Glycerin und 51 mM MgCl₂ (Ansatz 8) die höchste Produktkonzentration nach 24 h erzielt werden konnte, wohingegen die geringsten Produktkonzentrationen im Referenzansatz ohne Glycerin und MgCl₂ gemessen wurden.

6.1.5 Biotransformation im Litermaßstab

Auf Basis der bisherigen Ergebnisse sollte die Biotransformation im 1 L-Maßstab in einem Rührkesselreaktor durchgeführt werden, da hierbei eine pH-Regelung durchführbar ist und somit reproduzierbarere Ergebnisse zu erzielen sind. Auf Basis weiterer Vorversuche (Daten nicht gezeigt), konnte abgeschätzt werden, dass mit diesem Ganzzellbiokatalysator unter den zuvor ermittelten Bedingungen 70 mM DHCA innerhalb von 24 h zu ≥ 99 % zum Produkt 12-Keto-UDCA umgesetzt werden können. Für die Biotransformation wurde eine Zelldichte von OD 30, 70 mM DHCA, 500 mM Natriumformiat, 26 % (v/v) Glycerin und 50 mM MgCl₂ eingesetzt. Die Reaktion fand in einem 50 mM KPi-Puffer bei 25 °C statt, die pH-Regelung erfolgte mit Salzsäure (6 %, w/v) auf pH 6,5. Die im Reaktionsansatz vorliegenden Enzymaktivitäten waren für die 3 α -HSDH $0,31 \pm 0,02$ U mL⁻¹, für die 7 β -HSDH $0,26 \pm 0,01$ U mL⁻¹ sowie für die

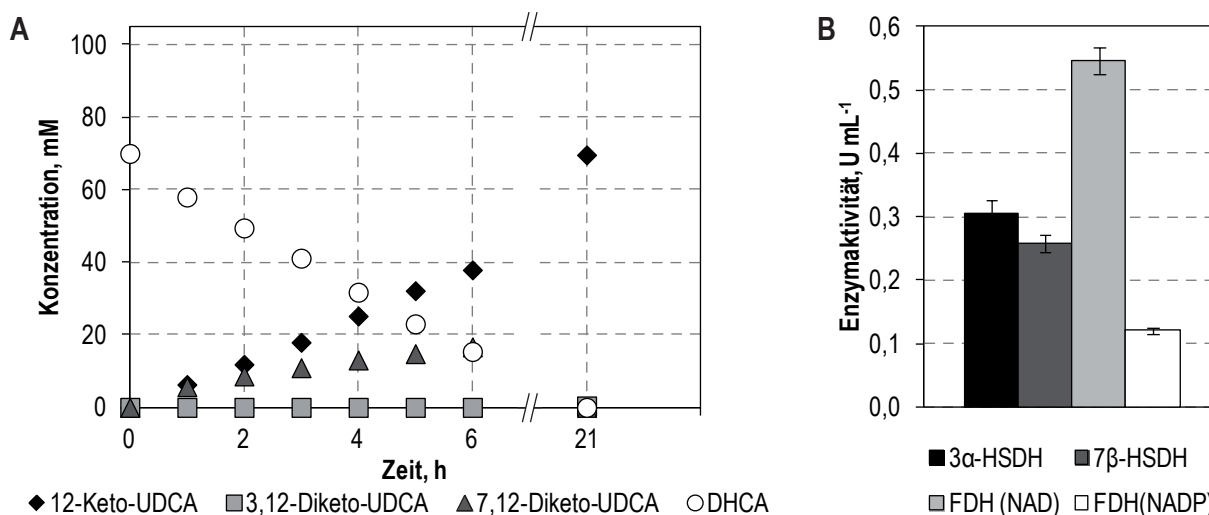


Abbildung 6.4: Ganzzellbiotransformation mit dem Stamm *E. coli* BL49 p7(G)r7(A)r3-A im 1L-Maßstab. Die Reaktion wurde bei 25 °C und pH 6,5 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.3 und 6.1.5. Gezeigt ist in **A** der zeitliche Verlauf der Gallensalzkonzentrationen während der Biotransformation sowie in **B** die im Reaktionsansatz vorliegenden Enzymaktivitäten.

FDH $0,55 \pm 0,02 \text{ U mL}^{-1}$ mit NAD als Kofaktor bzw. $0,12 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$ mit NADP als Kofaktor und sind in Abbildung 6.4 B gezeigt.

Der Verlauf der Biotransformationsreaktion ist in Abbildung 6.4 A dargestellt. Nach 21 h konnten 99,4 % 12-Keto-UDCA und 0,6 % 3,12-Diketo-UDCA nachgewiesen werden. Somit ist dieser Stamm in der Lage, innerhalb von 24 h 70 mM DHCA zu $\geq 99 \%$ zu 12-Keto-UDCA umzusetzen, wenn eine Zelldichte von OD 30 eingesetzt wird.

6.2 Ein-Zell-System mit monospezifischer Formiatdehydrogenase (FDH)

Der in Abschnitt 6.1 beschriebene Ansatz beruht auf der Verwendung einer NADH-abhängigen 3α -HSDH, einer NADPH-abhängigen 7β -HSDH und einer modifizierten FDH, die sowohl NADH als auch NADPH regeneriert. Dabei verfügt die modifizierte FDH über eine geringere Enzymaktivität als eine unmodifizierte FDH, die lediglich NAD als Kofaktor akzeptiert.

In diesem Abschnitt soll eine andere Herangehensweise untersucht werden, bei der eine unmodifizierte FDH, eine NADH-abhängige 3α -HSDH und eine modifizierte, NADH-akzeptierende 7β -HSDH verwendet wird. Hintergrund der Überlegung ist, dass hierbei eine schnellere Kofaktorregenerierung ermöglicht wird, was möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Gesamtreaktion ausübt.

6.2.1 Stammentwicklung

Für die Stammentwicklung wurde anstelle einer NADPH-abhängigen 7β -HSDH auf die zum Zeitpunkt dieser Arbeiten einzig verfügbare NADH-abhängige 7β -HSDH, die G39D-Mutante,

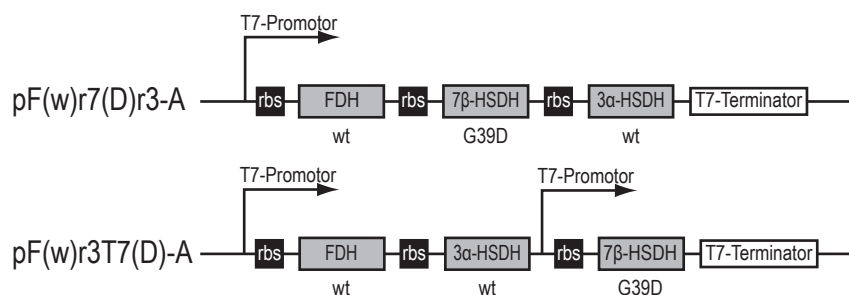


Abbildung 6.5: Vektorkonstrukte für das Ein-Zell-System mit monospezifischer FDH.

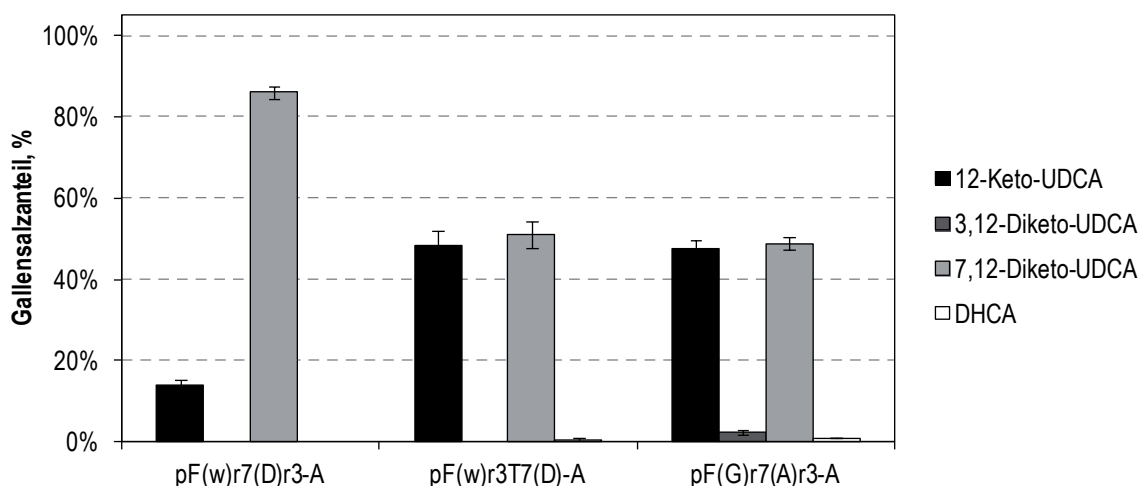


Abbildung 6.6: Vergleich der Ganzzellbiokatalysatoren mit NADH-abhängiger 7 β -HSDH (pF(w)r7(D)r3-A und pF(w)r3T7(D)-A) mit dem Referenzstamm *E. coli* BL49 pF(G)r7(A)r3-A, dem besten Stamm aus Abschnitt 6.1. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 25 °C und einem Anfangs-pH von 6,5 in einem Satzverfahren ohne pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in Abschnitt 4.7.2. Gezeigt sind die Gallensalzanteile nach 24 h Biotransformation. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

zurückgegriffen (vgl. Abschnitt 5.1). Die D221G-Mutante der FDH wurde durch das Wildtypenzym ersetzt. Zwei Vektorkonstrukte wurden hergestellt, pF(w)r7(D)r3-A und pF(w)r3T7(D)-A. Ersteres Konstrukt basiert auf dem letztendlich im Abschnitt 6.1 verwendeten Expressionsvektor, bei zweitem wurde die modifizierte 7 β -HSDH zur Erhöhung der Enzymexpression mit einem vorangeschaltetem T7-Promotor versehen, da diese 7 β -HSDH-Mutante eine deutlich niedrigere spezifische Enzymaktivität als die NADPH-abhängigen 7 β -HSDH-Varianten aufweist (vgl. Abbildung 6.5). Beide Vektorkonstrukte wurden in *E. coli* BL49 transformiert.

Die Stämme mit NADH-abhängiger 7 β -HSDH wurden im Schüttelkolben kultiviert und unter den gleichen, wie in Abschnitt 6.1.2 beschriebenen, Bedingungen in Ganzzellbiotransformationen eingesetzt.

In Abbildung 6.6 ist eine Gegenüberstellung der beiden Stämme mit NADH-abhängiger 7 β -HSDH mit dem Stamm *E. coli* BL49 pF(G)r7(A)r3-A nach 24 h Biotransformation zu sehen. Hierbei lässt sich erkennen, dass mit dem Stamm pF(w)r3T7(D)-A mit 48 ± 3 % 12-Keto-UDCA deutlich mehr Produkt gebildet werden kann als mit dem Stamm pF(w)r7(D)r3-A (14 ± 2 % 12-Keto-UDCA). Bei beiden Ansätzen akkumuliert zudem das Intermediat 7,12-Diketo-UDCA stark, was auf eine deutlich schnellere 3 α -HSDH-Reaktion als 7 β -HSDH-Reaktion hindeutet. Unter diesem Gesichtspunkt lässt sich die höhere Produktkonzentration mit

dem Stamm pF(w)r3T7(D)-A vermutlich mit einer höheren 7 β -HSDH-Expression erklären, was die oben erörterte Überlegung zur Erhöhung der 7 β -HSDH-Expression bestätigen würde. Im Vergleich zum Referenzstamm pF(G)r7(A)r3-A zeigt der neue Stamm pF(w)r3T7(D)-A keine wesentlichen Unterschiede in den Gallensalzkonzentrationen nach 24 h.

6.2.2 Biotransformation im Litermaßstab

Der Stamm *E. coli* BL49 pF(w)r3T7(D)-A wurde anschließend im Rührkesselreaktor kultiviert und eine Biotransformation im 1 L-Maßstab in einem Rührkesselreaktor durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen entsprechen den in Abschnitt 6.1.5 beschriebenen, nur dass 100 mM DHCA und Ammoniumformiat anstelle von Natriumformiat eingesetzt wurde.

Der Verlauf der Biotransformationsreaktion ist in Abbildung 6.7 dargestellt. Nach 11 h wurde die Reaktion abgebrochen, da zu dem Zeitpunkt keine wesentliche Änderung der Gallensalzkonzentrationen mehr zu beobachten war. Zum Abbruchszeitpunkt lagen 65 mM DHCA und 35 mM 7,12-Diketo-UDCA im Reaktionsansatz vor, somit konnte kein vollständiger Umsatz erzielt werden. Die Tatsache, dass 100 mM DHCA eingesetzt wurde, anstatt 70 mM DHCA, wie im Abschnitt 6.1.5, lässt erwarten, dass hierbei eine stärkere Substratinhibition erfolgte.

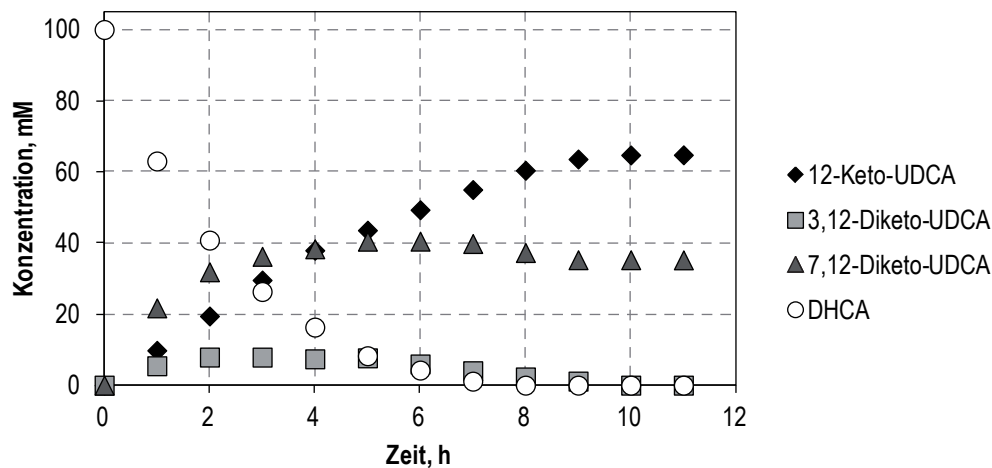


Abbildung 6.7: Ganzzellbiotransformation mit dem Stamm *E. coli* BL49 p7(w)r3T7(D)-A im 1 L-Maßstab. Die Reaktion wurde bei 25 °C und pH 6,5 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.3 und 6.1.5. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der Gallensalzkonzentrationen während der Biotransformation.

6.2.3 Diskussion

Die Biotransformation mit dem Stamm *E. coli* BL49 pF(w)r3T7(D)-A zeigte sowohl im Milliliter- als auch im Liter-Maßstab vielversprechende Ergebnisse und die Resultate schienen äquivalent zu denen des Stammes *E. coli* BL49 pF(G)r7(A)R3-A mit NADPH-spezifischer 7β -HSDH zu sein. Trotzdem wurde auf eine Weiterverfolgung dieses Ansatzes verzichtet. Ein Grund dafür war, dass dieser Stamm mit NADH-abhängiger 7β -HSDH zwar als äquivalent aber nicht als signifikant besser eingestuft wurde. Ein anderer Grund war, dass zu dem Zeitpunkt absehbar war, dass weitere NADH-abhängige 7β -HSDH-Mutanten mit höherer spezifischer Enzymaktivität verfügbar sein werden. Aus dem Grund wurden die Arbeiten an einem Ganzzellbiokatalysator mit monospezifischer FDH und NADH-abhängiger 7β -HSDH zurückgestellt, bis bessere Enzymmutanten zur Verfügung standen.

6.3 Zwei-Zell-System mit zwei verschiedenen Formiatdehydrogenasen

(FDH)

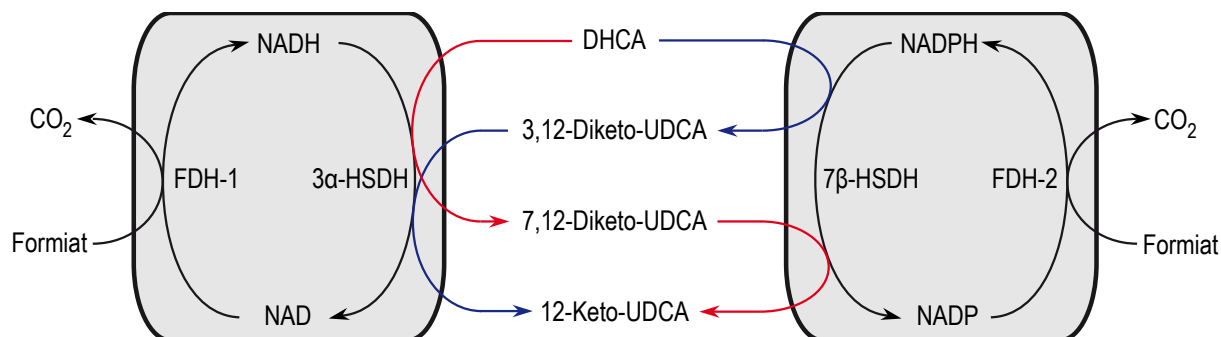


Abbildung 6.8: Schema des Zwei-Zell-Systems mit zwei verschiedenen FDH.

Die bisher beschriebenen Ansätze zur Ganzzell-Reduktion von DHCA basieren auf Ganzzellbiokatalysatoren, die alle drei benötigten Enzyme exprimieren. Die Idee des hier vorgestellten Ansatzes ist, die Ganzzell-Reduktion mit zwei verschiedenen Ganzzellbiokatalysatoren durchzuführen, die jeweils nur eine der beiden HSDH exprimieren. Beide Ganzzellbiokatalysatoren werden dabei zusammen in den Reaktionsansatz gegeben, wobei jeder Stamm nur die Reduktion einer Keto-Gruppe am Gallensalz katalysiert. Ein Schema dieses Ansatzes ist in Abbildung 6.8 gezeigt. Durch diesen Ansatz werden eine einfachere Stammentwicklung sowie mehr Einflussmöglichkeiten bei der Prozessführung der Biokatalyse ermöglicht.

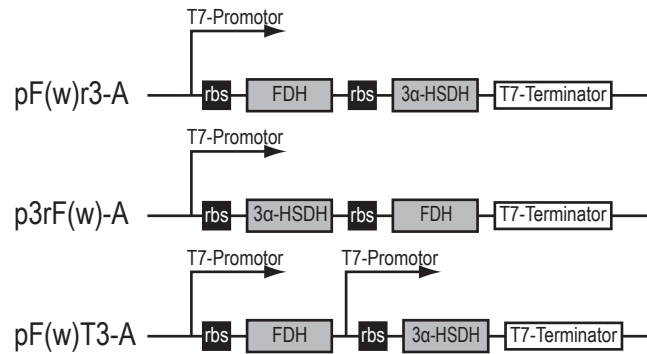


Abbildung 6.9: Vektorkonstrukte für die einstufige Reduktion mit der 3α -HSDH.

6.3.1 Stammentwicklung

Für diesen Ansatz ist die Entwicklung zweier Stämme erforderlich, die jeweils entweder 3α -HSDH oder 7β -HSDH exprimieren. Durch die Auftrennung der beiden HSDH auf verschiedene Stämme können hierbei unterschiedliche Enzyme für die Kofaktorregenerierung verwendet werden. Im Falle der 7β -HSDH wird weiterhin die NADP-akzeptierende FDH (D221G) verwendet; für die 3α -HSDH soll hingegen die Wildtyp-FDH verwendet werden, da diese höhere spezifische Enzymaktivitäten mit NAD aufweist.

Eine Stammentwicklung für Ganzzellbiokatalysatoren, die FDH und 7β -HSDH exprimieren, wurde bereits von Braun (2011) durchgeführt und soll in dieser Arbeit nicht wiederholt werden. Der für die weiteren Arbeiten verwendete Stamm *E. coli* BL49 pF(G)r7(A)-A unterscheidet sich von dem von Braun (2011) verwendeten Stamm lediglich darin, dass die aktivere G39A-Mutante der 7β -HSDH anstelle des Wildtyp-Enzyms eingesetzt wird.

Für die Entwicklung des Ganzzellbiokatalysators mit FDH und 3α -HSDH wurden die drei Expressionsvektoren pF(w)r3-A, p3rF(w)-A und pF(w)T3-A hergestellt (vgl. Abbildung 6.9) und in *E. coli* BL49 transformiert. Zusätzlich diente der Stamm *E. coli* BL49 pF(G)r3-A als Referenz, der die D221G-Mutante der FDH enthält.

6.3.2 Vergleich der Ganzzellbiokatalysatoren in Schüttelkolbenexpression

Die oben genannten Stämme wurden in Schüttelkolben kultiviert und in Ganzzellbiokatalyseansätzen eingesetzt. In Abbildung 6.10A sind die Gallensalzanteile nach 24 h Biotransformation gezeigt. Mit dem Stamm pF(G)r3-A mit der FDH (D221G) konnte nur 37 ± 1 % Umsatz erzielt

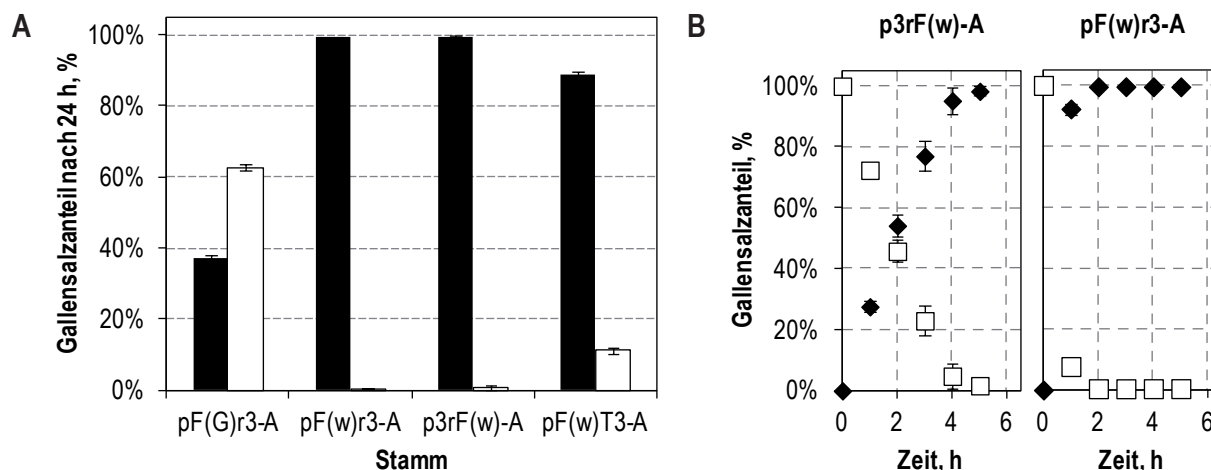


Abbildung 6.10: Vergleich der Ganzzellbiokatalysatoren für die einstufige Reduktion mit der 3α -HSDH. **A:** DHCA- (weiß) und 7,12-Diketo-UDCA-Konzentrationen (schwarz) nach 24 h Biotransformation, **B:** Verlauf der Biotransformation mit den Stämmen pF(w)r3-A und p3rF(w)-A in den ersten 5 h. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 25 °C und einem Anfangs-pH von 6,5 in einem Satzverfahren ohne pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in Abschnitt 4.7.2. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

werden, während mit den Stämmen mit der Wildtyp-FDH mindestens 89 ± 1 % Umsatz erreicht wurde. Von den beiden Stämmen pF(w)r3-A und p3rF(w)-A, mit denen nach 24 h ≥ 99 % Umsatz erzielt wurde, sind in Abbildung 6.10B zudem die zeitlichen Verläufe der Biotransformation in den ersten 5 h gezeigt. Hierbei lässt sich erkennen, dass mit pF(w)r3-A bereits nach 2 h ≥ 99 % Umsatz erzielt wurde, während der Umsatz beim Stamm p3rF(w)-A nach 5 h noch bei 98 % liegt. Somit wurde der Stamm *E. coli* BL49 pF(w)r3-A für weitere Arbeiten verwendet.

6.3.3 Optimierung der Biotransformation

Für die weiteren Arbeiten wurden die Stämme *E. coli* BL49 pF(w)r3-A und *E. coli* BL49 pF(G)r7(A)-A im Rührkesselreaktor kultiviert. Weiterhin wurde untersucht, ob die Substitution von Natriumformiat durch Ammoniumformiat sowie die Verwendung von Ameisensäure anstelle von Salzsäure zur pH-Regulation einen Einfluss auf die Biotransformation hat. Die Idee zur Verwendung von Ameisensäure beruht auf der Annahme, dass hierdurch durch die FDH-Aktivität verbrauchtes Formiat dem System wieder zugeführt wird.

Für die Reaktionsansätze wurden jeweils OD 15 von jedem Stamm eingesetzt, so dass die Gesamtbiokatalysatormenge wie in den Abschnitten zuvor OD 30 betrug. Es wurden fünf verschiedene Ansätze untersucht, jeweils ein Ansatz mit 500 mM Natriumformiat bzw. Ammoni-

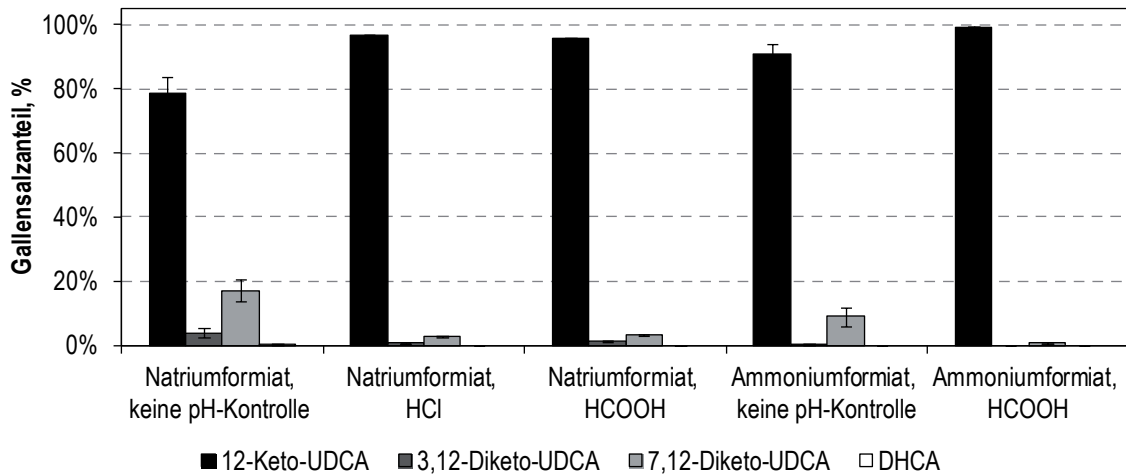


Abbildung 6.11: Vergleich von Biotransformationen mit verschiedenen Formiatformen und der Effekt einer pH-Kontrolle mit unterschiedlichen Säuren. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 25 °C und einem Anfangs-pH von 6,5 in einem Satzverfahren wahlweise mit oder ohne pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in Abschnitt 4.7.2. Gezeigt sind Gallensalzanteile nach 24 h Biotransformation. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

umformiat ohne pH-Kontrolle, dazu zwei Ansätze mit 500 mM Natriumformiat, die während der ersten 7 h der Biotransformation in Abständen von 30 min manuell mit Salzsäure bzw. Ameisensäure auf pH 6,5 eingestellt wurden. Hinzu kommt ein Ansatz mit 500 mM Ammoniumformiat, der mit Ameisensäure wie oben beschrieben auf pH 6,5 geregelt wurde. Weiterhin wurden jeweils 70 mM DHCA, 26 % Glycerin und 50 mM MgCl_2 eingesetzt. Die Gallensalzanteile nach 24 h Biotransformation sind in Abbildung 6.11 gezeigt.

Beim Vergleich der Ergebnisse ist bei den Ansätzen mit Natriumformiat als Kosubstrat zu sehen, dass sich die 12-Keto-UDCA-Anteile nach 24 h durch pH-Regelung von 79 % auf 97 % (Salzsäure) bzw. 96 % (Ameisensäure) steigern lassen, während hierbei die Art der verwendeten Säure keinen Einfluss zeigt. Durch die Substitution von Natriumformiat durch Ammoniumformiat konnte jedoch der 12-Keto-UDCA-Anteil nach 24 h auf 91 % (ohne pH-Regelung) bzw. ≥ 99 % (Regelung mit Ameisensäure) gesteigert werden. Somit zeigen die Verwendung von Ammoniumformiat und die Regelung des pH positive Einflüsse auf die Biotransformation, wohingegen die Art der verwendeten Säure keine Rolle zu spielen scheint.

6.3.4 Biotransformation im Litermaßstab

Auf Basis der obigen Ergebnisse sollte mit dem Zwei-Zell-System ebenfalls eine Biotransformation im 1 L-Maßstab bei 25 °C in einem Rührkesselreaktor im Satzverfahren durchgeführt

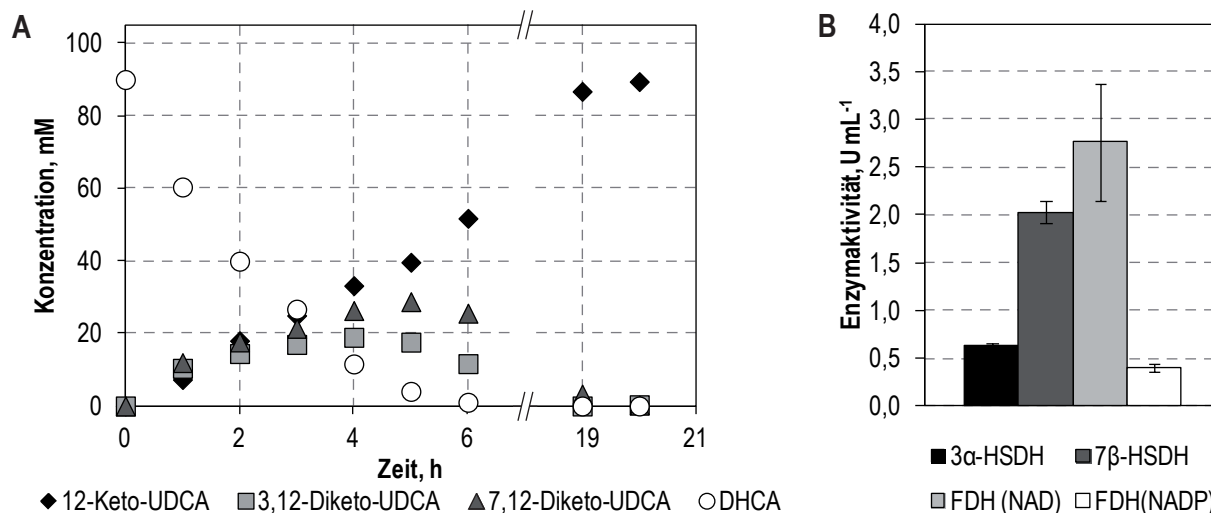


Abbildung 6.12: Biotransformation mit zwei verschiedenen Biokatalysatoren bei Einsatz von 90 mM DHCA im 1 L-Maßstab. Die Reaktion wurde bei 25 °C und pH 6,5 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.3 und 6.3.4. Dargestellt sind in **A** die Gallensalzkonzentrationen im Reaktionsmedium zu unterschiedlichen Prozesszeiten, sowie in **B** die im Reaktionsansatz vorliegenden Enzymaktivitäten.

werden. Dabei wurden jeweils OD 15 der Stämme *E. coli* BL49 pF(w)r3-A und *E. coli* BL49 pF(G)r7(A)-A, 90 mM DHCA, 500 mM Ammoniumformiat, 50 mM MgCl₂ in 50 mM KPi-Puffer eingesetzt, die pH-Regelung erfolgte mit Ameisensäure auf pH 6,5. Die eingesetzte Menge an DHCA basiert auf Ergebnissen von Vorversuchen (Daten nicht gezeigt), mit denen abgeschätzt wurde, dass diese Menge innerhalb von 24 h zu $\geq 99\%$ zu 12-Keto-UDCA umgesetzt werden kann. Die Aktivitäten der in den Ganzzellbiokatalysatoren vorliegenden prozessrelevanten Enzyme waren: FDH_{NADP}: 0,40 U mL⁻¹, FDH_{NAD}: 2,8 U mL⁻¹, 7β-HSDH: 2,0 U mL⁻¹, 3α-HSDH: 0,63 U mL⁻¹ (vgl. Abbildung 6.12 B). Der Verlauf der Gallensalzanteile über die Zeit ist in Abbildung 6.12 A dargestellt.

Insgesamt lässt sich erkennen, dass nach 20 h $\geq 99,4\%$ 12-Keto-UDCA gebildet wurde. Im Vergleich zum Ein-Zell-System mit dem Stamm *E. coli* BL49 pF(G)r7(A)r3-A wurde bei Einsatz der gleichen Gesamtdichte von OD 30 nach einer vergleichbaren Zeit (20 h gegenüber 21 h) ein vollständiger Umsatz erzielt, allerdings wurde im Zweizellansatz 29 % mehr Substrat eingesetzt (90 mM gegenüber 70 mM), so dass die Produktbildungsrate dementsprechend höher liegt.

6.4 Ein-Zell-System mit Glucosedehydrogenase (GDH)

Die bisherigen Ansätze basieren auf einer FDH als Kofaktorregenerierungsenzym. Als Alternative soll der Einsatz einer GDH untersucht werden. Diese verfügt im Vergleich zur FDH über deutlich höhere Enzymaktivitäten. Allerdings ist die mit der GDH-Reaktion verbundene Bildung von Gluconsäure und die dadurch bedingte Ansäuerung des Reaktionsansatzes problematisch für die Prozessführung.

6.4.1 Stammentwicklung

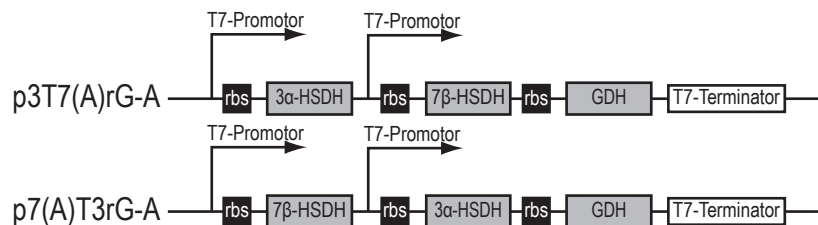


Abbildung 6.13: Vektorkonstrukte für das Ein-Zell-System mit GDH.

Als erster Schritt für die Herstellung GDH-basierter Stämme wurde dieses Enzym aus *B. subtilis* kloniert. Die Vorgehensweise ist in Abschnitt 4.4 beschrieben. Durch Sequenzierung wurde die Klonierung der korrekten Gensequenz bestätigt.

Der nächste Schritt war die Herstellung der beiden Expressionsvektoren p3T7(A)rG-A und p7(A)T3rG-A (vgl. Abbildung 6.13). Da die GDH eine um 1–2 Größenordnungen höhere spezifische Enzymaktivität als die FDH aufweist (Weckbecker *et al.*, 2010), wurden bei den neu konstruierten Plasmiden die beiden HSDH jeweils hinter T7-Promotoren angeordnet, während die GDH keinen vorangestellten zusätzlichen Promotor aufweist. Auf die Weise wurde versucht, die Expression der beiden HSDH zu erhöhen. Eine damit verbundene Verringerung der GDH-Expression wurde angesichts deren hoher spezifischer Enzymaktivität als tolerierbar eingestuft. Die Expressionsvektoren wurden anschließend in *E. coli* BL49 transformiert.

6.4.2 Vergleich der Ganzzellbiokatalysatoren in Schüttelkolbenexpression

Beide Stämme wurden in Schüttelkolben kultiviert und in Ganzzellbiotransformationsreaktionen eingesetzt. Da keine pH-Regelung erfolgte, wurde aufgrund des zu erwartenden pH-Abfalls

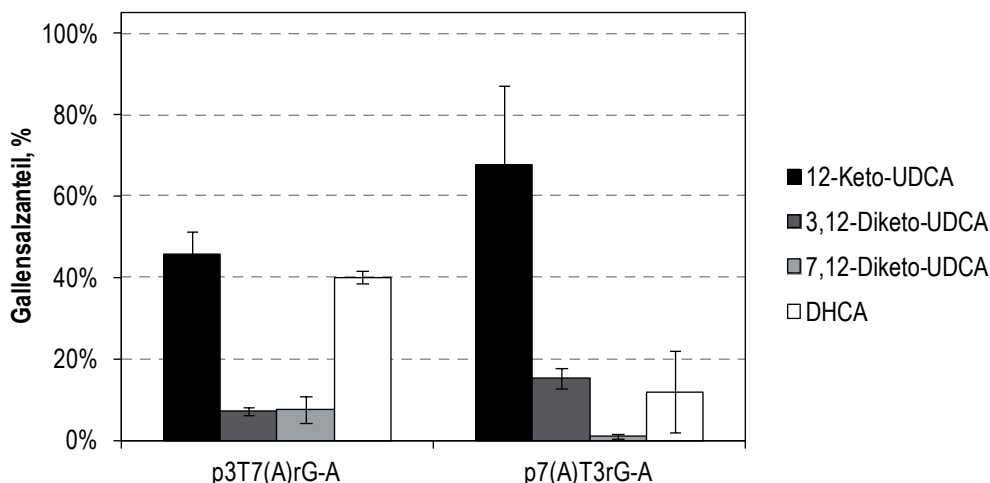


Abbildung 6.14: Vergleich beider Stämme des Ein-Zell-System mit GDH. Gezeigt sind die Gallensalzanteile nach 24 h Biotransformation. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 25 °C und einem Anfangs-pH von 7,3 in einem Satzverfahren ohne pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in Abschnitt 4.7.2. Die Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

ein anfänglicher pH von 7,3 gewählt (anstatt pH 6,5). Die Gallensalzanteile nach 24 h Biotransformation sind in Abbildung 6.14 dargestellt.

Die Ergebnisse der Ganzzellbiotransformation zeigen, dass mit dem Stamm p7(A)T3rG-A mit 68 ± 19 % 12-Keto-UDCA wesentlich mehr Produkt nach 24 h gebildet wurde als mit dem Stamm p3T7(A)rG-A (46 ± 6 % 12-Keto-UDCA). Damit wurde mit diesem Stamm in der Schüttelkolbenexpression deutlich mehr Produkt nach 24 h gebildet als mit allen FDH-Stämmen (maximal 48 % 12-Keto-UDCA).

6.4.3 Biotransformation im Litermaßstab

Für einen Vergleich mit den FDH-Stämmen wurde der Stamm *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A im Rührkesselreaktor kultiviert und ohne weitere Optimierung in einer Biotransformation im 1 L-Maßstab bei 25 °C im Satzverfahren eingesetzt. Dabei wurde wie zuvor eine Zelldichte von OD 30 verwendet, außerdem 100 mM DHCA, 500 mM Glucose, 10 mM MgCl₂, 50 mM KPi-Puffer (pH 6,5). Die pH-Regelung auf pH 6,5 erfolgte mit Natronlauge (5 M). Die Aktivitäten der in den Ganzzellbiokatalysatoren vorliegenden prozessrelevanten Enzyme waren: GDH_{NADP}: 9,4 U mL⁻¹, GDH_{NAD}: 9,9 U mL⁻¹, 7β-HSDH: 3,7 U mL⁻¹, 3α-HSDH: 1,5 U mL⁻¹ (vgl. Abbildung 6.15 B). Der Verlauf der Gallensalzanteile über die Zeit ist in Abbildung 6.15 A dargestellt.

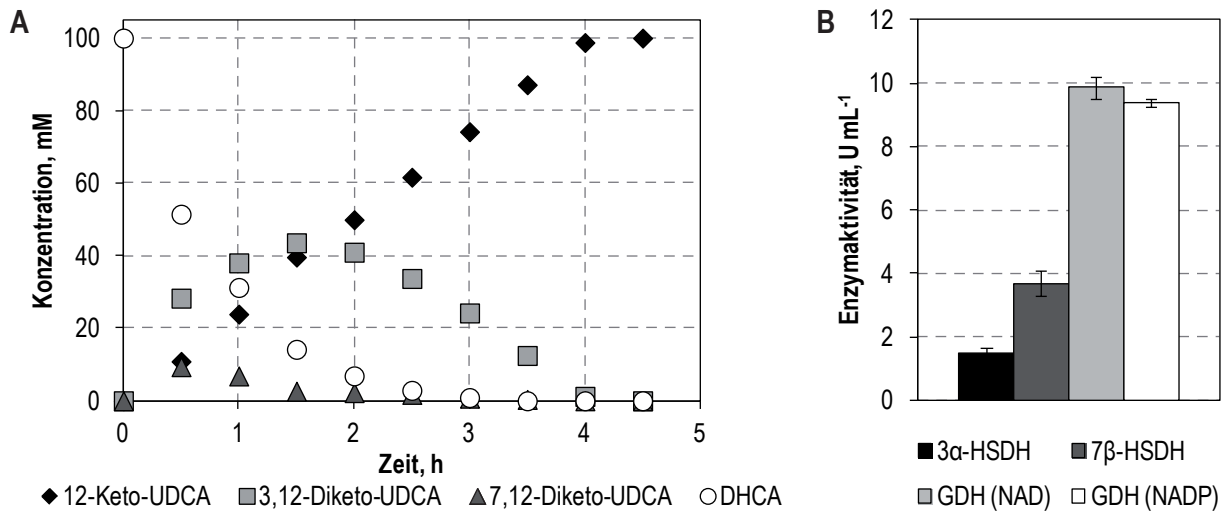


Abbildung 6.15: Biotransformation mit dem GDH-Stamm *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A bei Einsatz von 100 mM DHCA im 1 L-Maßstab. Die Reaktion wurde bei 25 °C und pH 6,5 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.3 und 6.4.3. Dargestellt sind in **A** die Gallensalzkonzentrationen im Reaktionsmedium zu unterschiedlichen Prozesszeiten, sowie in **B** die im Reaktionsansatz vorliegenden Enzymaktivitäten.

Wie zu erkennen ist, sind die 100 mM DHCA bereits nach 4,5 h zu ≥ 99 % zum Produkt 12-Keto-UDCA umgesetzt. Bei gleichen Biokatalysatorkonzentrationen schafft dieser Stamm im Vergleich zu den FDH-Stämmen die Umsetzung von 10–40 % mehr Substrat innerhalb eines Drittels der Zeit.

6.5 Diskussion

In diesem Kapitel wurden vier verschiedene Ansätze zur Ganzzellreduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA untersucht. Mit drei von den vier Ansätzen ist es im 1 L-Maßstab gelungen, mindestens 70 mM DHCA zu ≥ 99 % innerhalb von maximal 21 h zum Produkt 12-Keto-UDCA umzusetzen. Die Reaktionsverläufe dieser drei Ansätze sind in Abbildung 6.16 noch einmal gegenübergestellt.

Der Ein-Zell-Ansatz mit bispezifischer FDH (70 mM DHCA innerhalb von 21 h) und der Zwei-Zell-Ansatz mit zwei verschiedenen FDH (90 mM innerhalb von 20 h) erzielten vergleichbare Ergebnisse, mit einem geringen Vorteil auf Seiten des Zwei-Zell-Ansatzes.

Insgesamt ist die Entscheidung, ob ein Ein-Zell- oder ein Zwei-Zell-System favorisiert wird, eine Abwägung der jeweiligen Vor- und Nachteile. Zu den Vorteilen des Ein-Zell-Ansatzes

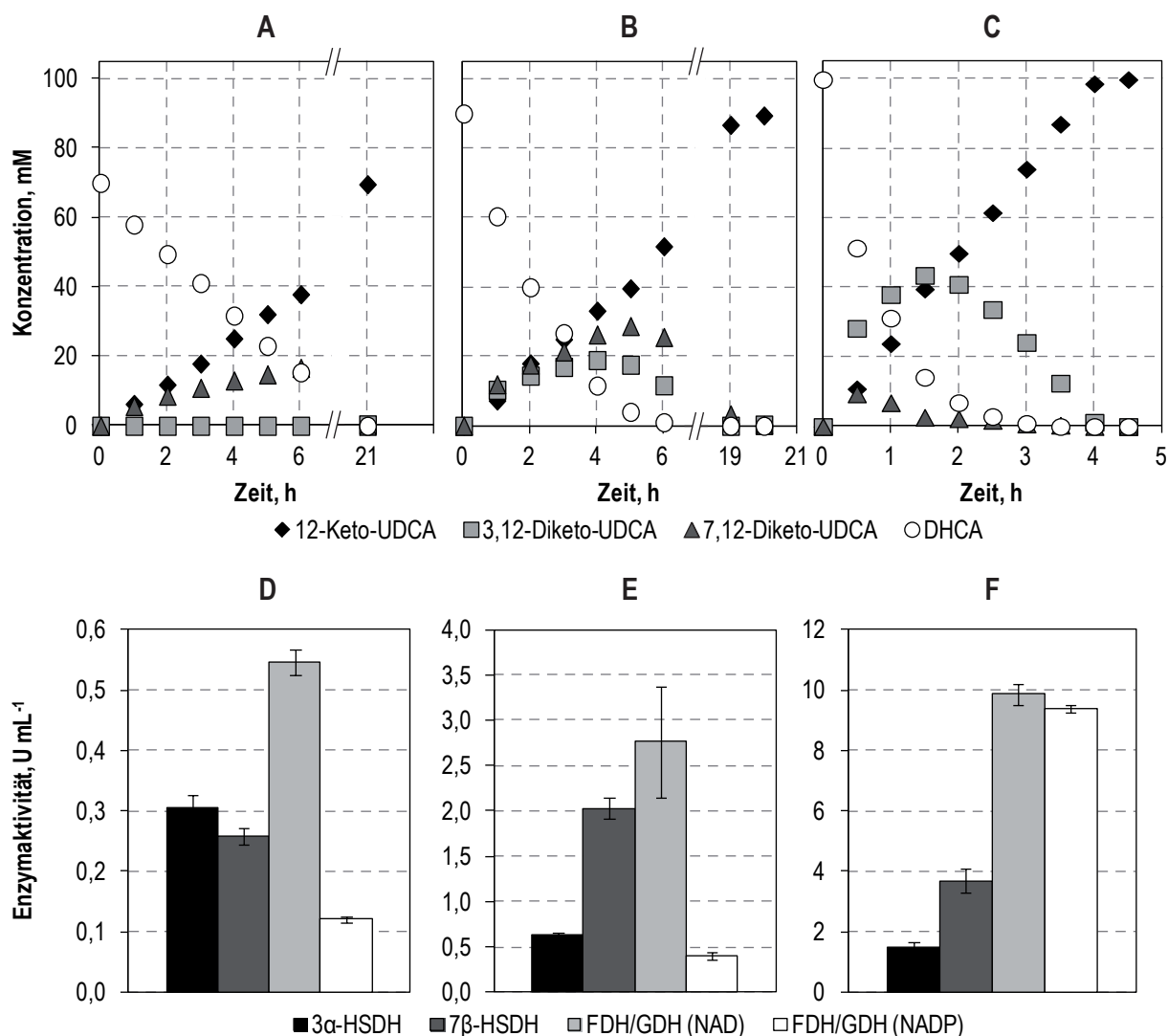


Abbildung 6.16: Vergleich der Biotransformationen im 1 L-Maßstab und der im Reaktionsansatz vorliegenden Enzymaktivitäten mit unterschiedlichen Ansätzen. Gezeigt sind Ein-Zell-System mit bispezifischer FDH (A und D), Zwei-Zell-System mit zwei verschiedenen FDH (B und E) sowie Ein-Zell-System mit GDH (C und F). Die Reaktionen wurden bei 25 °C und pH 6,5 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.3, 6.1.5, 6.3.4 und 6.4.3.

gehört, dass hierbei nur ein Biokatalysator hergestellt werden muss, was die Anzahl der erforderlichen Fermentationen verringert. Weiterhin ist beim Ein-Zell-Ansatz theoretisch eine Zellwandbarriere weniger vom Substrat zu überwinden, welcher oftmals retardierende Effekte auf das Eindringen und Austreten von Substraten und Produkten bei Ganzzellbiokatalyseprozessen zugeschrieben wird (Chen, 2007).

Die Vorteile des Zwei-Zell-Ansatzes sind hingegen, dass zum einen maßgeschneiderte Kofaktorregenerierungsenzyme verwendet werden können, insbesondere wenn unterschiedliche Kofaktoren von den Synthesenzymen benötigt werden. Weiterhin ist die Stammentwicklung

einfacher, da im Zwei-Zell-System die Expression von nur zwei Enzymen aufeinander abgestimmt werden müssen. Diese Vorteile lässt sich auch an den insgesamt höheren Enzymaktivitäten des Zwei-Zell-Ansatzes erkennen. Diese Effekte scheinen in diesem Fall den Nachteil einer zusätzlichen Zellwand aufzuwiegen, da im Falle des Zwei-Zell-Systems keine verlangsamte Biotransformation festgestellt wurde. Ein weiterer Vorteil des Zwei-Zell-Ansatzes ist, dass unterschiedliche Mengen des jeweiligen Ganzzellbiokatalysators eingesetzt werden können, um Unterschiede in den Geschwindigkeiten der Einzelreaktionen auszugleichen. Dieser Aspekt wurde allerdings in dieser Arbeit nicht näher untersucht, da in dem vorliegenden Beispiel keines der beiden Zwischenprodukte übermäßig akkumuliert und somit keine Notwendigkeit der Anpassung der Biokatalysatorzusammensetzung bestand.

Weiterhin wurden in diesem Kapitel zwei häufig verwendete Enzyme zur Regenerierung von Nicotinamid-Kofaktoren verglichen: zum einen FDH (Shaked & Whitesides, 1980; Bommarius *et al.*, 1998; Kratzer *et al.*, 2008) und zum anderen GDH (Eguchi *et al.*, 1992; Yun *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009). Bei der Festlegung, welches der Enzyme favorisiert wird, spielen neben der spezifischen Enzymaktivität eine Reihe weiterer Faktoren eine Rolle. Zum einen die Auswirkung der Kofaktorregenerierung auf den pH: während die GDH Gluconsäure produziert und somit zu einem Abfall des pH im Reaktionsansatz führt, bewirkt das Entweichen von CO₂, welches von der FDH gebildet wird, ein Ansteigen des pH im Reaktionsansatz. Beides ist jedoch nur von Belang, sofern keine pH-Regelung erfolgt. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Stabilität der Enzyme in Gegenwart sämtlicher Reaktanden und Produkte, was für jeden Einzelfall geprüft werden muss (Fu, 2013). Eine weitere Überlegung, die speziell bei der Verwendung von Fusionsproteinen von Belang sein kann, ist, ob das jeweilige Enzym nur in seiner polymeren oder auch in der monomeren Form aktiv ist (Hölsch, 2009). Wichtig ist auch, ob NADH, NADPH oder sogar beide Kofaktoren regeneriert werden sollen. Die FDH besitzt lediglich eine native Aktivität für NAD, jedoch existieren modifizierte Varianten, die beide Kofaktoren mit jeweils verringerter Enzymaktivität akzeptieren (Tishkov & Popov, 2006; Hölsch & Weuster-Botz, 2010). Die GDH, hingegen, regeneriert NAD und NADP gleichermaßen gut, wodurch sie besonders dann geeignet ist, wenn beide Kofaktoren regeneriert werden sollen. Im vorliegenden Fall konnte dadurch auf die Verwendung modifizierter HSDH mit geänderter Kofaktorspezifität verzichtet werden.

In den Experimenten dieses Kapitels konnten mit dem Ein-Zell-Ansatz mit GDH die besten Ergebnisse erzielt werden (100 mM DHCA innerhalb von 4,5 h). Verglichen mit dem Ein-Zell-Ansatz mit bispezifischer FDH wurden 43 % mehr DHCA innerhalb von nur 21 % der Prozesszeit zu 12-Keto-UDCA umgewandelt. Der Vorteil dieses Ansatzes ist in dem Fall auf die deutlich höheren spezifischen Enzymaktivitäten der GDH (375 U mg^{-1} , Hilt *et al.*, 1991) gegenüber der modifizierten FDH (1.0 U mg^{-1} für NADP, Hölsch & Weuster-Botz, 2010) zurückzuführen. Ähnliche Beobachtungen wurden von Yamamoto *et al.* (2005) berichtet. Aufgrund der hohen spezifischen Enzymaktivität der GDH konnten deren Expression verringert und dadurch die der beiden HSDH erhöht werden, während die GDH trotzdem mit ausreichender Aktivität exprimiert wird. Dadurch konnten mit dem GDH-System insgesamt höhere Enzymaktivitäten erzielt werden, was der Grund für den deutlichen Vorteil dieses Ansatzes sein dürfte. Für die weiteren Arbeiten bedeutet dies, dass ausschließlich der Ein-Zell-Ansatz mit GDH zur Kofaktorregenerierung weiterverfolgt wird.

7 Optimierung der Ganzzellbiokatalyse

Auf Basis der Ergebnisse des vorangegangenen Kapitels erfolgt in diesem Kapitel eine genauere Charakterisierung der Ganzzellbiotransformation des Ein-Zell-Systems mit GDH. Hierbei werden vor allem Kultivierungsbedingungen, Reaktionsbedingungen der Ganzzellbiokatalyse sowie die Stabilität der Ganzzellbiokatalysatoren näher untersucht.

7.1 Vergleich von Stämmen und Kultivierungsbedingungen

7.1.1 Klonierung

Basierend auf dem Expressionsvektor p7(A)T3rG-A (vgl. Abschnitt 6.4.1) wurden zwei weitere Expressionsvektoren p7(A)T3rG-K und p7(A)T3TG-A kloniert. Der Vektor p7(A)T3rG-K verfügt über die identische Expressionskassette wie der zuvor beschriebene Vektor p7(A)T3rG-A, unterscheidet sich jedoch im Plasmidrückgrat, welches auf einem pET28a(+) basiert und somit über einen Kanamycinresistenz-Selektionsmarker verfügt. Das Plasmid p7(A)T3TG-A verfügt im Unterschied zu p7(A)T3rG-A über einen zusätzlichen, dem Gen für die GDH vorgeschalteten T7-Promotor, wodurch höhere Expressionlevel der GDH zu erwarten sind. Die Expressionskassetten beider neuen Vektoren sind in Abbildung 7.1 dargestellt.

Das Plasmid p7(A)T3TG-A wurde wie alle vorher genannten Expressionsvektoren in *E. coli* BL49 transformiert. Da *E. coli* BL49 über eine genomisch codierte Kanamycinresistenz verfügt, musste für den Expressionsvektor p7(A)T3rG-K der Wirtstamm *E. coli* BLLiu gewählt werden, welcher keine genomisch codierten Antibiotikaresistenzen aufweist und bei dem es sich ebenfalls um ein BL21(DE3)-Derivat mit ausgeschaltetem 7α -HSDH-Gen handelt.

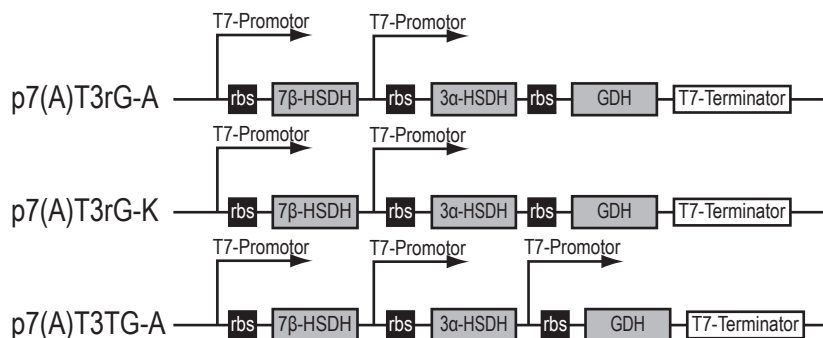


Abbildung 7.1: Vektorkonstrukte.

7.1.2 Vergleich unterschiedlicher Stämme

Alle drei Stämme wurden gemäß Abschnitt 4.3.2 im Rührkesselreaktor kultiviert. Die hierbei erzielten Zelldichten, Biotrockenmassekonzentrationen und spezifischen Enzymaktivitäten sind in Tabelle 7.1 aufgeführt. Im Vergleich der drei Stämme ist zu sehen, dass mit allen drei vergleichbare Zelldichten und Biomassekonzentrationen erzielt wurden. Die Aktivität der 3α-HSDH ist bei dem Stamm p7(A)T3rG-A mit $147 \pm 3 \text{ U g}_{BTM}^{-1}$ am höchsten und bei dem Stamm p7(A)T3TG-A mit $69 \pm 1 \text{ U g}_{BTM}^{-1}$ am niedrigsten, während der Stamm p7(A)T3rG-K mit $102 \pm 5 \text{ U g}_{BTM}^{-1}$ in der Mitte liegt. Bei der Aktivität der 7β-HSDH liegt der Stamm p7(A)T3rG-A mit $296 \pm 5 \text{ U g}_{BTM}^{-1}$ etwas niedriger als die anderen beiden Stämme ($477\text{--}490 \text{ U g}_{BTM}^{-1}$). Bei den Aktivitäten der GDH sind die Werte der Stämme p7(A)T3rG-A und p7(A)T3rG-K nahezu identisch, während der Stamm p7(A)T3TG-A mit dem zusätzlichen T7-Promotor vor der GDH die in etwa dreifache GDH-Aktivität aufweist. Insgesamt betrachtet sind mit Ausnahme der GDH-Aktivität bei dem Stamm p7(A)T3TG-A sämtliche Kennzahlen dieser drei Stämme äußerst ähnlich.

Die Biokatalysatoren wurden ebenfalls in Biotransformationsreaktionen im 1 L-Maßstab im Rührkesselreaktor miteinander verglichen. Dabei wurden jeweils eine Zelldichte von OD 2,

Tabelle 7.1: Vergleich unterschiedlicher Ganzzellbiokatalysatoren in der Rührkesselkultivierung.

	Stamm		
	p7(A)T3rG-A	p7(A)T3rG-K	p7(A)T3TG-A
OD, –	77 ± 1	69 ± 2	62 ± 1
BTM, $\text{g}_{BTM} \text{ L}^{-1}$	40 ± 2	33 ± 2	37 ± 1
3α-HSDH, U g_{BTM}^{-1}	147 ± 3	102 ± 5	69 ± 1
7β-HSDH, U g_{BTM}^{-1}	296 ± 5	477 ± 21	490 ± 40
GDH (NAD), U g_{BTM}^{-1}	569 ± 10	640 ± 40	1830 ± 100
GDH (NADP), U g_{BTM}^{-1}	595 ± 23	569 ± 5	1950 ± 60

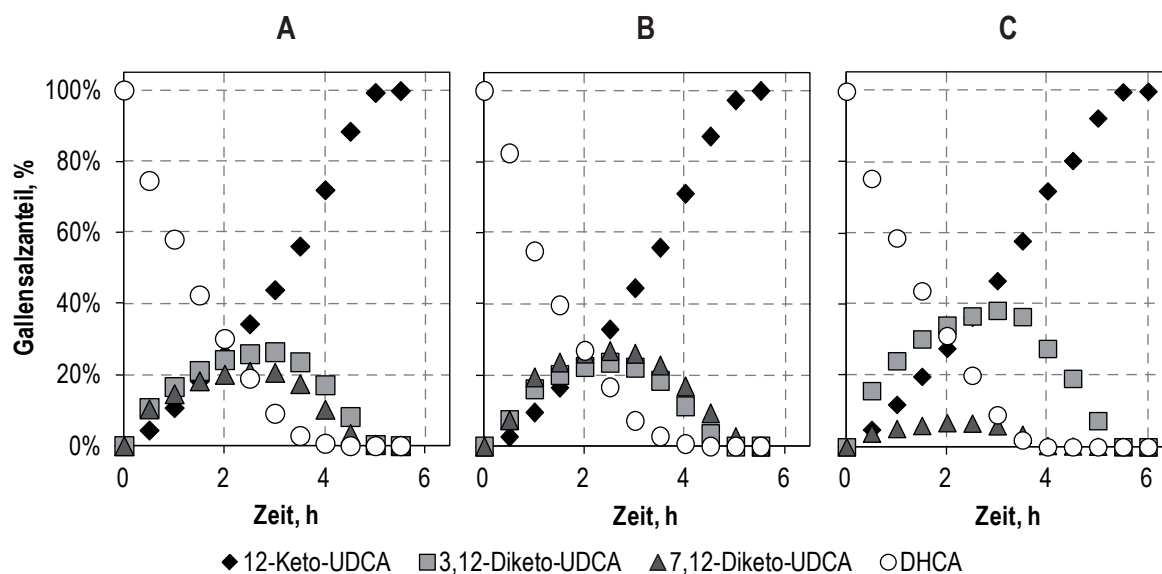


Abbildung 7.2: Vergleich der Biotransformation mit unterschiedlichen GDH-Stämmen im Rührkesselreaktor. Gezeigt ist **A:** der Stamm *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A, **B:** der Stamm *E. coli* BLLiu p7(A)T3rG-K sowie **C:** der Stamm *E. coli* BL49 p7(A)T3TG-A. Die Reaktionen wurden im 1 L-Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.3 und 7.1.2.

70 mM DHCA, 350 mM Glucose, 50 μ M NAD, 10 μ M NADP und 10 mM $MgCl_2$ eingesetzt. Der pH wurde auf 7,0 durch Zugabe von Natronlauge (5 M) geregelt. Die Verläufe der Biotransformationen sind in Abbildung 7.2 zu sehen. Wie aus den Diagrammen zu erkennen ist, sind die Verläufe der Substrat- und Produktkonzentrationen (DHCA und 12-Keto-UDCA) bei allen drei Stämmen nahezu identisch. Bei den Stämmen p7(A)T3rG-A und p7(A)T3rG-K sind die Umsetzungen nach 5,5 h, beim Stamm p7(A)T3TG-A nach 6,0 h vollständig. Die Verläufe der Intermediate 3,12- und 7,12-Diketo-UDCA sind bei den Stämmen p7(A)T3rG-A und p7(A)T3rG-K nahezu parallel, während beim Stamm p7(A)T3TG-K eine Akkumulation der 3,12-Diketo-UDCA erfolgt, die vermutlich mit der geringen Aktivität der 3α -HSDH zusammenhängt (vgl. Tabelle 7.2).

In der Gesamtbetrachtung lässt sich konstatieren, dass sich die Stämme *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A und *E. coli* BLLiu p7(A)T3rG-K kaum voneinander unterscheiden, was zu erwarten ist, da beide Stämme über die identische Expressionskassette verfügen und sich darüber hinaus nur in der Art des Knockouts im Wirtstamm und dem Selektionsmarker unterscheiden. Der Stamm *E. coli* BL49 p7(A)T3TG-A zeigt hingegen geringe Unterschiede zu den zwei zuvor genannten. Aufgrund des parallelen Verlaufs der Intermediate während der Biotransformation sind jedoch die beiden erstgenannten Stämme zu bevorzugen. Die Frage, welcher Selektions-

marker – ob Ampicillin oder Kanamycin – zu bevorzugen ist, ist abhängig von den Prozessen des jeweiligen Zellherstellers und kann abhängig vom Zulieferer unterschiedlich bewertet werden. Da beide Stämme in ihren Kernparametern äquivalent sind, wird deswegen im weiteren Verlauf mit beiden Stämmen weitergearbeitet.

7.1.3 Vergleich von Kultivierungsbedingungen

Für eine industrielle Umsetzung der Biotransformation ist die Robustheit eines Prozesses ein wichtiger Faktor. Deswegen soll untersucht werden, wie sich Modifikationen in der Rührkesselkultivierung auf die Leistung der Ganzzellbiokatalysatoren auswirken. Am Beispiel des Stammes *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A wurden deswegen Reaktionsbedingungen variiert und deren Auswirkungen auf die Kennzahlen des Stammes untersucht. Als Referenz dient das in Abschnitt 4.3.2 beschriebene Protokoll mit einer Expressionstemperatur von 20 °C (Kultivierung A), diese Daten sind bereits in Abschnitt 7.1.2 gezeigt. In der ersten Variation wurde die Expressionstemperatur auf 30 °C erhöht, da eine aktive Kühlung des Reaktors im industriellen Maßstab sehr energieintensiv ist (Kultivierung B). Eine zweite Variation war die Verlängerung der exponentiellen Wachstumsphase um 4 h, wodurch die Induktion der Proteinexpression bei einer planmäßigen Biomassekonzentration von $28 \text{ g}_{BTM} \text{ L}^{-1}$ statt $16 \text{ g}_{BTM} \text{ L}^{-1}$ erfolgt (Kultivierung C). Bei der dritten Variation wurde die Kultivierung in einem 75 L Edelstahlreaktor gemäß Abschnitt 4.3.3 durchgeführt, bei dem diverse Prozessparameter maßstabsbedingt angepasst werden mussten, die Glucosekonzentration in der Satzphase verfünffacht wurde, und zusätzlich Überdruck zur Gewährleistung eines ausreichenden Sauerstoffeintrags angelegt wurde (Kultivierung D). Eine Übersicht über die Kultivierungsbedingungen, die erzielten Zelldichten, Biotrockenmassekonzentrationen und spezifische Enzymaktivitäten ist in Tabelle 7.2 gezeigt.

Im Vergleich der vier Kultivierungen ist zu sehen, dass beiden Kultivierungen A und B, bei dem das gleiche Zulaufprotokoll angewandt wurde, vergleichbare Biomassekonzentrationen erzielt wurden, auch wenn die optische Dichte bei Kultivierung B geringfügig geringer ausfällt. Durch Verlängerung der Zulaufphase bei Kultivierung C kann die Biomassekonzentration im Vergleich zur Referenzkultivierung A von 40 ± 2 auf $49 \pm 1 \text{ g}_{BTM} \text{ L}^{-1}$ und die optische Dichte von 77 ± 1 auf 94 ± 1 gesteigert werden. Die höchsten Biomassekonzentrationen

Tabelle 7.2: Vergleich unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen für *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A. Gezeigt sind die jeweiligen Prozessparameter Anfangsvolumen (V_0), Satzglucosekonzentration ($c_{S,0}$), angelegter Überdruck (Δp), eingestellte Wachstumsrate in der substratlimitierten Wachstumsphase (μ_{Set}), Induktionszeitpunkt nach Beginn der Zulaufphase ($t_{Induktion}$), planmäßige Biomassekonzentration zum Zeitpunkt der Induktion ($c_{X,Induktion}$) sowie Expressionstemperatur ($T_{Expression}$). Weiterhin sind die jeweils erzielten Zelldichten, Biotrockenmassenkonzentrationen und Enzymaktivitäten zum Erntezeitpunkt gezeigt.

	Kultivierung			
	A	B	C	D
V_0, L	3	3	3	32
$c_{S,0}, g L^{-1}$	2	2	2	10
$\Delta p, bar$	0	0	0	1
μ_{Set}, h^{-1}	0,15	0,15	0,15	0,13
$t_{Induktion}, h$	19	19	23	19
$c_{X,Induktion}, g_{BTM} L^{-1}$	16	16	28	40
$T_{Expression}, ^\circ C$	20	30	20	20
OD, –	77 ± 1	60 ± 1	94 ± 1	133 ± 1
BTM, $g_{BTM} L^{-1}$	40 ± 2	39 ± 2	49 ± 1	68 ± 3
3α-HSDH, U g_{BTM}^{-1}	147 ± 3	68 ± 1	189 ± 24	105 ± 11
7β-HSDH, U g_{BTM}^{-1}	296 ± 5	331 ± 7	299 ± 15	419 ± 9
GDH (NAD), U g_{BTM}^{-1}	569 ± 10	491 ± 20	647 ± 20	511 ± 7
GDH (NADP), U g_{BTM}^{-1}	595 ± 23	437 ± 14	706 ± 27	456 ± 32

nen ($68 \pm 3 g_{BTM} L^{-1}$) und Zelldichten (OD 133 ± 1) wurden bei der Kultivierung D erzielt, die als Hochzelldichtekultivierung konzipiert war. Die spezifischen Enzymaktivitäten aller drei Enzyme ist zwischen den Fermentationen hingegen recht ähnlich.

Die Biokatalysatoren der einzelnen Kultivierungen wurden ebenfalls in Biotransformationsreaktionen im 1 L-Maßstab im Rührkesselreaktor miteinander verglichen. Die Reaktionsbedingungen sind identisch mit denen in Abschnitt 7.1.2. Die Verläufe der Biotransformationen sind in Abbildung 7.3 zu sehen. Wie aus den Diagrammen zu erkennen ist, sind die Verläufe der Gallensalzkonzentrationen unter Verwendung der Zellen der vier verschiedenen Kultivierungen nahezu identisch. Die Umsetzungen bei den Kultivierungen A, B und C sind nach 5,5 h vollständig, bei der Hochzelldichtekultivierung D nach 6,5 h. Da bei der Biotransformation immer die gleiche Biomassekonzentration eingesetzt wurde, ist die Hochzelldichtekultivierung trotz der leicht verlängerten Prozesszeiten bei der Biotransformation die favorisierte Methode für die Zellherstellung, da hierbei 70 % höhere Biotrockenmassenkonzentrationen erzielt werden. Wichtiger noch als diese Erkenntnis ist, dass der untersuchte Ganzzellbiokatalysator äußerst robust auf veränderte Kultivierungsbedingungen wie Expressionstemperatur, Zulaufprotokoll, Zeitpunkt der Induktion, Überdruck und nicht zuletzt Reaktorgeometrie und Maßstab der Kultivierung reagiert. Diese Erkenntnis nährt die Hoffnung, dass eine Maßstabsver-

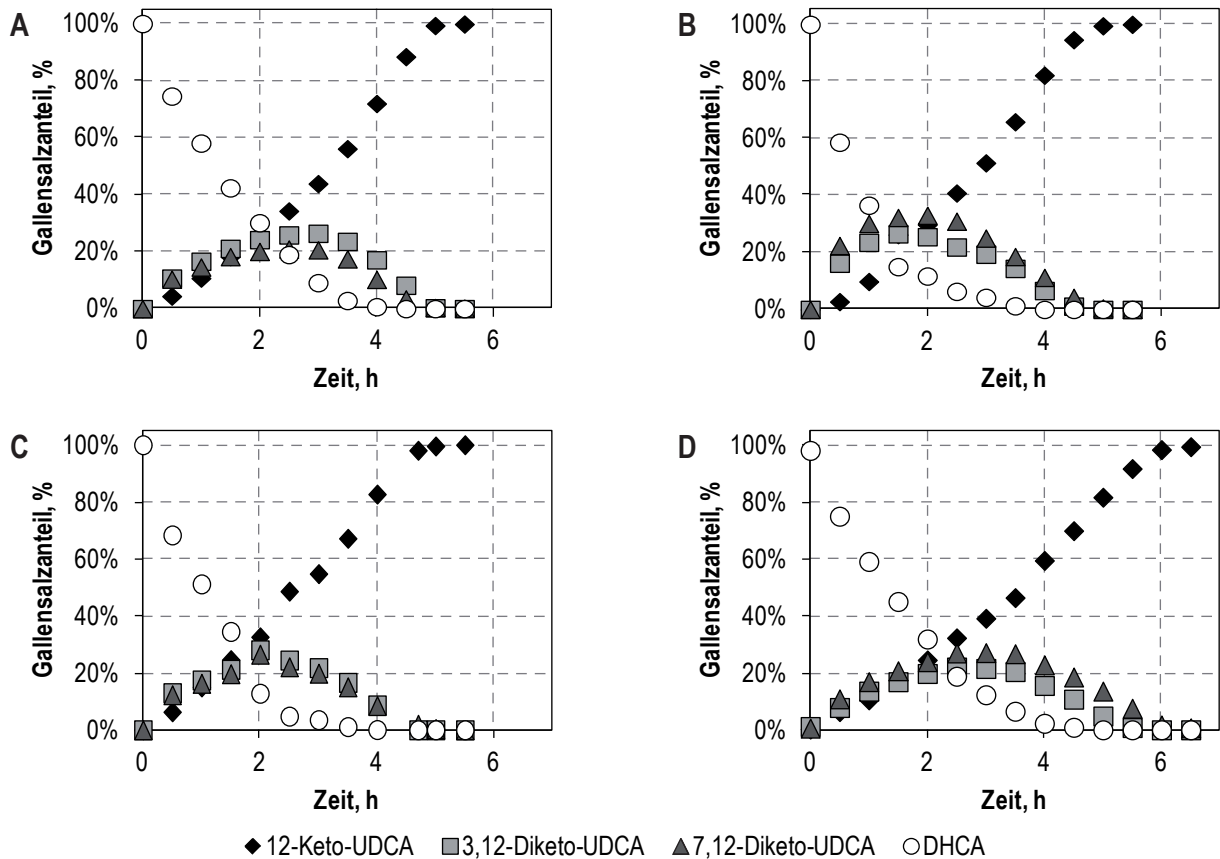


Abbildung 7.3: Vergleich der Biotransformation mit *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A nach unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen bei der Biokatalysatorherstellung. Gezeigt ist **A:** Kultivierung im 7,5 L-Reaktor nach Standardbedingung, **B:** Kultivierung im 7,5 L-Reaktor mit erhöhter Expressionstemperatur von 30 °C, **C:** Kultivierung im 7,5 L-Reaktor mit verlängerter Wachstumsphase und **D:** Hochzelldichtekultivierung im 75 L-Reaktor. Die Reaktionen wurden im 1 L-Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.3 und 7.1.2.

größerung in den industriellen Kubikmetermaßstab ohne größere Komplikationen realisierbar ist.

7.2 Lagerung von Ganzzellbiokatalysatoren

Im zu entwickelnden Industrieprozess sollen die Schritte Biokatalysatorherstellung (Fermmentation) und Biokatalysereaktion in zwei getrennten Prozessschritten durchgeführt werden. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass dadurch beide Schritte in unterschiedlichen Anlagen und an unterschiedlichen Orten durchgeführt werden können. Da bei der Biokatalysatorherstellung wesentlich höhere Biomassekonzentrationen erreicht werden als für die Biokatalyse benötigt wird, kann nach einmaliger Biokatalysatorherstellung die Biokatalysereaktion mit der gleichen

Zellcharge mehrmals durchgeführt werden, was die Reproduzierbarkeit der Biokatalyse verbessert. Hierdurch bedingt sich die Frage, auf welche Art Ganzzellbiokatalysatoren über einen möglichst langen Zeitraum stabil gelagert werden können.

7.2.1 Lagerstabilität

Eine Einflussgröße auf die Stabilität enzymatischer Biokatalysatoren ist die Lagertemperatur. Deswegen wurde die Stabilität bei -20 °C (Gefrierraumtemperatur), 4 °C (Kühlraumtemperatur) und 30 °C (Prozesstemperatur / Raumtemperatur) untersucht. Zusätzlich wurde ein Szenario untersucht, bei dem die Zellen zunächst 8 Tage bei 4 °C und anschließend bei -20 °C gelagert werden. Dies soll simulieren, dass die Zellen an einem Ort hergestellt und per Kühltransport an den Zielort geliefert werden, wo diese anschließend bei -20 °C gelagert werden. Hierzu wurden Zellen des Stammes *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A bei den oben genannten Bedingungen gelagert. Mit diesen Zellen wurden über einen Zeitraum von 44 Tagen (bei 4 °C und 30 °C gelagerte Zellen) bzw. 100 Tagen (bei -20 °C gelagerte Zellen) Biotransformationen durchgeführt, bei denen OD 5 an Zellen eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse dieser Messreihen sind in Abbildung 7.4 gezeigt. Aus der Darstellung lässt sich entnehmen, dass sich mit den bei -20 °C gelagerten Zellen über 100 Tage hinweg konstant ca. 50 – 60 % 12-Keto-UDCA-Anteil nach 1 h Biotransformation erzielen lässt. Mit den bei 30 °C gelagerten Zellen lässt sich anfangs knapp 80 % 12-Keto-UDCA-Anteil nach 1 h erzielen, dieser Wert fällt innerhalb von 44 Tagen auf 45 – 55 %. Die bei 4 °C gelagerten Zellen erzielen zu Beginn der Messreihe lediglich 2,5 % 12-Keto-UDCA-Anteil nach 1 h, dieser Wert steigt mit zunehmender Lagerdauer allerdings kontinuierlich und stabilisiert sich nach 32 Tagen bei 65 – 75 %. Werden die bei 4 °C gelagerten Zellen jedoch nach 8 Tagen bei -20 °C eingefroren, so lässt sich über die restliche Dauer der Messreihe ein stabiler 12-Keto-UDCA-Anteil von 70 – 80 % erzielen.

Der scheinbar paradoxe Aktivitätsverlauf der bei 4 °C gelagerten Zellen wurde in einer zweiten Messreihe mit dem Stamm *E. coli* BLLiu p7(A)T3rG-K erneut untersucht und ließ sich reproduzieren (Daten nicht gezeigt). Eine FACS-Analyse sollte in dieser Messreihe Aufschluss über die Ursache dieses Verhaltens geben. Hierzu wurden Zellen nach unterschiedlicher Lagerdauer bei unterschiedlichen Lagertemperaturen mit dem Farbstoff bis-(1,3-Dibu-

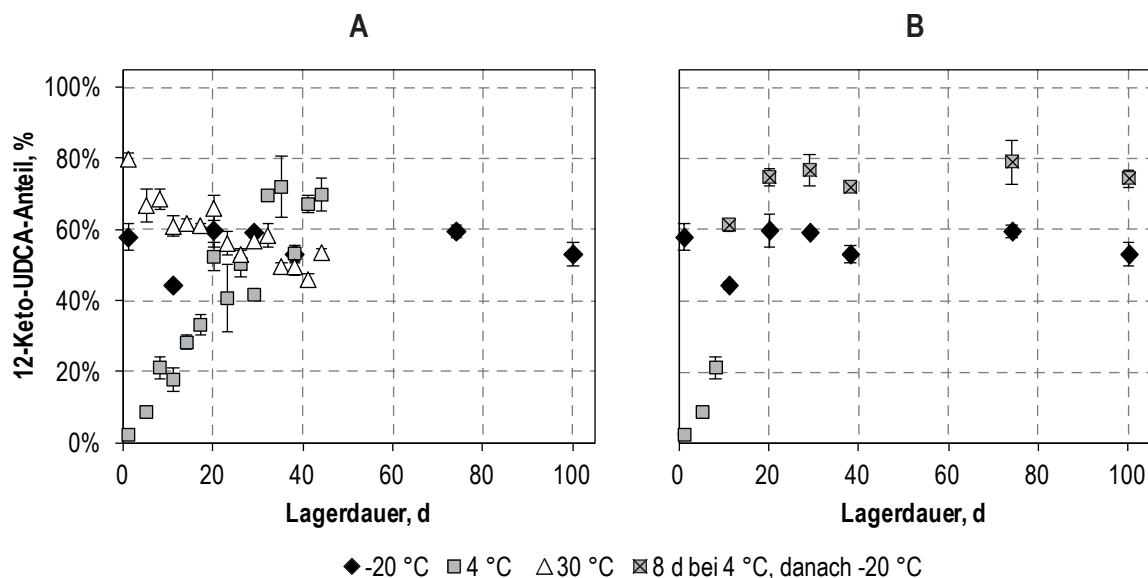


Abbildung 7.4: Untersuchung der Lagerstabilität des Ganzzellbiokatalysators *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A. Gezeigt sind die 12-Keto-UDCA-Anteile nach 1 h Biotransformation. Untersucht wurden die Lagerung bei -20 °C, 4 °C, 30 °C sowie 8 Tage bei 4 °C und anschließend bei -20 °C. In **A**: sind die Messreihen der bei -20 °C, 4 °C und 30 °C gelagerten Zellen gezeigt, in **B**: die Messreihen der bei -20 °C und der 8 Tage bei 4 °C und anschließend bei -20 °C gelagerten Zellen. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.2 und 7.2.1. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

tylbarbitursäure)-Trimethinoxonol (Dibac₄[3]) versetzt, welcher depolarisierte Zellmembranen überwindet und durch Bindung an intrazelluläre Proteine und Membranen eine gesteigerte Fluoreszenz erzeugt (Suller & Lloyd, 1999). Bei den gemessenen Partikeln wurde die Dibac₄[3]-vermittelte Fluoreszenz gegen deren Lichtstreuung, welche ein Indikator für die Partikelgröße ist, aufgetragen, woraus Erkenntnisse auf die Zellintegrität gezogen werden können (Lange-mann *et al.*, 2010). Die Messdaten sind in Abbildung 7.5 gezeigt.

Als Referenz für die gelagerten Zellen dient eine Messung 3 h nach der Zellernte, bei der die Zellsuspension nach der Ernte in flüssiger Form auf Eis gehalten wurde. Hierbei wird angenommen, dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt noch intakt sind. Die Position der Zellpopulation auf dem FACS-Plot wurde mit einem Oval markiert. Bei den bei -20 °C gelagerten Zellen kann sowohl nach 1 d Lagerung (1 Frost-Tau-Zyklus) als auch nach 12 d Lagerung (2 Frost-Tau-Zyklen) eine Verschiebung der Population hin zu einer höheren Fluoreszenz beobachtet werden, was auf eine teilweise Depolarisation der Zellmembran hindeutet, die mutmaßlich aufgrund einer Zellmembranschädigung durch das Einfrieren und Auftauen verursacht wird. Das gleiche Muster lässt sich bei 1 d Lagerung bei 25 °C beobachten, während die Population nach 12 d Lagerung bei 25 °C ein Muster aufweist, das denen von lysierten Zellen ähnelt (persönliche

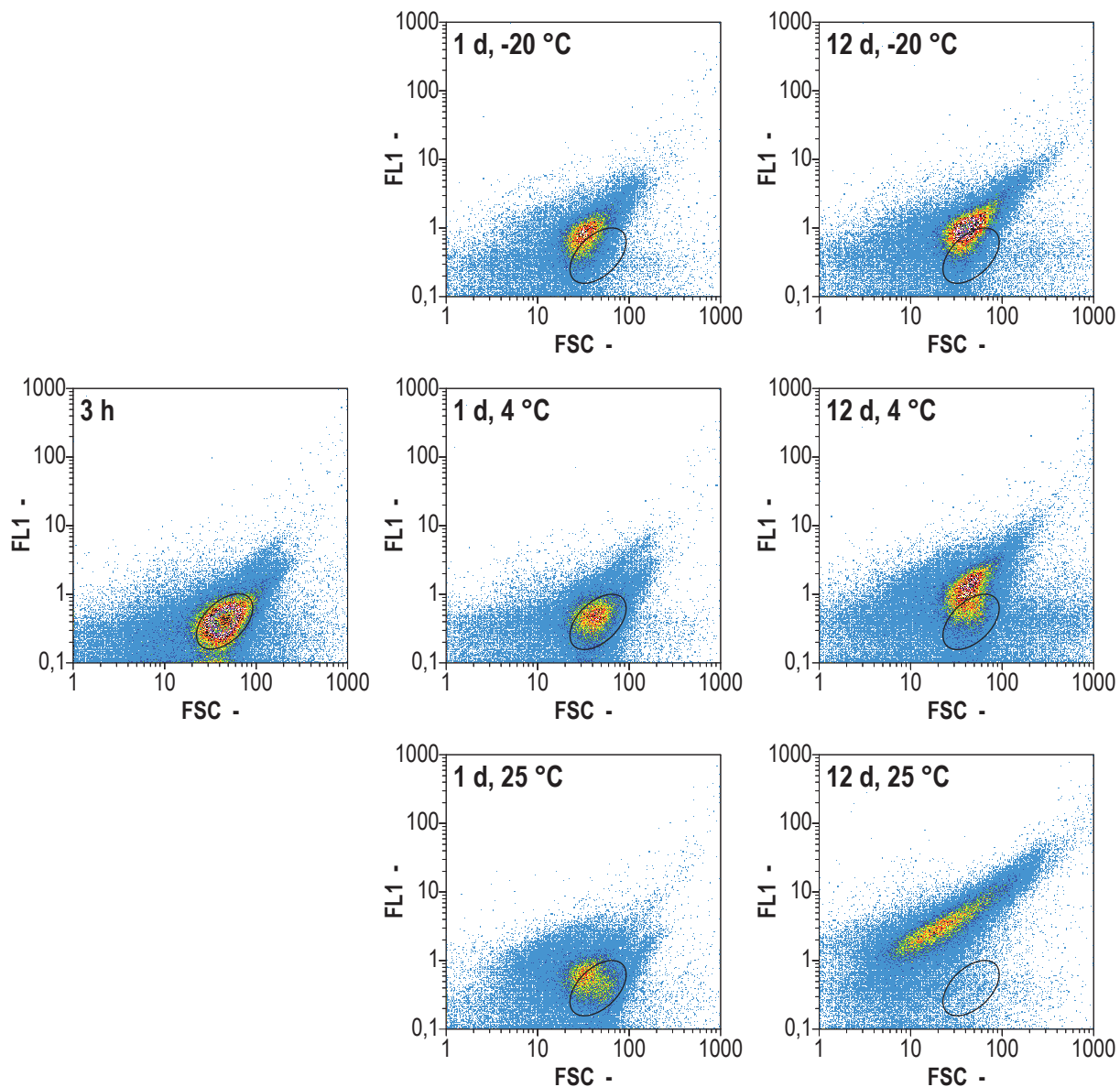


Abbildung 7.5: FACS-Analyse von Ganzzellbiokatalysatoren bei verschiedenen Lagerbedingungen und -dauern. Aufgetragen sind jeweils die Lichtstreuung der Partikel (FSC) gegen die Fluoreszenz (FL1), die Anzahl der gemessenen Partikel ist durch Farbcodierung gekennzeichnet. Gezeigt sind FACS-Daten von Ganzzellbiokatalysatoren 3 h nach der Zellernte (mitte links), nach 1 d Lagerung bei -20 °C und einem Frost-Tau-Zyklus (oben mitte), nach 12 d Lagerung bei -20 °C und zwei Frost-Tau-Zyklen (oben rechts), nach 1 d Lagerung bei 4 °C (mitte mitte), nach 12 d Lagerung bei 4 °C (mitte rechts), nach 1 d Lagerung bei 25 °C (mitte unten) sowie nach 12 d Lagerung bei 25 °C (rechts unten).

Mitteilung Ilka Sührer). Hierbei ist zu vermuten, dass die Zellschädigung durch natürliches Absterben verursacht wird, da den Zellen während der Lagerung weder Substrat noch Sauerstoff zugeführt wird. Bei den bei 4 °C gelagerten Zellen lässt sich hingegen nach 1 d Lagerung kaum ein Unterschied zur Referenzprobe ausmachen, nach 12 d hingegen ist eine Fluoreszenzsteigerung zu sehen, die womöglich ebenfalls durch natürliches Absterben verursacht wird.

Anhand dieser FACS-Daten lässt sich vermuten, dass die anfänglich geringe Aktivität der bei 4 °C gelagerten Zellen durch eine Retardierung des Stofftransports über die Zellmembran verursacht wird. Während die Zellmembran der bei -20 °C gelagerten Zellen durch Einfrieren und Auftauen geschädigt wird, wird dieser Effekt bei den bei 25 °C gelagerten Zellen mutmaßlich durch das natürliche Absterben verursacht. Zwar erfolgt ein Absterben der Zellen auch bei 4 °C, aber durch die niedrige Temperatur erfolgt dieser Prozess mit einer deutlich langsameren Geschwindigkeit. Dies würde auch erklären, warum zunächst bei 4 °C gelagerte Zellen nach einem Frost-Tau-Zyklus schlagartig ihre volle Aktivität entfalten. Generell wurde ebenfalls beobachtet, dass die flüssig gelagerten Zellen höhere maximale Aktivitäten erreichen als eingefrorene Zellen. Möglicherweise erfolgt während der ersten Stunden der Lagerung noch eine weitere Enzymexpression, dieser Umstand wurde jedoch nicht untersucht. Hinsichtlich der Stabilität ist jedoch die Lagerung der Zellen bei -20 °C zu bevorzugen, da hierbei innerhalb von 100 Tagen kein Aktivitätsverlust erkennbar war. Das Szenario, dass Zellen zunächst 8 d bei 4 °C und anschließend bei -20 °C gelagert werden, scheint von allen untersuchten Bedingungen das vorteilhafteste zu sein, da somit der Vorteil einer anfänglichen Flüssiglagerung mit dem Stabilitätsvorteil bei einer -20 °C-Lagerung kombiniert wird, jedoch ist ein Einfrieren der Zellen als „Aktivierungsschritt“ für eine konstante hohe Zellaktivität unerlässlich. Ein Vorteil dieses Szenarios ist auch, dass dieses einen typischen Ablauf von Zellproduktion, Transport und Lagerung widerspiegelt, so dass es sehr einfach in der Praxis umzusetzen ist.

7.2.2 Einfluss der Lagerform

Weiterhin wurde untersucht, in welcher Form die Zellen bei -20 °C gelagert werden sollen. Hierbei ging es in einer ersten Messreihe um die Frage, ob die Anwesenheit des Fermentationsmediums die Lagerstabilität oder die anschließende Biotransformation beeinflusst. Hierzu wurde ein Teil der Zellen nach der Ernte durch Zentrifugation pelletiert und in Kaliumphosphat-

Puffer (50 mM, pH 7,0) resuspendiert und anschließend bei -20 °C gelagert. Auch sollte die Rolle von Glycerin untersucht werden, welches als Zusatz im technischen Maßstab das Auftauen der Zellsuspension durch Herabsetzen des Gefrierpunkts beschleunigen kann. Da Glycerin jedoch die Ausbildung von Eiskristallen behindert und dadurch die Zellmembran schützt, ist es unter Berücksichtigung der in Abschnitt 7.2.1 diskutierten Ergebnisse ebenfalls von Interesse, ob dessen Zugabe die Aktivität der Zellen negativ beeinflusst. In einer zweiten Messreihe wurde untersucht, ob Zellen in aufkonzentrierter Form als Pellet gelagert werden können und ob durch die Verwerfung des Überstands Aktivität verloren geht.

Für die erste Messreihe wurden Zellen des Stamms *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A verwendet. Untersucht wurden die Lagerformen: in Fermentationslösung (A), in Fermentationslösung bei Zugabe von 25 % (v/v) Glycerin (B), in Kaliumphosphatpuffer (C) und in Kaliumphosphatpuffer bei Zugabe von 25 % (v/v) Glycerin (D). Die Biotransformationsansätze enthielten OD 7 an Zellen. Für die zweite Messreihe wurden Zellen des Stamms *E. coli* BLLiu p7(A)T3rG-K eingesetzt, hierbei wurden die Lagerformen: in Fermentationslösung (E), als Zellpellet (F) sowie Fermentationslösung vom Überstand nach der Pelletierung (G) untersucht, was als Kontrolle diente, ob Enzyme aus den Zellen entweichen. Für letztes wurde das gleiche Volumen an Überstand wie auch bei der Zellsuspension (E) in den Biotransformationsansatz gegeben. Hier wurden OD 2 an Zellen eingesetzt. In Abbildung 7.6 sind die Gallensalzanteile der ersten Messreihe nach 1 h Biotransformation und die der zweiten Messreihe nach 3 h Biotransformation gezeigt.

Anhand der ersten Messreihe lässt sich erkennen, dass bei Lagerung in Fermentationslösung der Zusatz von Glycerin keinen Einfluss auf die Biotransformationsleistung des Ganzzellbiokatalysators zeigt. Bei den in Kaliumphosphatpuffer gelagerten Zellen wurde nach 1 h hingegen weniger Gallensalz umgesetzt, wobei der Zusatz von Glycerin sogar einen negativen Einfluss auszuüben scheint. Das Ergebnis zeigt, dass die Lagerung in Fermentationslösung auf die Biotransformation keinen negativen Effekt hat. Dies ist auch hinsichtlich des *Downstream Processings* nach der Zellherstellung von Vorteil, dass dadurch auf einen Umpufferungsschritt verzichtet werden kann. Die Zugabe von Glycerin scheint zumindest bei der Lagerung in Fermentationslösung keinen Einfluss auf die Aktivität der Biokatalysatoren zu haben und ist dadurch eine Option zur Verkürzung der Auftauzeit, sofern die Zellen bei -20 °C gelagert werden.

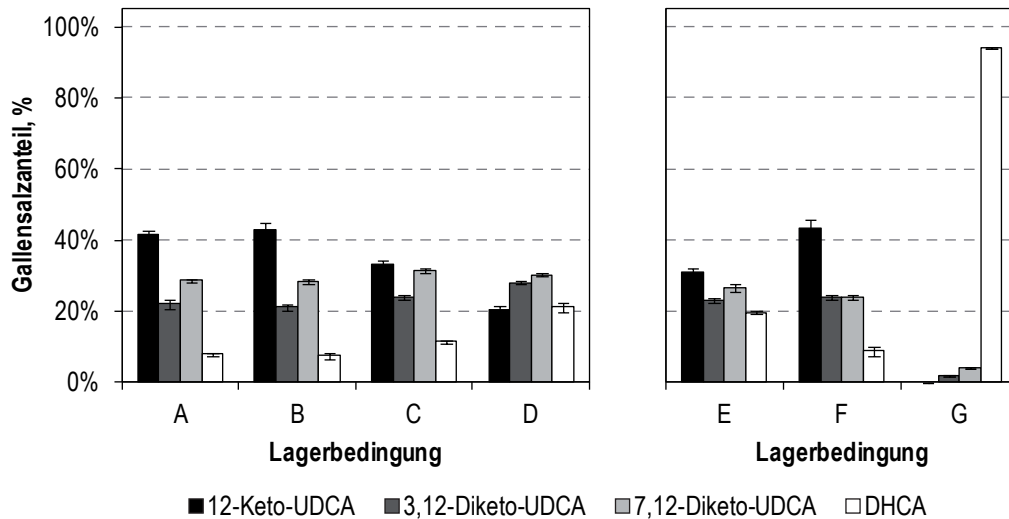


Abbildung 7.6: Untersuchung von Ganzzellbiokatalysatoren bei verschiedenen Lagerformen. Links gezeigt sind die Gallensalzanteile der ersten Messreihe nach 1 h Biotransformation bei Einsatz einer Zelldichte von OD 7. Hierbei handelt es sich um die Lagerformen **A:** in Fermentationslösung, **B:** in Fermentationslösung bei Zugabe von 25 % (v/v) Glycerin, **C:** in Kaliumphosphatpuffer und **D:** in Kaliumphosphatpuffer bei Zugabe von 25 % (v/v) Glycerin. Rechts gezeigt die Gallensalzanteile der zweiten Messreihe nach 3 h Biotransformation bei Einsatz einer Zelldichte von OD 2. Hierbei handelt es sich um die Lagerformen: **E:** in Fermentationslösung, **F:** als Zellpellet und **G:** Fermentationslösung vom Überstand nach der Pelletierung (Kontrollprobe). Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.2 und 7.2.2. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

In der zweiten Messreihe wurde mit Zellen, die als Pellet gelagert wurden, mehr Umsatz erzielt, als mit in Fermentationslösung gelagerten Zellen. Eine generelle Aussage, dass als Pellet gelagerte Zellen aktiver sind, lässt sich jedoch aus dieser Beobachtung nicht schließen, da hier eine etwaige zusätzliche Beschädigung der Zellmembran beim resuspendieren des Pellets nach dem Auftauen nicht ausgeschlossen werden kann. Die Überstandsprobe hingegen zeigt fast keine Aktivität. Somit kann geschlussfolgert werden, dass das Aufkonzentrieren der Ganzzellbiokatalysatoren nach der Fermentation in keinem signifikanten Verlust an Aktivität resultiert. Zwar bedeutet die Aufkonzentrierung der Zellen nach der Kultivierung einen weiteren Prozessschritt, jedoch kann hierdurch Volumen der Biokatalysatoren eingespart werden, was die Lagerung und den Transport der Biokatalysatoren erleichtert. Ob eine Aufkonzentrierung zu favorisieren ist, ist also anhand dieser Gesichtspunkte und deren wirtschaftlicher Bedeutung abzuwägen.

7.2.3 Frost-Tau-Stabilität

Eine weiterer zu untersuchender Aspekt ist die Stabilität der Ganzzellbiokatalysatoren nach multiplen Frost-Tau-Zyklen. Dies ist für den Fall von Bedeutung, dass die Zellen während Transport und Lagerung aufgrund von Unwägbarkeiten auftauen. Auch für den Fall, dass Zellen nach der Herstellung nicht in den exakt benötigten Gebindegrößen konfektioniert werden, kann es wichtig sein, ob bereits aufgetaute Zellen ohne Aktivitätsverlust wieder eingefroren werden können.

Hierzu wurden Zellen des Stamms *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A insgesamt zehn Frost-Tau-Zyklen unterworfen, wobei nach jedem Auftauen Biotransformationsreaktionen mit diesen Zellen durchgeführt wurden, bei denen OD 10 an Zellen zum Einsatz kamen. Anschließend wurden die Zellen erneut bei -20 °C eingefroren. Die Gallensalzanteile der Biotransformationsansätze nach 0,5 h Biotransformation sind in Abbildung 7.7 gezeigt. Anhand dieser Daten lässt sich erkennen, dass die Gallensalzanteile nach 0,5 h über die gesamten zehn Zyklen hinweg innerhalb statistischer Schwankungen konstant bleiben. Nachdem bereits in Abschnitt 7.2.1 gezeigt wurde, dass eine durch das Einfrieren verursachte Schädigung der Zellmembran keine negativen Auswirkungen auf die Aktivität der Ganzzellbiokatalysatoren ausübt, konnte in dieser Messrei-

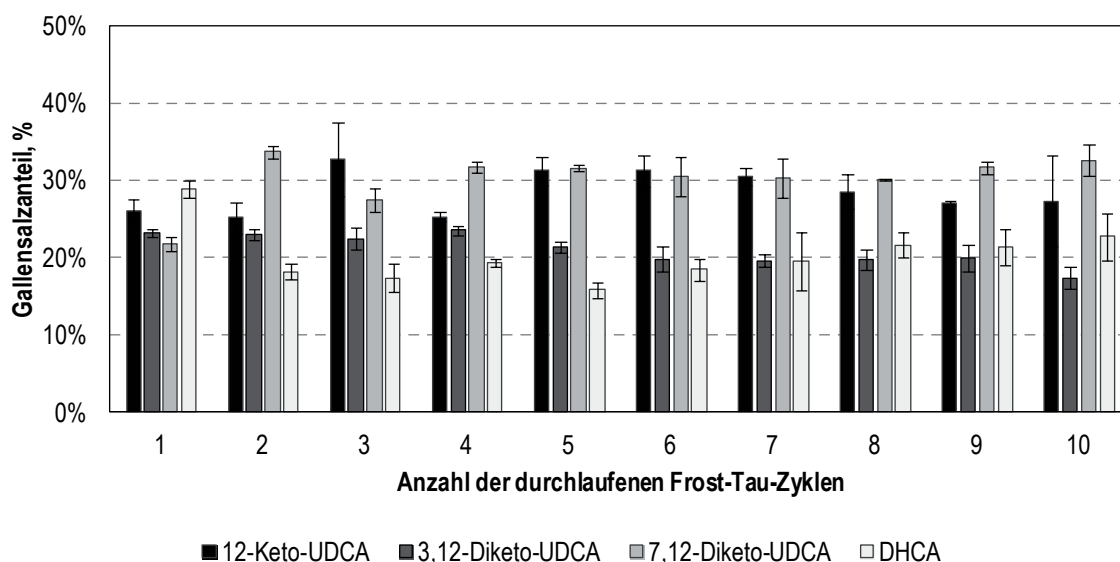


Abbildung 7.7: Untersuchung der Frost-Tau-Stabilität des Ganzzellbiokatalysators *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A. Gezeigt sind die Gallensalzanteile nach 0,5 h Biotransformation bei Einsatz einer Zelldichte von OD 10. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.2 und 7.2.3. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

he auch keine Schädigung der intrazellulär vorliegenden prozessrelevanten Enzyme festgestellt werden. Somit lässt sich kein Aktivitätsverlust der Ganzzellbiokatalysatoren nach zehn Frost-Tau-Zyklen feststellen.

7.3 Charakterisierung der Ganzzellbiokatalyse

Die vorangegangenen zwei Abschnitte beschäftigten sich mit der Entwicklung eines geeigneten Ganzzellbiokatalysator-Stammes und dessen Kultivierung und Lagerung. Als nächstes soll der darauffolgende Prozessschritt, die Durchführung der Biokatalyse, genauer untersucht werden.

7.3.1 Einfluss der Kofaktorzugabe

Wie bereits in Abschnitt 6.4 gezeigt, lassen sich im 1 L-Maßstab 100 mM DHCA bei Verwendung einer Zelldichte von OD 30 innerhalb von 4,5 h vollständig zu 12-Keto-UDCA reduzieren. Als ersten Schritt zur Optimierung des Prozesses wurde untersucht, ob die Biokatalysatormenge für die Umsetzung verringert werden kann und ob der Zusatz an Kofaktoren die Biotransformation beschleunigt. Hierzu wurden drei Ansätze im 20 mL-Maßstab durchgeführt, jeweils unter Zugabe von OD 15 an Zellen, 100 mM DHCA, 500 mM Glucose und 10 mM MgCl_2 bei pH 7,0. In Ansatz A erfolgte keine Zugabe von Kofaktoren, bei Ansatz B wurden 50 μM NAD zugesetzt und in Ansatz C erfolgte ein Zusatz von jeweils 50 μM NAD und NADP. Die Reaktionsverläufe sind in Abbildung 7.8 gezeigt.

Im Ansatz A, ohne Zugabe von Kofaktoren, war die Umsetzung nach 8 h bei einem 12-Keto-UDCA-Anteil von 97 % beendet. Hierbei erfolgt zwischenzeitlich eine starke Akkumulation des Intermediats der 7 β -HSDH (3,12-Diketo-UDCA) auf bis zu 54 % Gallensalzanteil. Durch die Zugabe von NAD, dem Kofaktor für die 3 α -HSDH, erfolgte in Ansatz B eine beschleunigte Umsetzung, die bereits nach 2,5 h bei einem 12-Keto-UDCA-Anteil von 98 % beendet war. Hierbei akkumuliert das Intermediat der 3 α -HSDH (7,12-Diketo-UDCA) stärker und erreicht Anteile von bis zu 45 %. Wird zusätzlich zu NAD noch NADP zugesetzt, lässt sich in Ansatz C eine weitere Beschleunigung der Reaktion sehen, erkennbar an den 12-Keto-UDCA-Anteilen bei 1 h und 1,5 h. Desweiteren akkumuliert wieder das Intermediat der 7 β -HSDH (3,12-Diketo-UDCA) stärker und erreicht bis zu 40 % Gallensalzanteil. Aus dieser Messreihe lässt

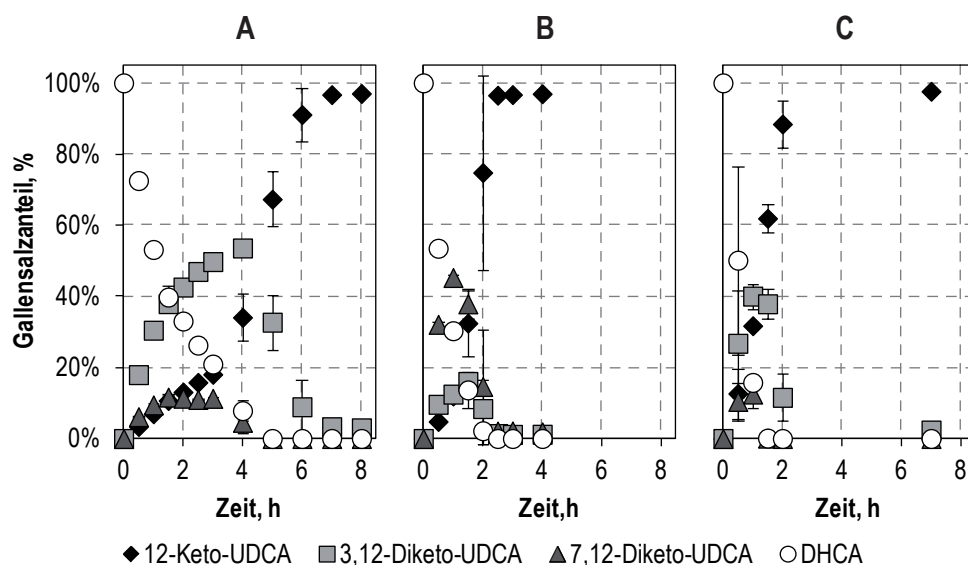


Abbildung 7.8: Vergleich der Biotransformation mit *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A bei Zugabe von Kofaktoren. Gezeigt ist **A:** ohne Zugabe von Kofaktoren, **B:** Zugabe von 50 µM NAD, **C:** Zugabe von je 50 µM NAD und NADP. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.2 und 7.3.1. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

sich erkennen, dass die Biotransformationsreaktion durch Zugabe von Kofaktoren beschleunigt werden kann, was ein Hinweis darauf ist, dass die Zellmembran der Ganzzellbiokatalysatoren beschädigt, und somit für diese Moleküle durchlässig wird. Zudem lässt sich durch Zugabe des spezifischen Kofaktors für die jeweilige HSDH deren Reaktionsgeschwindigkeit selektiv steuern.

Eine weitere Beobachtung bei dieser Messreihe war, dass sämtliche Biotransformationsansätze ungefähr zum Zeitpunkt der Beendigung einen festen Aggregatzustand angenommen haben und erst nach mehreren Stunden wieder flüssig wurden, was auch schon in früheren Messreihen im 20 mL-Maßstab beobachtet wurde. Diesem Umstand ist geschuldet, dass bei Ansatz C keine 2,5 h-Probe entnommen werden konnte, sondern erst wieder nach 7 h. Das Verfestigen der Reaktionsansätze konnte nur in 20 mL-Ansätzen beobachtet werden, nicht jedoch in 1 L-Ansätzen. Als Ursache wird ein Ausfallen des Produktes 12-Keto-UDCA vermutet. Da die Löslichkeit von 12-Keto-UDCA stark pH-abhängig ist, könnte die bessere pH-Regelung im 1 L-Maßstab ein Verfestigen des Reaktionsansatzes verhindert haben. In den 20 mL-Ansätzen scheint das ausfallende Produkt mit weiteren Bestandteilen des Reaktionsansatzes zu interagieren, was zunächst zu einer Zunahme der Viskosität und schließlich zu einem Verfestigen

des gesamten Reaktionsansatzes führt. Auch die Maßnahme, den pH auf 7,0 anzuheben konnte diesem Phänomen nicht begegnen.

7.3.2 Einfluss der Temperatur

In einer weiteren Messreihe wurde untersucht, welche Temperatur optimal für die Biotransformation ist. Hierzu wurden im 20 mL-Maßstab Reaktionen bei 25 °C, 30 °C und 35 °C durchgeführt, die jeweils mit OD 15 an Zellen, 100 mM DHCA, 500 mM Glucose, 25 µM NAD und 10 mM MgCl₂ bei pH 7,0 durchgeführt wurden. Die Reaktionsverläufe sind in Abbildung 7.9 gezeigt. Hierbei konnten bei 30 °C mit $91 \pm 11 \%$ die höchsten 12-Keto-UDCA-Anteile nach 5 h gemessen werden. Zwar ist der Unterschied zum Ansatz bei 35 °C nicht signifikant ($87 \pm 11 \%$ 12-Keto-UDCA-Anteil), jedoch spricht sowohl die höhere gemessene Produktkonzentration als auch die größere Nähe zur Raumtemperatur für eine Durchführung der Biotransformation bei 30 °C.

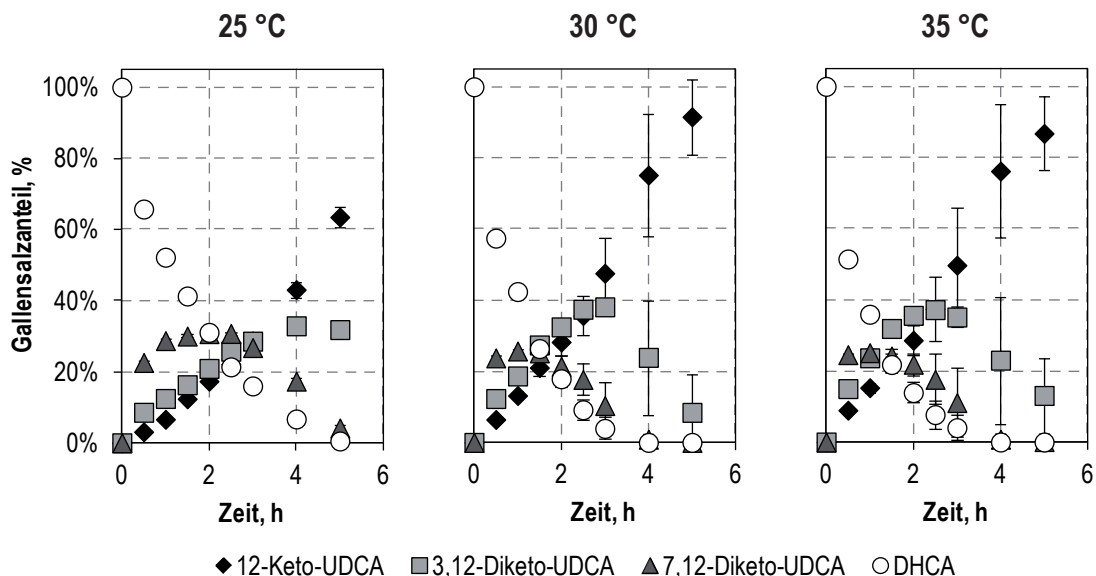


Abbildung 7.9: Vergleich der Biotransformation mit *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A bei unterschiedlichen Temperaturen. Gezeigt sind Umsetzungen bei 25 °C, 30 °C und 35 °C. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.2 und 7.3.2. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

7.3.3 Einfluss von Substratkonzentration, Zellkonzentration und Kofaktoren

Um dem in Abschnitt 7.3.1 beschriebenen Verfestigen der Reaktionsansätze zum Ende der Biotransformation zu begegnen, wurde die eingesetzte Substratkonzentration von 100 mM auf 70 mM verringert. Für die Untersuchung, welchen Effekt diese Maßnahme auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat, wurde als Referenzansatz der Ansatz bei 30 °C aus der Messreihe in Abschnitt 7.3.2 definiert. Zwei Ansätze wurden durchgeführt, bei denen nicht nur die DHCA-Konzentration sondern auch die Biokatalysator- und Glucosekonzentration um denselben Faktor auf OD 10,5 bzw. 350 mM Glucose verringert wurde. Bei Ansatz A wurde zusätzlich die NAD-Konzentration auf 17,5 µM verringert, während bei Ansatz B die NAD-Konzentration bei 25 µM belassen wurde. Weiterhin wurde in den Ansätzen C, D, E und F untersucht, inwieweit sich die eingesetzte Biokatalysatormenge weiter verringern lässt und wie die dadurch bedingte Verlangsamung der Reaktion durch Zugabe von Kofaktoren kompensiert werden kann. Die jeweils eingesetzten Mengen an Zellen und Kofaktoren sind in Tabelle 7.3 aufgelistet. Die übrigen Reaktionsbedingungen sind bei sämtlichen Ansätzen identisch.

Die Reaktionsverläufe sämtlicher Ansätze sind in Abbildung 7.10 gezeigt. Im Vergleich der beiden Ansätze A und B mit dem Referenzansatz aus Abschnitt 7.3.2 zeigt sich, dass bei beiden Ansätzen mit verringerter Substrat-, Zell- und Kosubstrat-Konzentration schnellere Reaktionen zu beobachten sind, als bei dem Referenzansatz. Während die Reaktion bei Ansatz A nach 5 h und bei Ansatz B nach 4 h mit jeweils einem 12-Keto-UDCA-Anteil von $\geq 99\%$ beendet war, waren es beim Referenzansatz nach 5 h lediglich 92 % 12-Keto-UDCA-Anteil. Auch konnte weder bei Ansatz A noch bei Ansatz B ein Verfestigen des Reaktionsansatzes beobachtet werden. In den Ansätzen C und D wurde die Zellkonzentration auf OD 7 bzw. OD 3,5 verringert und es lässt sich eine dadurch bedingte Verlangsamung der Reaktion erkennen, doch während bei Ansatz C nach 24 h dennoch $\geq 99\%$ 12-Keto-UDCA-Anteil erreicht wurden, konnte bei Ansatz D nach 24 h lediglich 56 % 12-Keto-UDCA-Anteil erzielt werden. Werden, wie bei Ansatz

Tabelle 7.3: Übersicht über die Versuchsansätze in Abschnitt 7.3.3

	Ansatz					
	A	B	C	D	E	F
OD, –	10,5	10,5	7,0	3,5	3,5	2,0
NAD, µM	17,5	25	25	25	25	50
NADP, µM	–	–	–	–	10	10

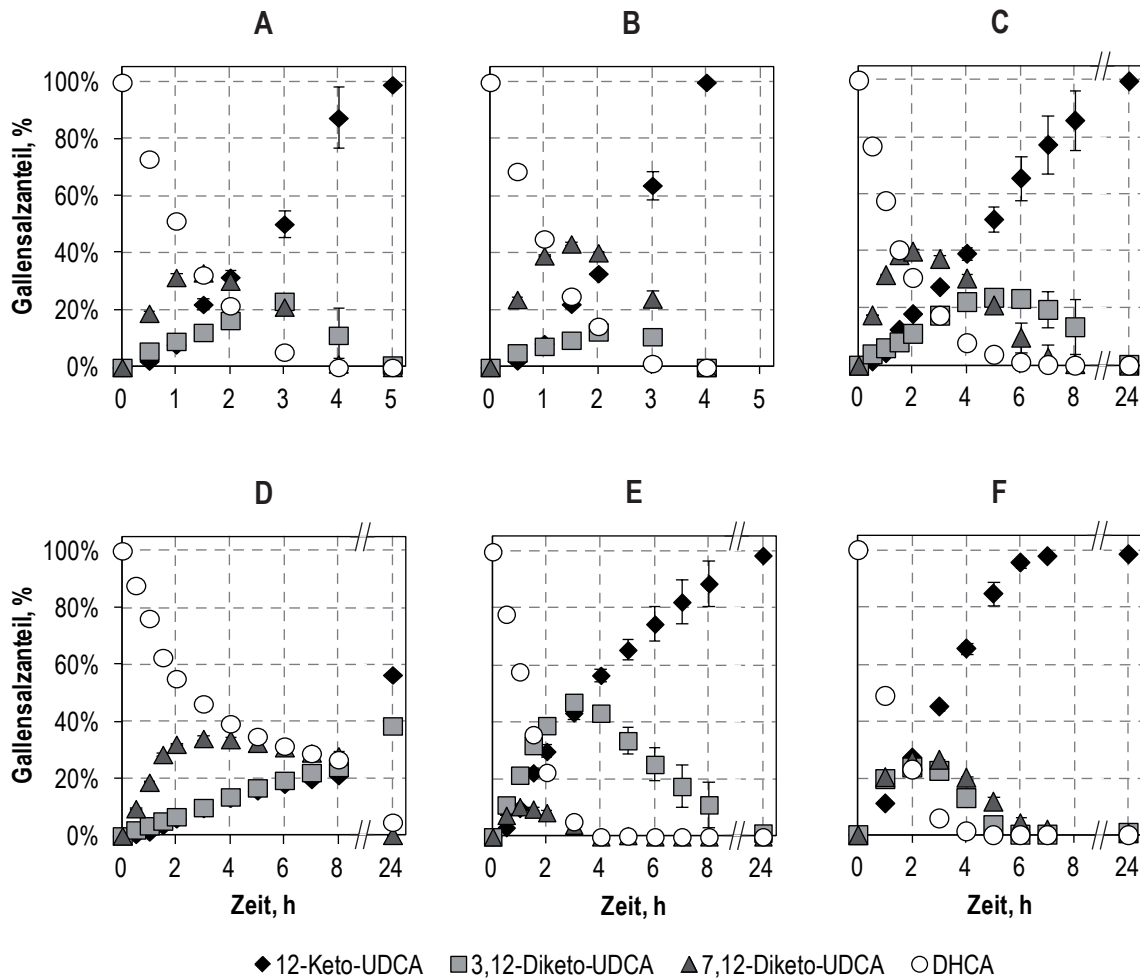


Abbildung 7.10: Vergleich der Biotransformation mit *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A bei Zugabe verschiedener Biomasse- und Kofaktorkonzentrationen. Gezeigt sind Biotransformationen in Gegenwart von **A:** OD 10,5 Zellen, 17,5 μM NAD; **B:** OD 10,5 Zellen, 25 μM NAD; **C:** OD 7 Zellen, 25 μM NAD; **D:** OD 3,5 Zellen, 25 μM NAD; **E:** OD 3,5 Zellen, 25 μM NAD, 10 μM NADP; **F:** OD 2 Zellen, 50 μM NAD, 10 μM NADP. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.2 und 7.3.1. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

E, jedoch zusätzlich 10 μM NADP hinzugefügt, so lässt sich auch bei OD 3,5 nach 24 h $\geq 99\%$ 12-Keto-UDCA-Anteil erreichen. Noch einen Schritt weiter geht Ansatz F, bei dem gegenüber Ansatz E die Zelldichte nochmal auf OD 2 verringert, die NAD-Konzentration hingegen auf 50 μM verdoppelt wurde. Hierdurch konnte die Reaktion sogar noch beschleunigt werden, so dass bereits nach 7 h 98 % 12-Keto-UDCA-Anteil erreicht wurde. Insgesamt lässt sich erkennen, dass die Konzentrationen an Biokatalysator, NAD und NADP große Auswirkungen auf den Verlauf der Biotransformation haben. Da diese Faktoren zudem miteinander wechselwirken, ist eine Modellierung dieser Effekte für ein besseres Verständnis des Reaktionssystems unumgänglich.

7.3.4 Skalierbarkeit der Biotransformation

Während dieses Forschungsprojektes wurden Biotransformationen sowohl im 1 L- als auch im 20 mL-Maßstab durchgeführt. Hierbei stellt sich zwangsläufig die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen beiden Maßstäben. Dieser Aspekt soll anhand zweier bereits gezeigter Ansätze, Stamm A aus Abschnitt 7.1.2 und Ansatz F aus Abschnitt 7.3.3 erörtert werden. Beide Biotransformationen wurden mit dem Stamm *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A durchgeführt, die Reaktionsbedingungen waren jeweils OD 2 an Zellen, 70 mM DHCA, 350 mM Glucose, 10 mM MgCl₂, 50 µM NAD und 10 µM NADP bei pH 7,0 und 30 °C. Die Verläufe der beiden Biotransformationen sind nochmal in Abbildung 7.11 gegenübergestellt.

Anhand der Daten ist zu erkennen, dass beide Verläufe einander sehr ähnlich sind. Bei beiden Ansätzen sind die Verläufe der beiden Intermediate 3,12-Diketo-UDCA und 7,12-Diketo-UDCA nahezu parallel und die maximale Akkumulation beider Intermediate bei beiden Ansätzen beläuft sich auf 21 – 26 % Gallensalzanteil. Zudem zeigt der Verlauf der 12-Keto-UDCA in beiden Fällen die gleiche sigmoidale Form. Ein geringer Unterschied ist jedoch in der Dauer der Biotransformation zu erkennen. Während die Reaktion im 1 L-Maßstab bereits nach 5,5 h beendet ist, benötigt der Ansatz im 20 mL-Maßstab 7 h. Eine Erklärung für diese Abweichung könnte die bessere pH-Regelung im Rührkesselreaktor sein, da der pH in den 20 mL-Ansätzen nur alle 30 min manuell eingestellt wurde. Abgesehen von der Reaktionsdauer

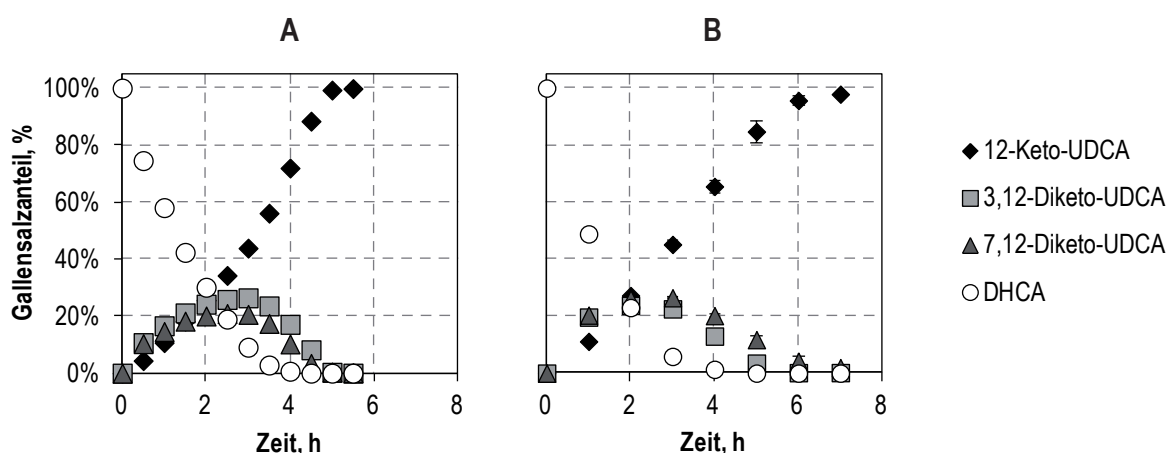


Abbildung 7.11: Vergleich der Biotransformation mit *E. coli* BL49 p7(A)T3rG-A im 1 L- und 20 mL-Maßstab. Gezeigt ist **A:** 1 L-Maßstab und **B:** 20 mL-Maßstab. Die Reaktionen wurden bei 30 °C und pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in Abschnitten 4.7.2, 4.7.3 und 7.3.4. Standardabweichungen der Dreifachansätze im 20 mL-Maßstab sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

sind beide Verläufe nahezu identisch und es existiert kein Grund anzunehmen, dass im 20 mL-Maßstab ermittelte vorteilhafte Reaktionsbedingungen nicht den gleichen positiven Effekt auf Biotransformationen im 1 L-Maßstab haben.

7.3.5 Einfluss von Glycerin und Magnesiumchlorid

In Abschnitt 6.1.4 wurde für die Biokatalyse mit FDH-Stämmen gezeigt, dass die Zugabe von Glycerin und MgCl_2 positive Effekte auf die Biotransformation hat. Folglich wurde der Einfluss dieser beiden Substanzen auf die Biotransformation mit dem GDH-Stamm *E. coli* BLLiu p7(A)T3rG-K untersucht. Ausgehend von dem Standardansatz mit OD 4 an Zellen, 70 mM DHCA, 350 mM Glucose, 10 mM MgCl_2 , 50 μM NAD und 10 μM NADP wurde in einer ersten Messreihe 0, 2, 4, 8 und 16 % (v/v) Glycerin zugesetzt und in einer zweiten Messreihe die MgCl_2 -Konzentration von 10 mM schrittweise auf 5, 2, 1 und 0 mM verringert. Die jeweiligen 12-Keto-UDCA-Konzentrationen nach 2 h Biotransformation sind in Abbildung 7.12A gezeigt.

In der Messreihe mit Glycerinzusatz, lässt sich erkennen, dass der maximale 12-Keto-UDCA-Anteil bei Zusatz von 4 % (v/v) Glycerin erreicht wurde ($44,5 \pm 1,3$ %), was eine geringfügige Steigerung gegenüber dem Standardansatz ($39,6 \pm 2,1$ %) bedeutet. Wird hingegen zu viel Glycerin zugesetzt, so verkehrt sich dieser positive Effekt ins Negative, wodurch bei 16 % (v/v) Glycerin lediglich $26,1 \pm 0,6$ % 12-Keto-UDCA nach 2 h erzielt wurden.

Wurde hingegen die MgCl_2 -Konzentration verringert, so konnten bei sämtlichen Ansätzen mit geringerer MgCl_2 -Konzentration deutlich höhere 12-Keto-UDCA-Anteile erreicht werden als im Referenzansatz mit 10 mM MgCl_2 . Die höchsten 12-Keto-UDCA-Anteile wurden hierbei bei Zugabe von 5 mM MgCl_2 mit $70,0 \pm 2,4$ % erzielt. Bei dieser Messreihe wurde zudem beobachtet, dass nach Beendigung der Reaktion die Ansätze mit zunehmender MgCl_2 -Konzentration eine zunehmende Trübung aufweisen. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurden die Ansätze dieser Messreihe im 1 L-Maßstab bei verringerter Zelldichte von OD 2 wiederholt und 16 h über Nacht laufen gelassen. Anschließend wurde der Feststoff in der Suspension durch Filtration isoliert und nach dem Trocknen gravimetrisch bestimmt. Die isolierten Feststoffmengen bei den jeweiligen MgCl_2 -Konzentrationen sind in Abbildung 7.12B gezeigt. Es ist zu sehen, dass die Menge an isolierten Feststoff von 0 mM MgCl_2 (1 g Feststoff) bis 5 mM MgCl_2 (20 g) zunimmt, darüber hinaus allerdings konstant bleibt. Durch HPLC-Analyse konnte der Fest-

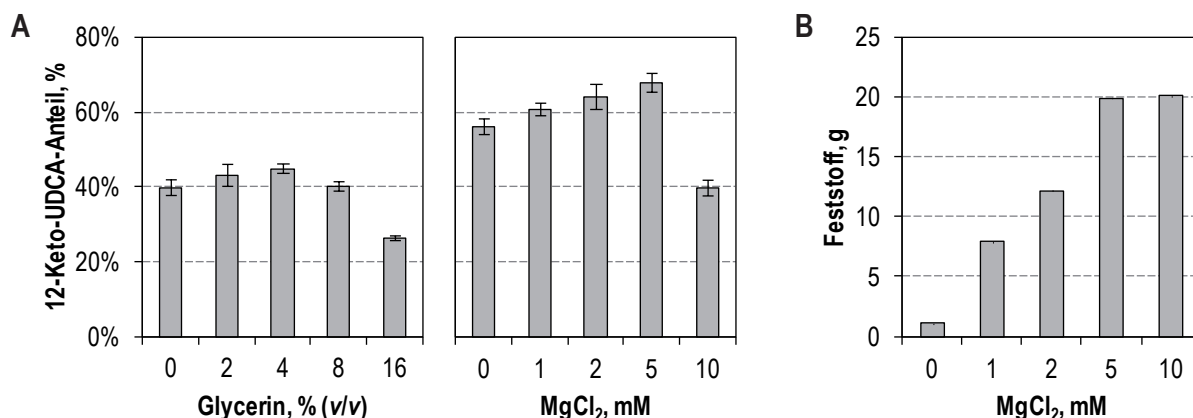


Abbildung 7.12: Vergleich der Biotransformation mit *E. coli* BLLiu p7(A)T3rG-K mit unterschiedlichen Glycerin- und MgCl₂-Konzentrationen. Gezeigt ist **A:** 12-Keto-UDCA-Anteile nach 2 h Biotransformation bei verschiedenen Glycerin- bzw. MgCl₂-Konzentrationen. **B:** Isolierte Masse an Feststoff nach 16 h-Biotransformation bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab (**A**) bzw. im 1 L-Maßstab (**B**) bei 30 °C und pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.2 und 7.3.5. Standardabweichungen der Dreifachansätze im 20 mL-Maßstab sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

stoff als 12-Keto-UDCA identifiziert werden. Da 70 mM 12-Keto-UDCA 28 g L⁻¹ entsprechen, liegt somit bei 20 g Feststoff schätzungsweise 70 % des Produkts nach der Biotransformation als Präzipitat vor. Es lässt sich also zusammenfassen, dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei 5 mM MgCl₂ erzielt wurde. Gleichzeitig scheint MgCl₂ jedoch die Löslichkeit des Produkts 12-Keto-UDCA zu beeinflussen. In wie weit ein Ausfallen des Produkts die folgenden Prozessschritte beeinflusst, muss geklärt werden, ist jedoch nicht Teil dieser Forschungsarbeit.

7.4 Empirische Modellierung der Biokatalyse

Wie im Abschnitt 7.3 gezeigt, sind die Anteile an Zellmasse, NAD und NADP entscheidende Einflussfaktoren auf den Verlauf der Biotransformation, deren Auswirkungen zueinander komplexer Natur ist. Um die Auswirkungen dieser drei Komponenten im Zusammenspiel besser zu verstehen, soll ein empirisches Modell mit diesen drei Variablen erstellt werden.

7.4.1 Modellerstellung und Parameterbestimmung

Für die Modellierung wurde als Versuchsplan ein *Central Composite Design* mit den Einflussvariablen Zelldichte, NAD und NADP gewählt. Die genaue Vorgehensweise ist in den Abschnitten 4.8.2 und 4.8.3 beschrieben. Die Biotransformationen wurden mit dem Stamm *E. coli* BLLiu

Tabelle 7.4: Umsätze der Reaktionsansätze für die empirische Modellierung der Ganzzellreaktion. Aufgelistet sind die Reaktionsbedingungen, die Umsätze der 3 α -HSDH bzw. der 7 β -HSDH nach jeweils 3 h und 8 h Biotransformation sowie die 12-Keto-UDCA-Anteile der Ansätze nach 8 h Biotransformation. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.2 und 7.4.1. Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachansätze dargestellt.

Ansatz	OD ₆₀₀ , –	NAD, μ M	NADP, μ M	Umsatz nach 3 h, %		Umsatz nach 8 h, %		Anteil 12-Keto-UDCA
				3 α -HSDH	7 β -HSDH	3 α -HSDH	7 β -HSDH	
1	2,0	40,0	7,5	65,2 \pm 2,5	65,1 \pm 1,1	99,3 \pm 0,7	98,4 \pm 2,0	97,8 \pm 2,8
2	2,0	40,0	10,0	64,9 \pm 0,7	72,0 \pm 1,5	99,5 \pm 0,3	99,9 \pm 0,1	99,4 \pm 0,3
3	2,0	60,0	7,5	76,8 \pm 4,7	58,6 \pm 0,1	100,0 \pm 0,0	99,2 \pm 0,1	99,2 \pm 0,1
4	2,0	60,0	10,0	72,3 \pm 9,7	63,8 \pm 1,0	98,2 \pm 3,2	98,1 \pm 2,3	96,3 \pm 5,5
5	3,0	40,0	7,5	89,5 \pm 1,9	94,2 \pm 1,3	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
6	3,0	40,0	10,0	89,5 \pm 6,2	99,6 \pm 0,3	99,6 \pm 0,1	100,0 \pm 0,0	99,6 \pm 0,1
7	3,0	60,0	7,5	99,6 \pm 0,7	85,8 \pm 2,0	100,0 \pm 0,0	99,7 \pm 0,2	99,7 \pm 0,2
8	3,0	60,0	10,0	94,7 \pm 7,4	92,8 \pm 1,8	99,9 \pm 0,1	99,7 \pm 0,3	99,6 \pm 0,2
9	1,7	50,0	8,7	53,7 \pm 1,6	56,4 \pm 0,5	73,0 \pm 1,6	75,5 \pm 1,3	51,8 \pm 0,2
10	3,3	50,0	8,7	99,9 \pm 0,2	99,2 \pm 0,5	99,9 \pm 0,3	99,5 \pm 0,5	99,3 \pm 0,2
11	2,5	33,2	8,7	67,5 \pm 2,3	87,4 \pm 1,8	99,6 \pm 0,1	100,0 \pm 0,0	99,6 \pm 0,1
12	2,5	66,8	8,7	82,3 \pm 9,5	67,5 \pm 4,1	100,0 \pm 0,0	99,5 \pm 0,7	99,5 \pm 0,7
13	2,5	50,0	6,6	67,0 \pm 2,2	67,7 \pm 1,3	99,6 \pm 0,1	99,9 \pm 0,1	99,5 \pm 0,0
14	2,5	50,0	10,8	74,6 \pm 6,1	81,3 \pm 7,2	99,6 \pm 0,1	100,0 \pm 0,0	99,6 \pm 0,1
15	2,5	50,0	8,7	76,3 \pm 11,7	77,0 \pm 0,9	98,3 \pm 2,7	99,7 \pm 0,5	98,0 \pm 2,4

Tabelle 7.5: Ermittelte Modellparameter bei der empirischen Modellierung der Ganzzellbiotransformation. Aufgelistet sind die Parameter der konstanten Terme (β_0), der linearen Terme (β_1 , β_2 , β_3) für OD, NAD und NADP, der Interaktionsterme (β_{12} , β_{13} , β_{23}) und der quadratischen Terme (β_{11} , β_{22} , β_{33}). Nicht-signifikante Parameter sind mit „–“ dargestellt

Koeffizient	Parameterwert	
	Modell 3 α -HSDH	Modell 7 β -HSDH
β_0	75,5417	76,5624
β_1	12,5754	13,535
β_2	4,3374	-4,6526
β_3	–	3,4655
β_{12}	–	–
β_{13}	–	–
β_{23}	–	–
β_{11}	1,8841	0,9203
β_{22}	1,2224	0,7979
β_{33}	–	-0,2609

p7(A)T3rG-K durchgeführt, wobei die eingesetzte Zelldichte zwischen 1,7 – 3,3 variiert wurde, die NAD-Konzentration zwischen 33,2 – 66,8 μM und die NADP-Konzentration zwischen 6,6 – 10,8 μM . Für eine bessere Differenzierung der Einzelreaktionen wurde jeweils ein Modell für den Umsatz der 3α -HSDH und eines für die 7β -HSDH nach 3 h Biotransformation erstellt. Als Modellgleichung diente jeweils ein Polynom 2. Ordnung. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen, Umsätze der beiden Enzyme nach 3 h und die 12-Keto-UDCA-Konzentrationen nach 8 h sind in Tabelle 7.4 gezeigt.

Mit diesen Daten wurden Modellparameter für beide Modelle ermittelt. Nach Ausschluss nicht-signifikanter Parameter bleiben beim Modell für die 3α -HSDH fünf und beim Modell der 7β -HSDH sieben Koeffizienten übrig. Diese sind in Tabelle 7.5 gezeigt. Insgesamt weist das Modell der 3α -HSDH mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 91,90 % und einem korrigierten Bestimmtheitsmaß (\bar{R}^2) von 88,66 % einen guten, das Modell der 7β -HSDH mit einem R^2 von 98,48 % und einem \bar{R}^2 von 97,33 % sogar einen sehr guten Wert auf. Eine grafische Darstellung der Modelle ist in Abbildung 7.13 zu sehen.

Insgesamt lässt sich an bei den Modellen erkennen, dass in den gewählten Variablenräumen die Zelldichte den größten Einfluss auf den Umsatz hat, erkennbar an den großen Werten für β_1 . Im Modell der 3α -HSDH hat zusätzlich nur noch NAD (β_2) einen (positiven) Einfluss auf den Umsatz, während die NADP-Konzentration in der untersuchten Menge keinen Einfluss hat. Im Modell der 7β -HSDH übt hingegen NADP (β_3) einen positiven Einfluss auf den Umsatz auf, während NAD einen negativen Einfluss hat. Der negative Einfluss von NAD wird in der kompetitiven Inhibition der NADPH-Regenerierung vermutet, da beide Kofaktoren durch dasselbe Enzym regeneriert werden, und somit eine Erhöhung der NAD-Konzentration mit einer erhöhten Inhibitor-Konzentration gleichbedeutend ist. Dass dieser Inhibitionseffekt im Modell der 3α -HSDH durch NADP nicht signifikant zu beobachten war, liegt wahrscheinlich an der Tatsache, dass NAD im Vergleich zu NADP in ca. 5-facher Menge eingesetzt wurde und somit eine Erhöhung der NADP-Konzentration nur einen geringen Einfluss auf die kompetitive Inhibition ausübt. Interessant ist, dass in keinem der beiden Einzelmodelle signifikante Interaktionsterme zwischen den Variablen auftauchen, was jedoch nicht bedeutet, dass es in einem etwaigen Gesamtmodell keine signifikanten Interaktionen gäbe.

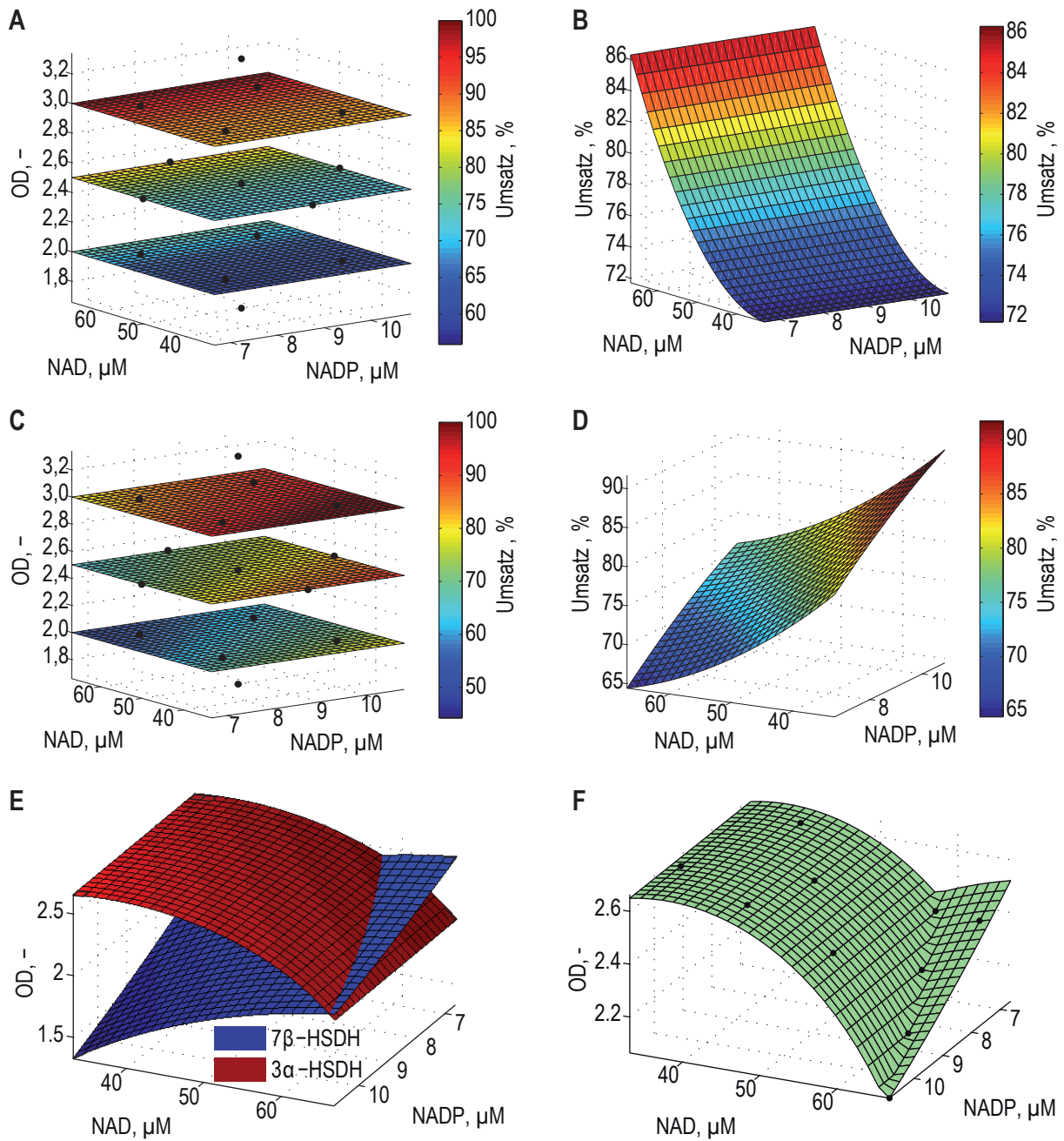


Abbildung 7.13: Empirische Modelle der Ganzzellbiokatalyse. **A:** Modell für den Umsatz der 3 α -HSDH nach 3 h, **B:** OD 2,5-Ebene des Modells der 3 α -HSDH, **C:** Modell für den Umsatz der 7 β -HSDH nach 3 h, **D:** OD 2,5-Ebene des Modells der 7 β -HSDH, **E:** Ebenen für Umsatzschwellenwerte der beiden Modelle, mit denen nach 8 h ≥ 99 % Umsatz des entsprechenden Enzyms erzielt werden kann, **F:** Kombinierte Fläche, oberhalb derer nach 8 h ≥ 99 % Umsatz für beide Enzyme erzielt werden können. Experimentelle Datenpunkte sind durch schwarze Punkte markiert.

Ein Ziel dieser Modellierung war es, Reaktionsbedingungen zu finden, mit denen nach 8 h Biotransformation $\geq 99\%$ 12-Keto-UDCA-Anteil zu erzielen sind. Da dieser Wert mit den meisten Ansätzen nach 8 h erzielt wird, konnten diese Messdaten nicht für eine Modellierung verwendet werden. Die beiden empirischen Modelle nach 3 h sind jedoch statische Modelle, die zunächst keine Aussage über den weiteren Reaktionsverlauf erlauben. Um dieses Dilemma zu umgehen, wurden für beide Modelle empirische Umsatz-Schwellenwerte nach 3 h definiert, bei denen nach 8 h ein Umsatz von $\geq 99\%$ für das jeweilige Enzym zu erzielen ist, dieser Schwellenwert beläuft sich bei der 3α -HSDH auf 76 % und bei der 7β -HSDH auf 65 %. Diese Werte basieren auf empirische Umsatzwerte der jeweiligen Enzyme nach 3 h und 8 h (vgl. Tabelle 7.4). Mit diesen Schwellenwerte können Flächen im Variablenraum berechnet werden, oberhalb derer sich diese Mindestumsätze erzielen lassen. Durch deren Kombination erhält man eine Gesamtfläche, oberhalb derer sich $\geq 99\%$ 12-Keto-UDCA-Anteil nach 8 h erzielen lassen. Um diese Aussagen zu überprüfen, wurden zehn Datenpunkte in dieser kombinierten Fläche für eine experimentelle Validierung ausgewählt. Die Flächen der Einzelmodelle, die kombinierte Fläche und die für die Validierung gewählten Datenpunkte sind in Abbildung 7.13 E und F gezeigt.

7.4.2 Modellvalidierung

Die experimentelle Validierung des Modells wurde gemäß der Beschreibung im vorhergehenden Kapitel durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen, Umsätze beider HSDH nach 3 h sowie die 12-Keto-UDCA-Anteile nach 8 h sind in Tabelle 7.6 aufgelistet. Zudem ist eine Gegenüberstellung experimentell erzielter und modellierter Umsätze nach 3 h in Abbildung 7.14 zu sehen.

Wie in Abbildung 7.14 zu erkennen, sind die Modellvorhersagen des 7β -HSDH-Modells akkurater als die der 3α -HSDH-Modells, was angesichts des besseren Bestimmtheitsmaßes des 7β -HSDH-Modells auch zu erwarten ist (vgl. Abschnitt 7.4.1). Trotzdem ist in beiden Validierungen eine insgesamt gute bis sehr gute Übereinstimmung von Modell und Experiment zu beobachten. Da sämtliche Datenpunkte in der Grenzfläche liegen, oberhalb derer $\geq 99\%$ 12-Keto-UDCA-Anteil nach einer Prozesszeit von 8 h postuliert werden, sind diese Werte in Tabelle 7.6 von besonderem Interesse. Mit Ausnahme von Ansatz 6 wird dieser 12-Keto-UDCA-Anteil bei

Tabelle 7.6: Umsätze der Validierungsansätze für die empirische Modellierung der Ganzzellreaktion. Aufgelistet sind die Reaktionsbedingungen, die Umsätze der 3 α -HSDH bzw. der 7 β -HSDH nach jeweils 3 h und 8 h Biotransformation sowie die 12-Keto-UDCA-Anteile der Ansätze nach 8 h Biotransformation. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.2 und 7.4.1. Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachansätze dargestellt.

Ansatz	OD ₆₀₀ , –	NAD, μ M	NADP, μ M	Umsatz nach 3 h, %		Umsatz nach 8 h, %		Anteil 12-Keto-UDCA nach 8 h, %
				3 α -HSDH	7 β -HSDH	3 α -HSDH	7 β -HSDH	
1	2,06	66,8	10,9	65,2 \pm 2,5	63,6 \pm 0,3	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
2	2,63	45,8	10,2	64,9 \pm 0,7	80,7 \pm 1,2	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
3	2,29	61,2	8,2	76,8 \pm 4,7	64,9 \pm 1,2	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
4	2,17	64,0	9,5	72,3 \pm 9,7	67,2 \pm 1,6	100,0 \pm 0,0	99,9 \pm 0,1	99,9 \pm 0,1
5	2,66	34,6	9,5	89,5 \pm 1,9	90,9 \pm 2,5	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
6	2,39	58,4	7,0	89,5 \pm 6,2	62,7 \pm 2,8	99,7 \pm 0,4	94,8 \pm 9,1	94,5 \pm 9,6
7	2,60	48,6	8,6	99,6 \pm 0,7	78,3 \pm 2,1	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
8	2,66	41,6	7,2	94,7 \pm 7,4	79,3 \pm 1,7	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
9	2,42	65,4	7,3	53,7 \pm 1,6	62,1 \pm 1,9	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
10	2,47	55,6	9,8	99,9 \pm 0,2	75,8 \pm 1,4	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0

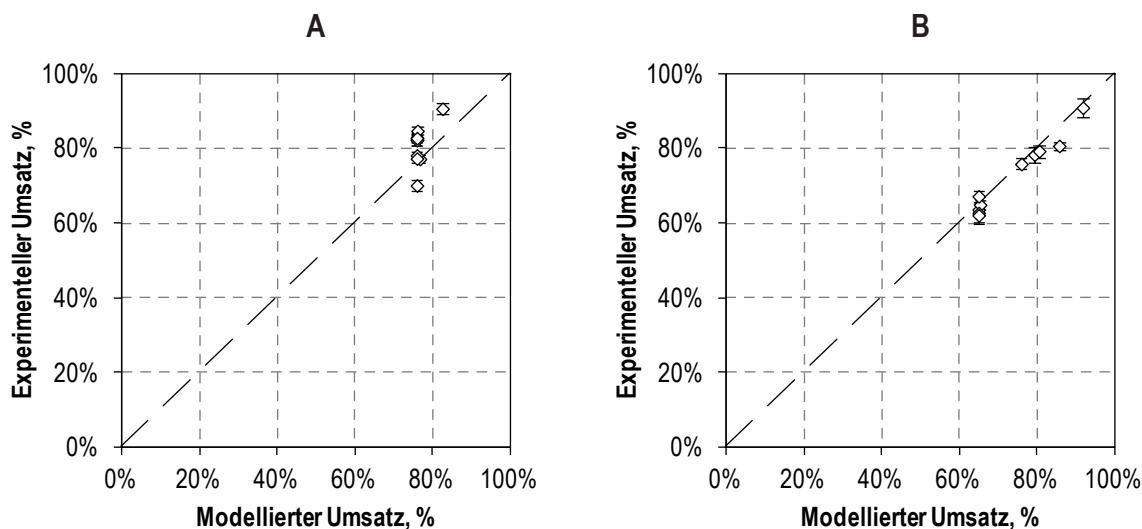


Abbildung 7.14: Gegenüberstellung experimentell erzielter und modellierter Umsätze nach 3 h Biotransformation. Gezeigt sind **A:** Umsätze der 3 α -HSDH und **B:** Umsätze der 7 β -HSDH. Die Reaktionen wurden im 20 mL-Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 in einem Satzverfahren mit pH-Regelung durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.2 und 7.4.1. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren gekennzeichnet.

sämtlichen Ansätzen erreicht. Der niedrigere Produktanteil in Ansatz 6 ist jedoch durch einen einzelnen Ansatz des Dreifachansatzes bedingt, bei dem nach 8 h lediglich 83,4 %-12-Keto-UDCA-Anteil gemessen wurde. Die beiden anderen Ansätze erzielten hingegen ≥ 99 % Produktanteil. Somit lässt sich konstatieren, dass die Validierung sowohl der Einzelmodelle nach 3 h als auch der postulierten Grenzfläche für ≥ 99 % 12-Keto-UDCA-Anteil nach 8 h erfolgreich war.

7.4.3 Modellanalyse und Diskussion

Nachdem die Validierung des empirischen Modells erfolgreich war, stellt sich die Frage, wofür dieses Modell verwendet werden kann. Die definierten Umsatzschwellenwerte grenzen hierbei einen Variablenraum ein, bei denen mit Sicherheit nach 8 h eine Produktanteil von $\geq 99\%$ erzielt werden kann. Hinsichtlich einer Optimierung der Ganzzellbiokatalyse, stellt diese Grenzfläche gleichzeitig Variablensätze mit minimalem Einsatz an Rohstoffen dar, mit dem das definierte Ziel erreicht werden kann. Sind zu den einzelnen Komponenten die jeweiligen Kosten bekannt, lässt sich durch Kombination der Grenzfläche mit einer Kostenfunktion eine Kostenoptimierung mit dem Modell durchführen.

Als Beispiele für so eine Kostenoptimierung sind in Abbildung 7.15 zwei Beispielszenarien gezeigt. Hierbei wurden die Kosten auf 1 mM NAD normiert, wodurch die Kosten für NAD mit 1 mM^{-1} angenommen werden. Weiterhin wurde die Kosten von NADP mit 5 mM^{-1} angenommen was dem tatsächlichen Kostenverhältnis dieser beiden Substanzen in etwa entspricht (Carl Roth, Stand März 2014). Für die Biokatalysatoren werden in Beispiel A angenommen, dass die Kosten von OD 1 an Zellen das 0,05-fache der Kosten von 1 mM NAD entsprechen ($0,05 \text{ OD}^{-1}$), während im Beispiel B vom 0,5-fachen der Kosten von 1 mM NAD ausgegangen wurde ($0,5 \text{ OD}^{-1}$). In den Darstellungen in Abbildung 7.15 lassen sich für diese beiden Annahmen die Kosten für einen Prozess anhand der Farbcodierung entnehmen. Wie zu sehen ist, sind die Kostenminima je nach Kostenannahme in anderen Bereichen der Grenzfläche zu finden, was die Wichtigkeit einer zuverlässigen Kostenfunktion für diese Optimierung verdeutlicht. Nichtsdestotrotz wurde mit diesem Modell ein zuverlässiges Werkzeug geschaffen, mit dem eine solche Optimierung durchgeführt werden kann.

Ein anderer Aspekt ist, dass diese Grenzflächen empirisch festgelegt wurden, anhand von Umsatzwerten nach 3 h, mit denen nach 8 h mit Sicherheit ein vollständiger Umsatz erzielt werden kann. Dies bedeutet zwar, dass alle Datenpunkte oberhalb der Grenzfläche diese Voraussetzung erfüllen, heißt jedoch im Umkehrschluss nicht, dass mit manchen Datenpunkten unterhalb der Grenzfläche nicht auch $\geq 99\%$ 12-Keto-UDCA-Anteil nach 8 h erreicht werden kann. Im Abschnitt 7.1 wurden mit OD 2 Zellen, $50 \mu\text{M}$ NAD und $10 \mu\text{M}$ NADP Zell- und Kofaktorkonzentrationen verwendet, die unterhalb dieser Grenzfläche angesiedelt sind, mit denen sich jedoch trotzdem ein vollständiger Umsatz erzielen ließ. Tatsächlich wurden in Ansatz 2 bei

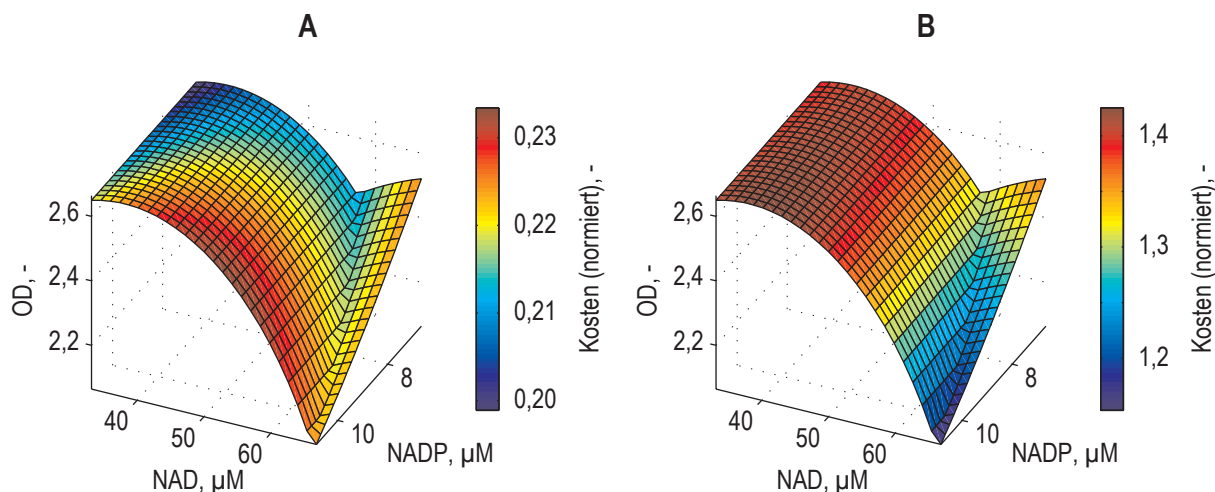


Abbildung 7.15: Beispielrechnungen für die Verwendung des empirischen Modells zur Kostenoptimierung mit auf 1 mM NAD normierten Kosten. **A:** Kostenbeispiel A mit $0,05 \text{ OD}^{-1}$ Zellkosten, 1 mM^{-1} NAD-Kosten und 5 mM^{-1} NADP-Kosten, **B:** Kostenbeispiel B mit $0,5 \text{ OD}^{-1}$ Zellkosten, 1 mM^{-1} NAD-Kosten und 5 mM^{-1} NADP-Kosten.

der Modellerstellung mit $\text{OD} 2$ Zellen, $40 \mu\text{M}$ NAD und $10 \mu\text{M}$ NADP im Vergleich zu den oben genannten Bedingungen nochmal $10 \mu\text{M}$ weniger NAD eingesetzt. Trotzdem konnte bei diesem Ansatz nach $8 \text{ h} \geq 99 \%$ 12-Keto-UDCA-Anteil erreicht werden. Dies steht allerdings nicht im Widerspruch zu dem Modell, sondern zeigt, dass es unterhalb der Grenzfläche durchaus Bereiche gibt, mit denen das definierte Ziel erreicht werden kann, was von dem Modell allerdings nicht mit Sicherheit vorhergesagt werden kann.

Das Vorhandensein solcher Bereiche zeigt die Grenzen einer solchen empirischen Modellierung auf. Der Vorteil eines solchen Ansatzes ist, dass mit wenigen experimentellen Daten ein aussagekräftiges Modell erstellt werden kann. Jedoch sind diese Modelle statisch und zeigen keine zeitlichen Verläufe der Reaktionen auf. Soll von den Modellen eines Zeitpunktes auf einen späteren Zeitpunkt geschlossen werden, so ist eine weitere empirische Erweiterung des Modells notwendig, die jedoch ungenau sein kann. In diesem Fall fehlen nach 8 h Biotransformation die Unterschiede in den Messdaten für eine umfassende empirische Erweiterung, da die meisten Ansätze bereits $\geq 99 \%$ 12-Keto-UDCA-Anteil erreicht haben. Eine Alternative zum empirischen Ansatz wäre eine dynamische mechanistische Modellierung, die im nachfolgenden Kapitel untersucht werden soll.

7.5 Diskussion

In diesem Kapitel wurde basierend auf den Ergebnissen von Kapitel 6 die Biokatalyse mit dem Ein-Zell-System mit GDH charakterisiert und optimiert. Optimierungsziel war hierbei eine Minimierung der eingesetzten Rohstoffe, gleichzeitig musste der Prozess robust und skalierbar sein.

Im ersten Schritt der Stammentwicklung konnten zwei verschiedene Ganzzellbiokatalysatoren hergestellt werden, die von ihrer Leistung her identisch sind, jedoch verschiedene Selektionsmarker tragen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Aktivitäten der Biokatalysatoren weitgehend robust gegenüber verschiedenen Kultivierungsbedingungen sind und die Kultivierung ohne weiteres auf den 50 L-Maßstab skaliert werden kann. Diese beiden Stämme und deren Robustheit bieten eine hohe Flexibilität bei der Zellherstellung, da auf anlagenspezifische Limitationen reagiert werden kann. Vor allem kann ein möglicher Einsatz von Antibiotika von den Spezifikationen der Produktionsanlage abhängig sein. So ist es durchaus üblich, dass beispielsweise in Produktionsanlage A nur Antibiotikum A, in Produktionsanlage B nur Antibiotikum B und in Produktionsanlage C überhaupt keine Antibiotika eingesetzt werden können. Diesem Umstand kann durch die beiden Stämme einfach durch Austausch des Produktionsstamms begegnet werden, ohne dass sich die Charakteristika des Ganzzellbiokatalysators verändern.

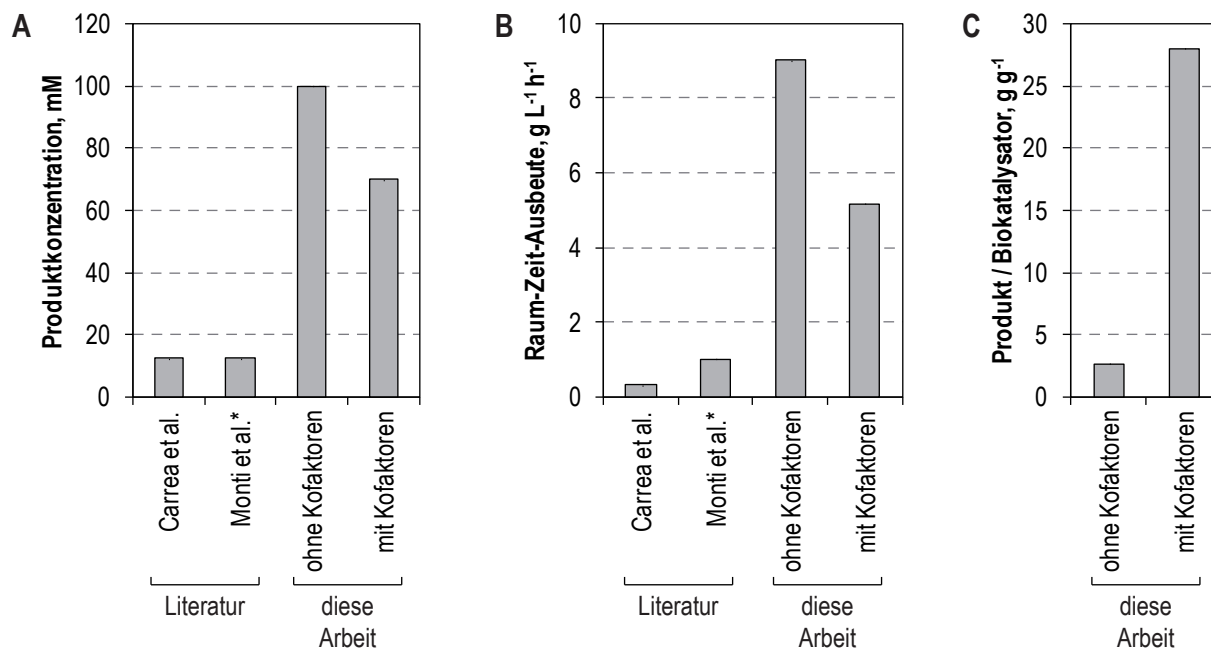
Ein weiterer Faktor für die Flexibilität des Prozesses ist die Entkopplung von Zellherstellung und Biokatalyse, was in industriellen Prozessen generell vorzuziehen ist (Pollard & Woodley, 2007). Bei industriell durchgeführten Hochzelllichtfermentationen können Zelldichten von über $100 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ erreicht werden (Riesenberg *et al.*, 1991), während für die Biokatalyse im vorliegenden Fall lediglich $1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen (entspricht OD 2) benötigt werden. Würde die Biokatalyse zwingend unmittelbar nach der Zellherstellung stattfinden, würde für die Biokatalyse entweder ein Reaktor benötigt, der um Faktor 100 größer ist, als der Fermenter, oder man müsste große Teile der Zellen verwerfen. Bei einer Entkopplung beider Prozesse ist jedoch eine stabile Lagerung der Zellen notwendig, da diese über einen längeren Zeitraum in diversen Ansätzen eingesetzt werden, diese Ansätze jedoch reproduzierbar die gleichen Ergebnisse erzielen sollten. Für die hier untersuchten Biokatalysatoren konnten Lagerbedingungen gefunden werden, bei denen innerhalb eines Zeitraums von 100 Tagen kein signifikanter Verlust an Akti-

vität festgestellt werden konnte, wodurch die gewünschte Entkopplung von Zellherstellung und Biokatalyse ermöglicht wird.

Bei der Biokatalysereaktion konnten die Zellkonzentration, Glycerin, $MgCl_2$, NAD und NADP als wesentliche Einflussfaktoren auf die Reaktionsgeschwindigkeit identifiziert werden. Vor allem die Zugabe von Kofaktoren ist als Einfluss entscheidend, da hiermit die Zellkonzentration um Faktor 15 gegenüber den Ergebnissen in Kapitel 6 verringert werden kann. Eine wichtige Erkenntnis hierbei ist, dass durch unterschiedliche Anteile der beiden Kofaktoren, die Reaktionen der beiden HSDH spezifisch beeinflusst werden können. Dieses Zusammenwirken der drei Einflussfaktoren wurde in einem empirischen Modell näher untersucht. Dabei konnte bestätigt werden, dass die Zellkonzentration auf die Reaktionen beider HSDH einen positiven Einfluss ausübt, während NAD selektiv die 3α -HSDH-Reaktion und NADP selektiv die 7β -HSDH-Reaktion beschleunigt. Letztere Reaktion wird zudem durch NAD inhibiert. Mit Hilfe des Modells konnten zudem Prozessbedingungen identifiziert werden, mit denen nach 8 h Biotransformation $\geq 99\%$ 12-Keto-UDCA-Anteil erzielt werden kann, so dass durch Kombination des Modells mit einer Kostenfunktion eine Kostenoptimierung durchgeführt werden kann.

Da bei einem Ganzzellbiokatalysator das Verhältnis der exprimierten Enzymaktivitäten nur schwer beeinflusst werden kann, bieten diese selektiven Einflüsse der beiden Kofaktoren eine wichtige Stellschraube, um ungleiche HSDH-Aktivitäten während des Prozesses auszugleichen. Diesem Umstand ist auch geschuldet, dass auf die Verwendung einer in Kapitel 5 erzeugten, NADH-spezifischen 7β -HSDH verzichtet wurde, da der Prozess dadurch einer Einstellmöglichkeit beraubt werden würde. Angesichts der geringen Menge an eingesetztem NADP ($10\ \mu M$) wiegt der Vorteil dieser Flexibilität den Verzicht von NADP bei Verwendung einer NADH-abhängigen 7β -HSDH auf.

Ein wichtiger Aspekt im vorliegenden Fall ist, dass eine vollständige Umsetzung ($\geq 99\%$) von DHCA zu 12-Keto-UDCA erfolgen muss, da das Vorliegen von Intermediaten, speziell der 7,12-Diketo-UDCA in der folgenden Wolff-Kishner-Reduktion in toxischen Nebenprodukten resultiert, die aufwändig abgetrennt werden müssen. Deswegen sollen zum Vergleich der erzielten Ergebnisse mit der Literatur nur Quellen herangezogen werden, bei denen ein vollständiger Umsatz berichtet wurde. Monti *et al.* (2009) gelang die vollständige Umset-



*mit CA als Substrat

Abbildung 7.16: Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit enzymatischen Syntheseprozessen von 12-Keto-UDCA aus der Literatur. Gezeigt sind **A:** finale Produktkonzentrationen und **B:** Raum-Zeit-Ausbeuten. Weiterhin sind in **C:** die Verhältnisse Masse gebildetes Produkts / Masse Biokatalysator der Prozesse dieser Arbeit gezeigt. Für den Vergleich werden Biotransformationen im Litermaßstab ohne Kofaktorzugabe (Abschnitt 6.4.3) sowie mit Kofaktorzugabe (7.1.2) herangezogen. Die Reaktion ohne Kofaktorzugabe wurde bei 25 °C und pH 6,5 durchgeführt, während die Reaktion des Ansatzes mit Kofaktorzugabe bei 30 °C und pH 7,0 durchgeführt wurde. Beide Reaktionen fanden im 1 L-Maßstab in einem Satzverfahren mit pH-Regelung statt.

zung von 12,5 mM CA zu 12-Keto-UDCA innerhalb von 5 h, während Carrea *et al.* (1992) den vollständigen Umsatz von 12,5 mM DHCA zu 12-Keto-UDCA innerhalb von 15 h beschreiben. Bei beiden kamen teilweise aus Wildtyp-Organismen isolierte Enzyme und jeweils 0,1 mM NAD und NADP zum Einsatz. Als Vergleich dazu sollen zwei Biotransformationen im Litermaßstab aus dieser Arbeit dienen. Der erste ist der Ansatz aus Abschnitt 6.4.3, bei dem keine Kofaktoren zugesetzt wurden. Hierbei wurden mit 15 g L⁻¹ Zellen 100 mM DHCA innerhalb von 4,5 h zu 12-Keto-UDCA umgesetzt. Der zweite sind die Ansätze aus Abschnitt 7.1.2, bei denen bei Einsatz von 50 µM NAD und 10 µM NADP, bei dem 1 g L⁻¹ Biokatalysatoren 70 mM DHCA innerhalb von 5,5 h vollständig zu 12-Keto-UDCA umgesetzt wurden.

Da der Vergleich zwischen Kosten von aus Wildtyp-Organismen isolierten Enzymen mit denen von rekombinanten Ganzzellbiokatalysatoren schwer zu ziehen ist, fällt dieser Aspekt in der Betrachtung weg. Insgesamt zeigt sich, dass mit dem rekombinanten Biokatalysator die achtfache Produktmenge gegenüber der Literatur hergestellt werden kann, mit im Vergleich zu Carrea *et al.* (1992) bis zu 27-fach erhöhter Raum-Zeit-Ausbeute (vgl. Abbildung 7.16). Auch

die eingesetzten Kofaktormengen sind mit dem rekombinanten Ganzzellbiokatalysator deutlich geringer. Monti *et al.* (2009) berichten zudem von einer isolierten Ausbeute von 73 % in der Synthese von 12-Keto-UDCA aus CA. Die isolierten Ausbeuten mit dem rekombinanten Ganzzellbiokatalysator im Litermaßstab waren durchgehend ≥ 95 %. Zusammen mit der geschätzten Ausbeute von ≥ 90 % im chemischen Oxidationsschritt von CA zu DHCA (Liu *et al.*, 2012) ergibt das eine Gesamtausbeute von ≥ 86 %, womit die isolierte Ausbeute in der Literatur übertroffen wird. Der Vergleich zum chemischen Prozess ist noch schwieriger zu ziehen, weswegen hier nur die Ausbeute betrachtet werden soll. Beim chemischen Prozess sind Ausbeuten von ≤ 30 % in der Literatur angegeben (Carrea *et al.*, 1992). Wenn die zuvor beschriebene Ausbeute von CA zu 12-Keto-UDCA mit der Ausbeute der Wolff-Kishner-Reduktion von geschätzten 60 – 80 % multipliziert wird (Hofmann, 1963), so ergibt sich eine Gesamtausbeute von mindestens 51 – 68 %, was grob einer Verdopplung der chemischen Ausbeute entspricht. Somit ist der entwickelte Prozess bei wichtigen Kennzahlen sowohl anderen enzymatischen Prozessen als auch dem chemischen Prozess überlegen.

Eine Frage hinsichtlich der Zielsetzung bleibt offen: Ist der Prozess wirtschaftlich? Da keine validen Zahlen vorliegen, muss diese Frage anhand von Kennzahlen aus der Literatur erörtert werden. Allgemein häufig verwendete Kennzahlen für die Wirtschaftlichkeit eines Prozesses sind Raum-Zeit-Ausbeuten sowie finale Produktkonzentrationen, welche auf die Betriebskosten einer Produktion abzielen. Weiterhin wird auch das Verhältnis Masse gebildeten Produkts / Masse Biokatalysator herangezogen, was auf die Kosten für den Biokatalysator abzielt. In der aktuellen Literatur finden sich diverse Richtwerte für diese Zahlen, die zum Teil große Diskrepanzen aufweisen. So sollen laut Pollard & Woodley (2007) Produktkonzentrationen vergleichbar zu chemischen Prozessen sein, bei denen mindestens 50 – 100 g L⁻¹ erzielt werden. Bei Wenda *et al.* (2011) hingegen werden Mindestkonzentrationen von Feinchemikalien mit 1 g L⁻¹ und für Pharmazeutika mit 0,1 g L⁻¹ angegeben, während Raum-Zeit-Ausbeuten über 0,1 g L⁻¹ h⁻¹ bzw. 0,001 g L⁻¹ h⁻¹ liegen müssen. Bei den beiden genannten Biotransformationsprozesse dieser Arbeit sind die Produktkonzentrationen 40 bzw. 28 g L⁻¹ (entspricht 100 bzw. 70 mM 12-Keto-UDCA), während die Raum-Zeit-Ausbeuten 9,0 bzw. 5,2 g L⁻¹ h⁻¹ betragen. Damit liegen diese Kennzahlen deutlich über den von Wenda *et al.* (2011) genannten Zahlen, während die Produktkonzentrationen zumindest vergleichbar zum von Pollard & Woodley (2007) genannten Bereich ist. Bei den Verhältnissen Masse gebildeten Produkts / Masse Bioka-

talysator wird für Ganzzellbiokatalysatoren bei Pollard & Woodley (2007) ein Mindestwert von 15 und bei Tufvesson *et al.* (2011) ein Wert von 10-35 angegeben. Bei den Biotransformationsprozessen dieser Arbeit liegt dieser Wert bei 2,7 bzw. 28, womit zumindest der optimierte Prozess mit verringerter Biokatalysatormenge die Literaturvorgaben erfüllt (vgl. Abbildung 7.16). Die Kennzahlen deuten also darauf hin, dass der Prozess tatsächlich wirtschaftlich sein könnte.

8 Mechanistische Modellierung der multienzymatischen Biotransformation

Der Ansatz der mechanistischen Modellierung gekoppelter Enzymreaktionen unterscheidet sich von der in Abschnitt 7.4 beschriebenen empirischen Modellierung in der Form, dass die ihr zu Grunde liegenden mathematischen Gleichungen auf Grundlage der tatsächlich vorliegenden Enzymmechanismen hergeleitet sind. Die Modellparameter beschreiben hierbei reale Binde- und Dissoziationsereignisse, die während der enzymkatalysierten Umsetzung von Substraten und Kofaktoren stattfinden. Ein solches Modell besteht aus Differenzialgleichungen, die Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit zur Konzentration der Enzyme, Reaktanden und Produkte setzt, wodurch ein dynamisches, zeitlich kontinuierliches Modell entsteht. Durch Integration eines solchen Modells lassen sich Verläufe von Reaktionen über die Zeit simulieren, was sich bei statischen empirischen Modellen nicht realisieren lässt.

8.1 Bestimmung von Enzymmechanismen

Eine Grundvoraussetzung für die mechanistische Modellierung von Enzymreaktionen ist die Kenntnis über den Mechanismus der untersuchten Enzyme. In der Literatur ist für viele GDH beschrieben, dass diese einem geordneten bi-bi-Mechanismus folgen, bei dem der Kofaktor NAD(P) das erstbindende und Glucose das zweitbindende Substrat ist (Bhaumik & Sonawat, 1999; Ohshima *et al.*, 2003; Pire *et al.*, 2004). Weiterhin wurde für die verwendete GDH aus *B. subtilis* bereits gezeigt, dass diese bis zu einer Konzentration von 200 mM Glucose und 4 mM NAD keine Substratinhibition aufweist (Hilt *et al.*, 1991). Für die Enzyme 3 α -HSDH und 7 β -HSDH sind die Angaben in der Literatur zum Enzymmechanismus nicht hinreichend, so dass die genauen Enzymmechanismen experimentell bestimmt werden müssen.

8.1.1 Enzymmechanismus der 7 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7 β -HSDH)

Für die 7 β -HSDH ist in der Literatur kein Enzymmechanismus beschrieben, jedoch ist in Braun (2011) gezeigt, dass eine Substratinhibition durch DHCA vorliegt.

Für die Ermittlung des Substratinhibitionsmechanismus wurden Kinetiken bei verschiedenen konstanten DHCA- und variablen NADH-Konzentrationen ermittelt, deren genaue Durchführung in Abschnitt 4.5.6 beschrieben ist. Die kinetischen Kurven dieser Messungen sind in der doppelt reziproke Auftragung in Abbildung 8.1 gezeigt. Bei niedrigen, nicht inhibierenden Substratkonzentrationen (100 – 300 μ M DHCA) lässt sich eine mit zunehmender Substratkonzentration abnehmende Steigung der Geraden erkennen, während sich alle drei Linien in einem Punkt im 2. Quadranten schneiden. Bei höheren Substratkonzentrationen verschieben sich die Geraden jedoch mit zunehmender Substratkonzentration parallel in y-Richtung, was auf eine unkompetitive Inhibierung durch das Substrat DHCA hindeutet (Segel, 1993).

Da bisher kein Enzymmechanismus für die 7 β -HSDH veröffentlicht ist, müssen hierbei einige grundlegende Möglichkeiten diskutiert werden. Grundsätzlich sind bei bi-bi Mechanismen die Varianten ordered bi-bi, random bi-bi und ping-pong denkbar. Der Theorell-Chance-Mechanismus stellt zusätzlich eine Sonderform des geordneten bi-bi-Mechanismus dar, weswegen dieser nicht gesondert diskutiert wird (vgl. Abschnitte 3.2.4 und 3.2.6). Bei der 7 β -HSDH, die zu der Familie der *short chain dehydrogenase / reductase* gehört, ist aufgrund der strukturellen Eigenschaften des Enzyms, und dessen aktiven Zentrums im Speziellen, eine direkte Übertragung des Hydridions von dem Kofaktor auf das Substrat notwendig, wodurch ein ping-pong-Mechanismus bereits *per se* ausgeschlossen werden kann. Ein random bi-bi-Mechanismus kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da für eine unkompetitive Inhibition das Bilden eines *dead-end* Komplexes notwendig ist. Dies ist allerdings selbst bei Bildung eines EBQ-Komplexes im Falle eines random bi-bi-Mechanismus nicht gegeben, da dieser Komplex in zwei Richtungen, EQ und EB, dissoziieren kann.

Durch die Homologie zu anderen HSDH kann bei der 7 β -HSDH angenommen werden, dass bei Vorliegen eines geordneten bi-bi-Mechanismus NADPH das erstbindende und DHCA das zweitbindende Substrat sein muss (Tanaka *et al.*, 1996b; Oppermann & Maser, 1996). Bei geordneten bi-bi-Systemen existieren generell zwei verschiedene Möglichkeiten durch die Inhibi-

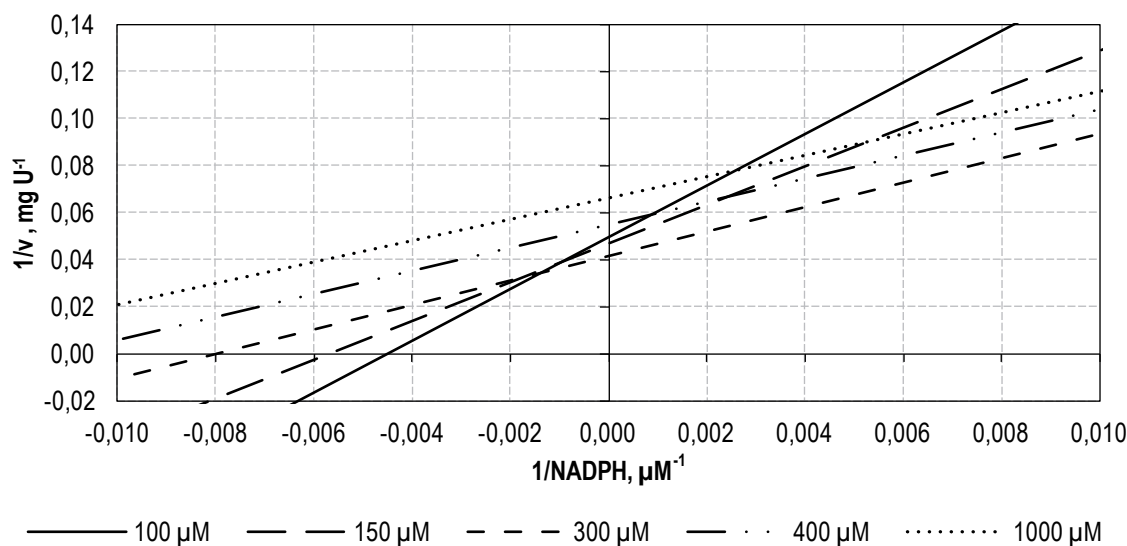


Abbildung 8.1: Doppelt reziproke Auftragung von Sättigungskinetiken der 7β -HSDH mit variierten NADPH-Konzentrationen bei verschiedenen konstanten DHCA-Konzentrationen. Die Reaktionen wurden im 250 μL -Maßstab in Mikrotiterplatten bei 30 °C und pH 7,0 durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.5.5 und 4.5.6.

tion mit dem zweitbindenden Substrat, dabei verfügt die EB-Inhibition, bei der das Substrat B an das freie Enzym bindet, über einen kompetitiven Charakter, während die EBQ-Inhibierung eine unkompetitive Inhibierung ist (Segel, 1993). Bei diesem Mechanismus bindet zunächst der Kofaktor NADPH an das Enzym, gefolgt vom Substrat DHCA, so dass ein ternärer Komplex entsteht. Nach der Reaktion wird zuerst das Produkt 3,12-diketo-UDCA freigesetzt und als letztes der oxidierte Kofaktor NADP. Bei der EBQ-Inhibierung kann ein Substratmolekül an den binären Komplex aus Enzym und oxidiertem Kofaktor binden, wodurch ein *dead-end* Komplex entsteht, der zu einer unkompetitiven Inhibition führt. Durch den unkompetitiven Charakter der Substratinhibierung lässt sich folgern, dass es sich hierbei um eine EBQ-Substratinhibierung handeln muss. Somit konnte nicht nur der genaue Mechanismus der Substratinhibition bei der 7β -HSDH aufgeklärt, sondern auch gezeigt werden, dass der grundlegende Enzymmechanismus ein ordered bi-bi-Mechanismus sein muss.

8.1.2 Enzymmechanismus der 3α -Hydroxysteroiddehydrogenase (3α -HSDH)

Für die 3α -HSDH wurde von Skålhegg (1974) am Substrat Androstanedion gezeigt, dass diese einem geordneten bi-bi-Mechanismus folgt, bei dem zunächst der Kofaktor NAD an das Enzym bindet und anschließend Androstanedion an den binären Enzym-Kofaktor-Komplex. Allerdings

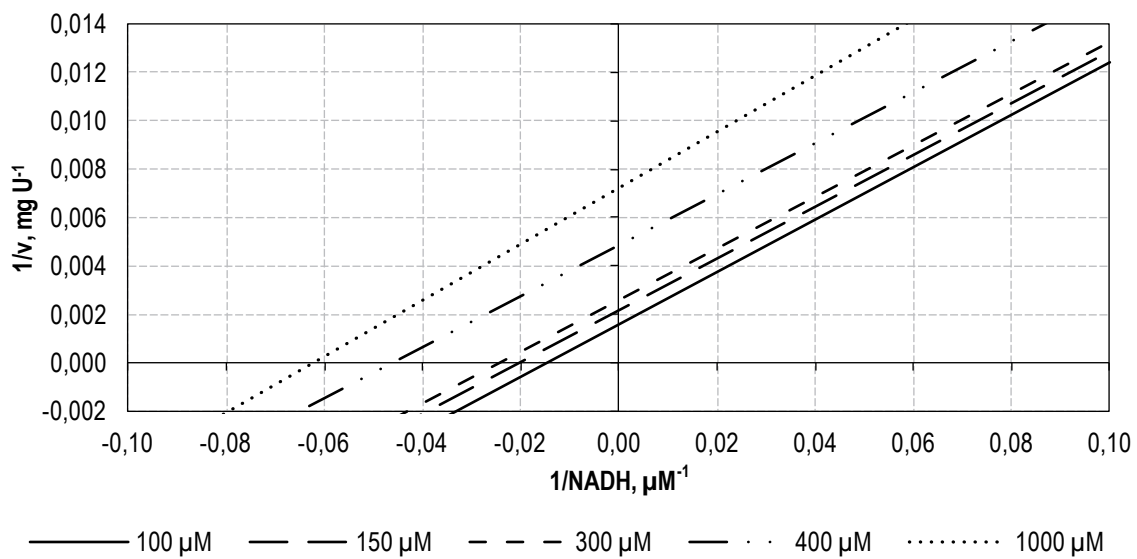


Abbildung 8.2: Doppelt reziproke Auftragung von Sättigungskinetiken der 3α -HSDH mit variierten NADH-Konzentrationen bei verschiedenen konstanten DHCA-Konzentrationen. Die Reaktionen wurden im $250\ \mu\text{L}$ -Maßstab in Mikrotiterplatten bei $30\ ^\circ\text{C}$ und $\text{pH}\ 7,0$ durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.5.5 und 4.5.6.

sind in der Literatur keine Quellen bekannt, die eine Substratinhibition der 3α -HSDH mit dem Substrat DHCA beschreiben, die jedoch Vorversuchen zufolge auftritt. Demnach ist im Zuge der mechanistischen Modellierung der 3α -HSDH zu klären, durch welchen Mechanismus diese Substratinhibition hervorgerufen wird.

Für die Ermittlung des Enzymmechanismus wurden *steady-state* Kinetiken der 3α -HSDH bei verschiedenen konstanten DHCA- und variablen NADH-Konzentrationen, wie in Abschnitt 4.5.6 beschrieben, untersucht. Die doppelt reziproke Auftragung der kinetischen Kurven sind in Abbildung 8.2 gezeigt. Anders als bei der 7β -HSDH erfolgt schon ab einer DHCA-Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ DHCA eine mit zunehmender Substratkonzentration parallele Verschiebung der Geraden in y-Richtung. Hierdurch ist eine unkompetitive Inhibition durch das Substrat DHCA zu erkennen (Segel, 1993), die im Vergleich zur 7β -HSDH bereits bei viel niedrigeren DHCA-Konzentrationen einsetzt. Wie bereits in Abschnitt 8.1.1 diskutiert, lässt sich auch bei der 3α -HSDH folgern, dass eine EBQ-Substratinhibition vorliegen muss.

8.2 Herleitung mechanistischer Einzelenzymmodelle

Mit Kenntnis der zugrunde liegenden Enzymmechanismen können nun Enzym- und Prozessmodelle definiert werden, mit denen die mechanistische Modellierung der Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA durchgeführt werden kann. Sofern diese bereits in der Literatur beschrieben sind, können diese Modelle direkt oder in angepasster Form verwendet werden. Andere Modelle müssen, wie unter Abschnitt 4.8.4 beschrieben, eigens hergeleitet werden.

8.2.1 Ordered bi-bi-Mechanismus unter Vernachlässigung des zuerst dissoziierenden Produkts (P)

Wie unter Abschnitt 8.1 diskutiert, kann bei der GDH-Reaktion von einem ordered bi-bi-Mechanismus ausgegangen werden, dessen Geschwindigkeitsgleichung in der Literatur zu finden ist (Segel, 1993):

$$v = \frac{V_1 V_2 [A][B] - \frac{V_1 V_2}{K_{eq}} [P][Q]}{K_{ia} K_{mB} V_2 + K_{mB} V_2 [A] + K_{mA} V_2 [B] + \frac{V_1 K_{mQ}}{K_{eq}} [P] + \frac{V_1 K_{mP}}{K_{eq}} [Q] + V_2 [A][B] + \frac{V_1 K_{mQ}}{K_{eq} K_{ia}} [A][P] + \frac{K_{mA} V_2}{K_{iq}} [B][Q] + \frac{V_1}{K_{eq}} [P][Q] + \frac{V_2}{K_{ip}} [A][B][P] + \frac{V_1}{K_{eq} K_{ib}} [B][P][Q]} \quad (8.1)$$

Die Eigenschaften des entstehenden Produkts Glucono-1,5-Lacton zwingen jedoch zu einer Anpassung dieser Gleichung. In der GDH-katalysierten Reaktion wird Glucose unter NAD(P)-Verbrauch zu Glucono-1,5-Lacton oxidiert. Letzteres hydrolysiert anschließend spontan zunächst zu Gluconsäure, welches unter neutralen Bedingungen weiter zu Gluconat deprotoniert. Diese spontanen Reaktionen verlaufen schnell und quasi irreversibel, so dass für die Modellierung angenommen wird, dass zu keinem Zeitpunkt Glucono-1,5-Lacton vorliegt und somit $P = 0 \text{ mM}$ gilt. Die Gleichung vereinfacht sich dadurch zu:

$$v = \frac{V_1 V_2 [A][B]}{K_{ia} K_{mB} V_2 + K_{mB} V_2 [A] + K_{mA} V_2 [B] + \frac{V_1 K_{mP}}{K_{eq}} [Q] + V_2 [A][B] + \frac{K_{mA} V_2}{K_{iq}} [B][Q]} \quad (8.2)$$

Da gemäß der Haldane-Beziehung in Gleichung 3.21 folgendes gilt (Cleland, 1982):

$$\frac{V_1 K_{mP}}{K_{eq}} = \frac{K_{ia} K_{mB} V_2}{K_{iq}} \quad (8.3)$$

kann die Geschwindigkeitsgleichung wie folgt angegeben werden:

$$v = \frac{V_1 [A][B]}{K_{ia} K_{mB} \left(1 + \frac{[Q]}{K_{iq}}\right) + K_{mB} [A] + K_{mA} [B] \left(1 + \frac{[Q]}{K_{iq}}\right) + [A][B]} \quad (8.4)$$

8.2.2 Ordered bi-bi-Mechanismus mit EBQ-Substratinhibition

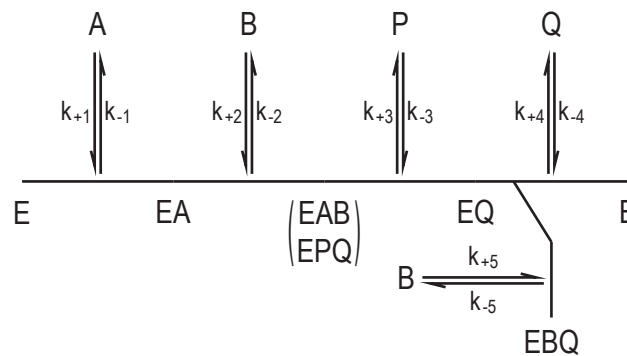


Abbildung 8.3: Schema eines ordered bi-bi-Mechanismus mit EBQ-Substratinhibition.

Für den ordered bi-bi-Mechanismus mit EBQ-Substratinhibition findet sich keine komplette Geschwindigkeitsgleichung in der Literatur, womit diese mittels King-Altman-Verfahren hergeleitet werden muss. In Abbildung 8.3 ist das Schema dieser Reaktion dargestellt, anhand dessen sichtbar ist, dass im Vergleich zu dem einfachen ordered bi-bi-Mechanismus folgende zwei zusätzlichen Mikroreaktionen definiert werden müssen:



Nach Durchführung des King-Altman-Verfahrens und Division von Zähler und Nenner durch k_{-5} ergibt sich folgende Geschwindigkeitsgleichung:

$$v = \frac{Num_1[A][B] - Num_2[P][Q]}{Const + Coef_A[A] + Coef_B[B] + Coef_P[P] + Coef_Q[Q] \left(1 + \frac{k_{+5}}{k_{-5}}[B]\right) + Coef_{AB}[A][B] \left(1 + \frac{k_{+3}k_{+5}}{(k_{+3}+k_{+4})k_{-5}}[B]\right) + Coef_{AP}[A][P] + Coef_{BQ}[B][Q] \left(1 + \frac{k_{+5}}{k_{-5}}[B]\right) + Coef_{PQ}[P][Q] + Coef_{ABP}[A][B][P] + Coef_{BPQ}[B][P][Q]} \quad (8.7)$$

mit:

$$\begin{array}{ll} Num_1 & = k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4} & Coef_{AB} & = k_{+1}k_{+2}(k_{+3} + k_{+4}) \\ Num_2 & = k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4} & Coef_{AP} & = k_{+1}k_{-2}k_{-3} \\ Const & = k_{-1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3}) & Coef_{BQ} & = k_{+2}k_{+3}k_{-4} \\ Coef_A & = k_{+1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3}) & Coef_{PQ} & = k_{-3}k_{-4}(k_{-1} + k_{-2}) \\ Coef_B & = k_{+2}k_{+3}k_{+4} & Coef_{ABP} & = k_{+1}k_{+2}k_{-3} \\ Coef_P & = k_{-1}k_{-2}k_{-3} & Coef_{BPQ} & = k_{+2}k_{-3}k_{-4} \\ Coef_Q & = k_{-1}k_{-4}(k_{-2} + k_{+3}) & & \end{array}$$

Demnach sind die Koeffizienten identisch zum ordered bi-bi-Mechanismus. Die Gleichung lässt sich auch mit kinetischen Konstanten gemäß Cleland-Definition darstellen:

$$v = \frac{V_1V_2[A][B] - \frac{V_1V_2}{K_{eq}}[P][Q]}{K_{ia}K_{mB}V_2 + K_{mB}V_2[A] + K_{mA}V_2[B] + \frac{V_1K_{mQ}}{K_{eq}}[P] + \frac{V_1K_{mP}}{K_{eq}}[Q] \left(1 + \frac{[B]}{K_{ii}}\right) + V_2[A][B] \left(1 + \frac{[B]}{K_{ml}}\right) + \frac{V_1K_{mQ}}{K_{eq}K_{ia}}[A][P] + \frac{K_{mA}V_2}{K_{iq}}[B][Q] \left(1 + \frac{[B]}{K_{ii}}\right) + \frac{V_1}{K_{eq}}[P][Q] + \frac{V_2}{K_{ip}}[A][B][P] + \frac{V_1}{K_{eq}K_{ib}}[B][P][Q]} \quad (8.8)$$

wobei folgende zwei Inhibitionskonstanten zusätzlich definiert werden:

$$K_{ml} = \frac{Coef_{AB}}{Coef_{ABI}} = \frac{(k_{+3} + k_{+4})k_{-5}}{k_{+3}k_{+5}} \quad (8.9)$$

$$K_{ii} = \frac{Coef_Q}{Coef_{QI}} = \frac{Coef_{BQ}}{Coef_{BQI}} = \frac{k_{-5}}{k_{+5}} \quad (8.10)$$

Es lässt sich also erkennen, dass die Geschwindigkeitsgleichung weitestgehend mit der eines normalen ordered bi-bi-Mechanismus identisch ist und im Vergleich dazu lediglich drei Erweiterungen mit Inhibitionstermen im Nenner enthält. Die zusätzlichen Geschwindigkeitskonstanten k_{+5} und k_{-5} treten hierbei stets als Quotient auf und sind somit nicht unabhängig voneinander bestimmbar, weswegen diese Geschwindigkeitsgleichung insgesamt neun unabhängige Parameter enthält. Interessant ist bei dieser Gleichung, dass trotz des Vorliegens nur eines Inhibitors, zwei Inhibitionskonstanten definiert werden müssen. Hierbei stellt K_{ii} eine klassische Dissoziationskonstante des Inhibitors dar, welche üblicherweise einer Inhibitionskonstante entspricht. Beide Inhibitionskonstanten sind zudem nicht unabhängig voneinander, sondern korrelieren mit dem Faktor $(k_{+3} + k_{+4})/k_{+3}$.

Das Vorhandensein von zwei Inhibitionskonstanten erklärt zudem widersprüchliche Aussagen bezüglich der Existenz einer Geschwindigkeitsgleichung für diesen Enzymmechanismus: Segel (1993) weist darauf hin, dass sich zwar Terme für $[Q]$ und $[B][Q]$ eindeutig dem EQ-Komplex zuordnen lassen, der Term für $[A][B]$ jedoch sowohl dem EAB- als auch dem EQ-Komplex zugeordnet wird (vgl. Gleichungen 3.13ff.). Aus dieser Aussage wird demnach abgeleitet, dass keine Geschwindigkeitsgleichung existiere, dabei bezieht sich Segel (1993) jedoch auf die Definition einer einzigen Geschwindigkeitskonstante. Durch die Definition zweier verschiedener Inhibitionskonstanten lässt sich sehr wohl eine Geschwindigkeitsgleichung herleiten. Werden für eine Hinreaktion sämtliche Summanden mit $[P]$ und/oder $[Q]$ als Faktoren weggelassen, bleibt in der Geschwindigkeitsgleichung lediglich die Inhibitionskonstante K_{ml} übrig, welche einer apparenten Inhibitionskonstante, jedoch keiner Dissoziationskonstante, entspricht. Aus dem Grund ist in Cornish-Bowden (2012) eine Geschwindigkeitsgleichung für die Hinreaktion beschrieben (Gleichung 3.26), jedoch wird explizit hervorgehoben, dass diese Inhibitionskonstante nicht der Dissoziationskonstante entspricht. Die Geschwindigkeitsgleichung kann jedoch auch nur mit einer Inhibitionskonstante dargestellt werden, indem K_{ml} wie folgt substituiert wird:

$$K_{ml} = \frac{k_{+3} + k_{+4}}{k_{+3}} \cdot K_{ii} = \frac{K_{iq}V_2}{K_{mQ}V_1} \cdot K_{ii} \quad (8.11)$$

8.3 Abschätzung kinetischer Parameter der Einzelenzyme

8.3.1 Parameterschätzung für die Glucosedehydrogenase (GDH)

Die Parameterschätzung für die GDH erfolgte in zwei getrennten Versuchsreihen, jeweils für die Reaktionen mit NAD bzw. NADP als Kofaktor. Die experimentelle Durchführung ist in Abschnitt 4.5.7 beschrieben. Alle aufgezeichneten Verlaufskurven, gezeigt in Anhang C.1 und C.2, wurden verwendet, um die enzymkinetischen Parameter abzuschätzen, wie in Abschnitt 4.8.5 beschrieben. Als Geschwindigkeitsgleichung wurde Gleichung 8.4 verwendet, wobei $[B]$ die Glucose-Konzentration, $[A]$ der NAD- bzw. NADP-Konzentration und $[Q]$ der NADH- bzw. NADPH-Konzentration entspricht.

Die ermittelten Parameterwerte wurden zunächst auf Bestimmbarkeit überprüft. Hierzu sind die Box-Plots der Parameterwerte der 50 % besten Schätzungen in Abbildung 8.4 gezeigt. Wie zu erkennen ist, konvergieren sowohl im Modell der NAD- als auch der NADP-Reaktion sämtliche Parameter trotz zufälliger Startwerte zu jeweils einem bestimmten Wert, womit die Bestimmbarkeit sämtlicher Parameter gezeigt werden kann. Die einzelnen Parameterwerte und die geschätzten 68 %-Konfidenzintervalle, welche einer Standardabweichung (σ) entsprechen, sind in Tabelle 8.1 gezeigt. Die Konfidenzintervalle wurden hierbei mit Hilfe der Hesse-Matrix abgeschätzt und sind nicht mit den Standardabweichungen in Abbildung 8.4 A,B zu verwechseln. Im Vergleich der entsprechenden Parameterwerte bei Verwendung der beiden verschiedenen Kofaktoren lässt sich erkennen, dass die Werte innerhalb derselben Größenordnung

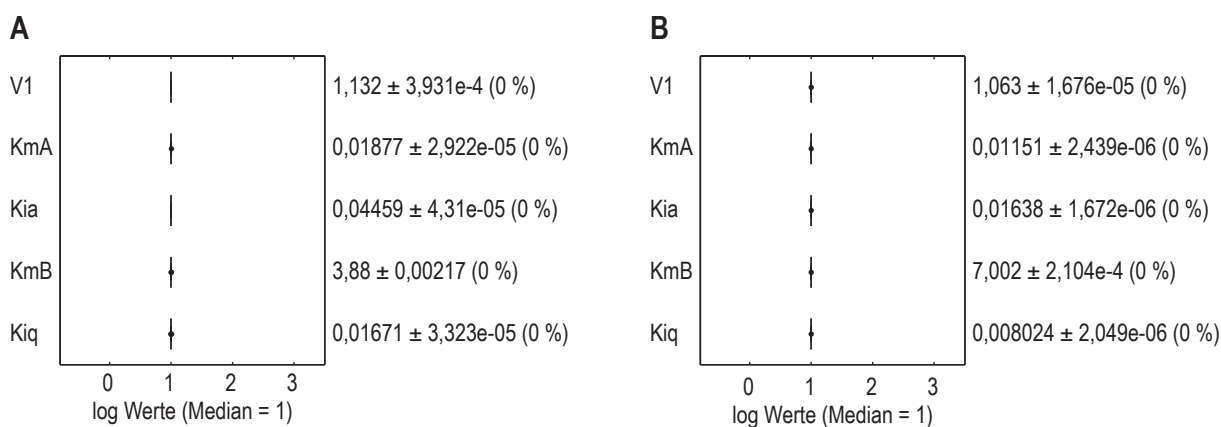


Abbildung 8.4: Box-Plots der enzymkinetischen Parameter der 50 % besten Schätzungen der GDH. Gezeigt ist in **A:** GDH-Modell mit NAD und **B:** GDH-Modell mit NADP. Angegeben sind die Mittelwerte der bestimmten Parameterwerte sowie deren absolute und relative Standardabweichungen.

Tabelle 8.1: Abgeschätzte Parameterwerte und deren Standardabweichungen für die GDH. Links sind die kinetischen Parameter für die Reaktion mit NAD, rechts für die Reaktion mit NADP als Kofaktor angegeben.

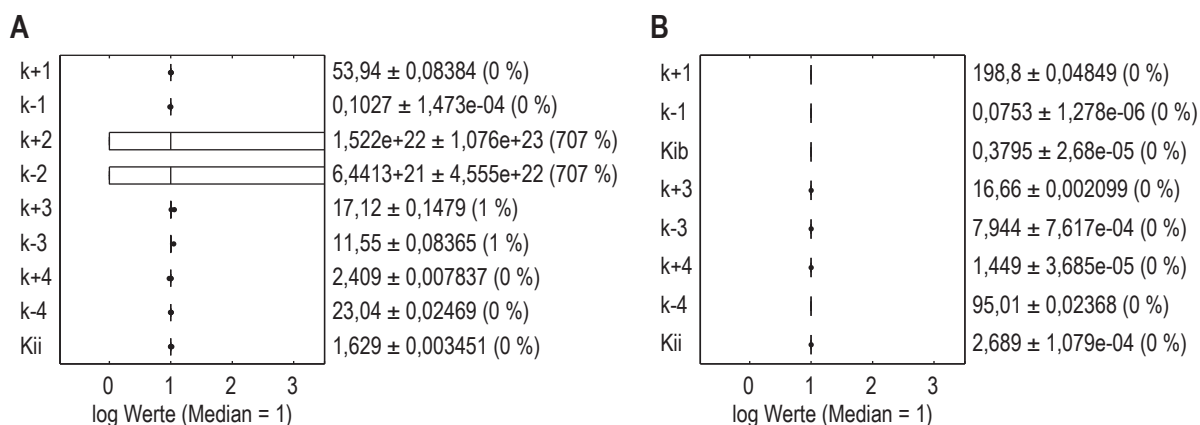
Parameter	Wert	σ	Parameter	Wert	σ
$V_{1,NAD}, U AU^{-1}$	1,132	0,014	$V_{1,NADP}, U AU^{-1}$	1,063	0,013
$K_{mA,NAD}, mM$	0,019	0,001	$K_{mA,NADP}, mM$	0,012	0,001
$K_{ia,NAD}, mM$	0,045	0,003	$K_{ia,NADP}, mM$	0,016	0,001
$K_{mB,NAD}, mM$	3,880	0,112	$K_{mB,NADP}, mM$	7,002	0,176
$K_{iq,NAD}, mM$	0,017	0,001	$K_{iq,NADP}, mM$	0,008	0,001

liegen. Die geschätzten 68 %-Konfidenzintervalle liegen mit einer Ausnahme innerhalb von 10 % des Parameterwerts.

8.3.2 Parameterschätzung für die 7 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7 β -HSDH)

Die Parameterschätzung für die 7 β -HSDH erfolgte mit dem Substrat/Produkt-Paar DHCA und 3,12-Diketo-UDCA. Die experimentelle Durchführung ist in Abschnitt 4.5.7 beschrieben. Die aufgezeichneten Verlaufskurven, gezeigt in Anhang C.3, wurden verwendet, um die enzymkinetischen Parameter abzuschätzen, wie in Abschnitt 4.8.5 beschrieben. Als Geschwindigkeitsgleichung wurde Gleichung 8.7 verwendet, wobei $[A]$ die NADPH-, $[B]$ die DHCA-, $[P]$ die 3,12-Diketo-UDCA- und $[Q]$ die NADP-Konzentration darstellt.

Nach der ersten Parameterschätzung ist auf den Box-Plots der Parameterwerte der 50 % besten Schätzungen (Abbildung 8.5 A) zu erkennen, dass sich die geschätzten Werte für k_{+2} und k_{-2} über mehrere Größenordnungen verteilen, mit einem Mittelwert bei ca.

**Abbildung 8.5:** Box-Plots der enzymkinetischen Parameter der 50 % besten Schätzungen der 7 β -HSDH. Gezeigt ist in **A:** 7 β -HSDH-Grundmodell und **B:** 7 β -HSDH-Modell nach Elimination nicht-bestimmbarer Parameter. Angegeben sind die Mittelwerte der bestimmten Parameterwerte sowie deren absolute und relative Standardabweichungen.

$10^{22} s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$ bzw. $10^{23} s^{-1} AU^{-1}$. Aus diesem Grund sind diese zwei Parameter einzeln nicht bestimmbar. Eine Analyse der paarweisen Korrelation dieser beiden Parameter ergibt jedoch eine fast perfekte x/y -Korrelation beider Werte, so dass diese beiden Parameter mutmaßlich paarweise in Form eines Quotienten bestimmbar sein sollten.

Für eine erneute Parameterschätzung muss zunächst die Geschwindigkeitsgleichung angepasst werden. Da k_{+2} und k_{-2} mehrere Größenordnungen größer sind als alle anderen Parameter, werden folgende Vereinfachungen getroffen:

$$k_{-2} + k_{+3} \approx k_{-2} \quad (8.12)$$

$$k_{-1} + k_{-2} \approx k_{-2} \quad (8.13)$$

Nach Kürzen der Geschwindigkeitsgleichung mit k_{+2} bleibt die Form der Gleichung 8.7 zwar die gleiche, allerdings verändern sich die Definition der Koeffizienten. In in der folgenden Auflistung ist (k_{-2}/k_{+2}) mit K_{ib} substituiert, was der Cleland-Definition von K_{ib} entspricht:

$$\begin{array}{ll} Num_1 & = k_{+1}k_{+3}k_{+4} & Coef_{AB} & = k_{+1}(k_{+3} + k_{+4}) \\ Num_2 & = k_{-1}K_{ib}k_{-3}k_{-4} & Coef_{AP} & = k_{+1}K_{ib}k_{-3} \\ Const & = k_{-1}k_{+4}K_{ib} & Coef_{BQ} & = k_{+3}k_{-4} \\ Coef_A & = k_{+1}k_{+4}K_{ib} & Coef_{PQ} & = k_{-3}k_{-4}K_{ib} \\ Coef_B & = k_{+3}k_{+4} & Coef_{ABP} & = k_{+1}k_{-3} \\ Coef_P & = k_{-1}K_{ib}k_{-3} & Coef_{BPQ} & = k_{-3}k_{-4} \\ Coef_Q & = k_{-1}k_{-4}K_{ib} & & \end{array}$$

Nach erneuter Parameterschätzung mit der modifizierten Geschwindigkeitsgleichung konvergieren sämtliche Parameter zu jeweils einem bestimmten Wert, wie im Box-Plot der 50 % besten Schätzungen (Abbildung 8.5 B) zu sehen ist. Damit sind sämtliche Werte bestimmbar. Die direkt bestimmten Parameterwerte und die geschätzten Standardabweichungen sind in Tabelle 8.2 gezeigt, wobei im Vergleich zu den GDH-Modellen höhere Standardabweichungen mit bis zu 20 % des Parameterwerts geschätzt wurden. Ebenfalls in der Tabelle gezeigt sind die daraus berechneten Werte der kinetischen Konstanten, die in ihrer Größenordnung mit einigen zuvor bestimmten Werten übereinstimmen (vgl. Abschnitt 5.1.2).

Tabelle 8.2: Abgeschätzte Parameterwerte und deren Standardabweichungen für die 7 β -HSDH. Oben sind die direkt abgeschätzten Geschwindigkeits- und kinetischen Konstanten, unten sind die daraus berechneten kinetischen Konstanten.

Parameter	Wert	σ	Parameter	Wert	σ
$k_{+1,7\beta}, s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$	199	39	$k_{+3,7\beta}, s^{-1} AU^{-1}$	16,7	2,4
$k_{-1,7\beta}, s^{-1} AU^{-1}$	0,075	0,002	$k_{-3,7\beta}, s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$	7,94	0,81
$K_{ib,7\beta}, mM$	0,379	0,030	$k_{+4,7\beta}, s^{-1} AU^{-1}$	1,45	0,06
---			$k_{-4,7\beta}, s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$	95,0	18,7
$K_{ii,7\beta}, mM$	2,69	0,18			

Parameter	Wert	Parameter	Wert
$V_{1,7\beta}, U AU^{-1}$	1,3	$K_{mP,7\beta}, mM$	0,009
$V_{2,7\beta}, U AU^{-1}$	0,075	$K_{ip,7\beta}, mM$	2,3
$K_{mA,7\beta}, mM$	0,007	$K_{mQ,7\beta}, mM$	0,0008
$K_{ia,7\beta}, mM$	0,0004	$K_{iq,7\beta}, mM$	0,015
$K_{mB,7\beta}, mM$	0,030	$K_{ml,7\beta}, mM$	2,9
$K_{ib,7\beta}, mM$	0,38	$K_{ii,7\beta}, mM$	2,7
$K_{eq,7\beta}, ---$	222		

8.3.3 Parameterschätzung für die 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 α -HSDH)

Für die Parameterschätzung bei der 3 α -HSDH wurde das Substrat/Produkt-Paar DHCA und 7,12-Diketo-UDCA verwendet. Wie bei den beiden Enzymen zuvor ist die experimentelle Durchführung in Abschnitt 4.5.7 beschrieben. Die aufgezeichneten Verlaufskurven, gezeigt in Anhang C.4, wurden verwendet, um die enzymkinetischen Parameter abzuschätzen, wie in Abschnitt 4.8.5 beschrieben. Als Geschwindigkeitsgleichung wurde wie bei der 7 β -HSDH die Gleichung 8.7 verwendet, wobei $[A]$ die NADH-, $[B]$ die DHCA-, $[P]$ die 7,12-Diketo-UDCA- und $[Q]$ die NAD-Konzentration darstellt.

Nach der ersten Parameterschätzung ist auf den Box-Plots der Parameterwerte für die 50 % besten Schätzungen (Abbildung 8.6 A) zu erkennen, dass sich die geschätzten Werte für k_{+2} , k_{-2} , k_{+3} und k_{-3} über mehrere Größenordnungen verteilen, bei denen der Mittelwert jeweils ca. $10^{11} s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$ bzw. $10^{11} s^{-1} AU^{-1}$ bei k_{+2} und k_{-2} sowie ca. $10^9 s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$ bzw. $10^9 s^{-1} AU^{-1}$ bei k_{+3} und k_{-3} beträgt. Somit sind bei der 3 α -HSDH im Gegensatz zur 7 β -HSDH nicht nur zwei, sondern vier Parameter einzeln nicht bestimmbar. Die Analyse der paarweisen Korrelationen zeigt jedoch fast perfekte x/y -Korrelation für die Parameterpaare k_{+2}/k_{-2} und k_{+3}/k_{-3} , wodurch diese paarweise als Quotient bestimmbar sein sollten.

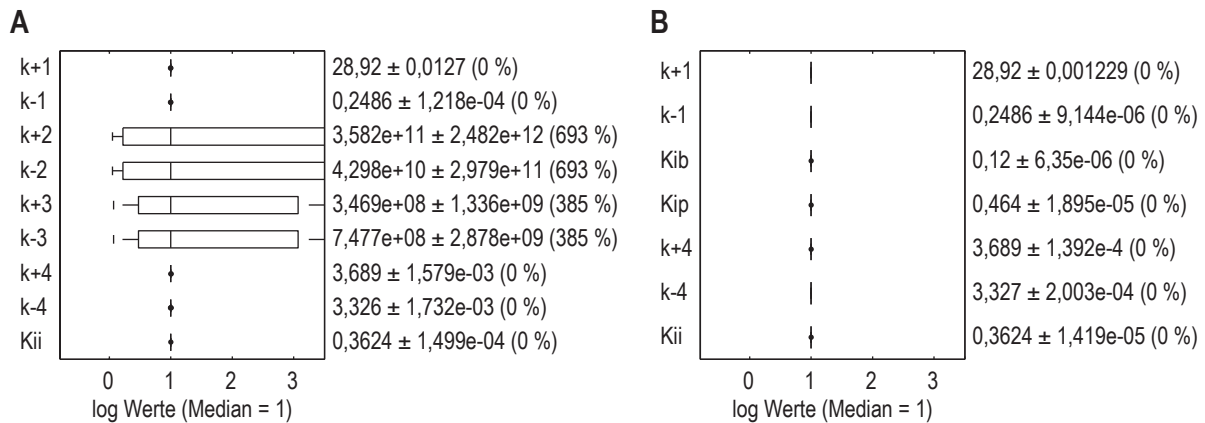


Abbildung 8.6: Box-Plots der enzymkinetischen Parameter der 50 % besten Schätzungen der 3 α -HSDH. Gezeigt ist in **A:** 3 α -HSDH-Grundmodell und **B:** 3 α -HSDH-Modell nach Elimination nicht-bestimbarer Parameter. Angegeben sind die Mittelwerte der bestimmten Parameterwerte sowie deren absolute und relative Standardabweichungen.

Für eine erneute Parameterschätzung wurde die Geschwindigkeitsgleichung auf Grundlage dessen angepasst, dass k_{+2} , k_{-2} , k_{+3} und k_{-3} mehrere Größenordnungen größer sind als alle anderen Parameter. Somit konnten folgende Vereinfachungen getroffen werden:

$$k_{+3} + k_{+4} \approx k_{+3} \quad (8.14)$$

$$k_{-1} + k_{-2} \approx k_{-2} \quad (8.15)$$

$$\frac{k_{-2} + k_{+3}}{k_{+2}k_{-3}} \approx 0 \quad (8.16)$$

Durch diese Vereinfachungen und nach Kürzen der Geschwindigkeitsgleichung mit k_{+2} und k_{-3} , verändert sich die Geschwindigkeitsgleichung aufgrund des Wegfallens mehrerer Terme und lässt sich nun wie folgt darstellen:

$$v = \frac{Num_1[A][B] - Num_2[P][Q]}{Coef_B[B] + Coef_P[P] + Coef_{AB}[A][B] \left(1 + \frac{[B]}{K_{ii}}\right) + Coef_{AP}[A][P] + Coef_{BQ}[B][Q] \left(1 + \frac{[B]}{K_{ii}}\right) + Coef_{PQ}[P][Q] + Coef_{ABP}[A][B][P] + Coef_{BPQ}[B][P][Q]} \quad (8.17)$$

mit:

$$\begin{array}{llll}
 \text{Num}_1 & = & k_{+1}K_{ip}k_{+4} & \text{Coef}_{AB} & = & k_{+1}K_{ip} & \text{Coef}_{PQ} & = & k_{-4}K_{ib} \\
 \text{Num}_2 & = & k_{-1}K_{ib}k_{-4} & \text{Coef}_{AP} & = & k_{+1}K_{ib} & \text{Coef}_{ABP} & = & k_{+1} \\
 \text{Coef}_B & = & K_{ip}k_{+4} & \text{Coef}_{BQ} & = & K_{ip}k_{-4} & \text{Coef}_{BPQ} & = & k_{-4} \\
 \text{Coef}_P & = & k_{-1}K_{ib} & & & & & &
 \end{array}$$

wobei (k_{-2}/k_{+2}) mit K_{ib} und (k_{+3}/k_{-3}) mit K_{ip} substituiert sind, was den Cleland-Definition von K_{ib} und K_{ip} entspricht. Weiterhin fällt K_{mI} weg, bzw. wird identisch zu K_{ii} .

Die Box-Plots der 50 % besten Schätzungen mit der modifizierten Geschwindigkeitsgleichung sind in Abbildung 8.6 B dargestellt. Wie zu sehen ist, konvergieren diesmal sämtliche Parameter zu jeweils einem Wert, womit diese bestimmbar sind. Die direkt abgeschätzten Parameterwerte und die geschätzten Standardabweichungen sind in Tabelle 8.3 gezeigt. Hierbei sind sämtliche geschätzten Standardabweichungen im Bereich $\leq 10\%$ des Parameterwerts, was für eine gute Konfidenz der Parameter spricht. Ebenfalls in der Tabelle gezeigt sind die berechneten Werte der kinetischen Konstanten, wobei die kinetischen Konstanten K_{mB} und K_{mP} aufgrund der getroffenen Vereinfachungen nicht berechnet werden können. Die Parameter K_{mA} und K_{ii} liegen in einer Größenordnung, wie sie auch aus anderen Versuchen zu vermuten gewesen wären (vgl. 8.1.2). Auffällig ist auch die deutlich stärkere Substratinhibition der 3α -HSDH im Vergleich zur 7β -HSDH, die sich im deutlich niedrigerem K_{ii} ausdrückt (0,36 mM gegenüber 2,7 mM). Dies

Tabelle 8.3: Abgeschätzte Parameterwerte und deren Standardabweichungen für die 3α -HSDH. Oben sind die direkt abgeschätzten Geschwindigkeits- und kinetischen Konstanten, unten sind die daraus berechneten kinetischen Konstanten.

Parameter	Wert	σ	Parameter	Wert	σ
$k_{+1,3\alpha}, s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$	28,9	0,8	$K_{ip,3\alpha}, mM$	0,464	0,027
$k_{-1,3\alpha}, s^{-1} AU^{-1}$	0,249	0,011	---		
$K_{ib,3\alpha}, mM$	0,120	0,008	$k_{+4,3\alpha}, s^{-1} AU^{-1}$	3,69	0,15
---			$k_{-4,3\alpha}, s^{-1} mM^{-1} AU^{-1}$	3,33	0,18
$K_{ii,3\alpha}, mM$	0,362	0,017			

Parameter	Wert	Parameter	Wert
$V_{1,3\alpha}, U AU^{-1}$	3,7	$K_{mP,3\alpha}, mM$	n.b.
$V_{2,3\alpha}, U AU^{-1}$	0,25	$K_{ip,3\alpha}, mM$	0,46
$K_{mA,3\alpha}, mM$	0,13	$K_{mQ,3\alpha}, mM$	0,075
$K_{iA,3\alpha}, mM$	0,009	$K_{iq,3\alpha}, mM$	1,1
$K_{mB,3\alpha}, mM$	n.b.	$K_{mI,3\alpha}, mM$	0,36
$K_{ib,3\alpha}, mM$	0,12	$K_{ii,3\alpha}, mM$	0,36
$K_{eq,3\alpha}, ---$	499		

stimmt ebenfalls mit den Beobachtungen des Abschnitts 8.1 überein, wonach die 3α -HSDH wesentlich stärker substratinhibiert sein muss als die 7β -HSDH.

8.3.4 Diskussion

Die Identifikation der jeweiligen enzymkinetischen Parameter ist ein wichtiger Schritt in der Erstellung eines gesamten Prozessmodells. Hierbei war es wichtig, nicht nur Parametersätze zu finden, die eine Lösung des Schätzungsproblems darstellen, sondern dass jeder einzelne Parameter auf seine Bestimmbarkeit untersucht wird, da diese mitunter von dem experimentellen Aufbau abhängt. So ist es durchaus möglich, dass manche Parameter unter gewissen experimentellen Bedingungen nicht bestimmbar sind, jedoch unter anderen sehr wohl. Nicht bestimmbare Parameter üben für gewöhnlich einen geringen Einfluss auf das Ergebnis des jeweiligen Experiments aus. Wird diese Nicht-Bestimmbarkeit nicht identifiziert, kann ein vermeintlich identifizierter Wert eines nicht bestimmbaren Parameters unter anderen experimentellen Bedingungen in falschen Modellvorhersagen resultieren.

Bei der Betrachtung der Einzelenzymmodelle fällt auf, dass bei den Modellen der GDH kinetische Konstanten geschätzt wurden, während sich die Parameteridentifikation bei den Modellen der beiden HSDH auf Geschwindigkeitskonstanten konzentrierte. Der Vorteil bei der Identifikation von Geschwindigkeitskonstanten ist, dass beispielsweise im Falle des ordered bi-bi-Mechanismus acht Geschwindigkeitskonstanten elf kinetischen Konstanten gegenüberstehen, was bedeutet, dass drei dieser Parameter in Wahrheit abhängige Parameter sind, deren Abhängigkeitsverhältnis durchaus komplex sein kann (Cleland, 1982; Straathof & Heijnen, 1996). Werden diese Abhängigkeitsverhältnisse als Einschränkungen im Modell berücksichtigt, kann das zu dem praktischen Problem führen, dass der Suchfunktion das Auffinden von Optima erschwert wird.

Weiterhin können selbst vermeintlich unabhängige kinetische Konstanten versteckte Abhängigkeiten aufweisen. So ist im ordered bi-bi-Mechanismus beispielsweise V_1 als $(k_{+3}k_{+4}) / (k_{+3} + k_{+4})$ während K_{mA} als $(k_{+3}k_{+4}) / (k_{+1}(k_{+3} + k_{+4}))$ definiert ist (Cleland, 1963a). Werden diese nicht berücksichtigt, so können Sätze an kinetischen Konstanten vermeintlich identifiziert werden, die bei der Umrechnung in Geschwindigkeitskonstanten zu negativen Parameterwerten einzelner Geschwindigkeitskonstanten führen, die aus physikalischer

Sicht keinen Sinn ergeben. Aus diesem Grund ist die Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten vorzuziehen, auch weil die Einschränkung auf positive Parameterwerte sich ohne Einschränkungen in der Suchfunktion allein durch Parameterschätzung im logarithmischen Suchraum realisieren lässt.

Der Grund, warum dennoch für die GDH kinetische Konstanten abgeschätzt wurden, liegt in der Vernachlässigung des Glucono-1,5-Lactons. Durch diese Vereinfachung stehen fünf kinetische Konstanten sieben Geschwindigkeitskonstanten gegenüber, wobei sich die Geschwindigkeitskonstanten in der Parameterschätzung als nicht mehr bestimmbar erwiesen – im Gegensatz zu den kinetischen Konstanten (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden unter der Prämisse der Bestimmbarkeit zwei verschiedene Ansätze für die Modellierung der Einzelenzymreaktionen verfolgt, was jedoch die Zusammenführbarkeit zu einem Gesamtprozessmodell nicht beeinträchtigt.

8.4 Herleitung des mechanistischen Prozessmodells

Nachdem die enzymkinetischen Parameter der Einzelenzyme abgeschätzt wurden, sollte ein kombiniertes Prozessmodell hergeleitet werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass für sämtliche Enzyme zwei miteinander konkurrierende Substrate bzw. Kofaktoren im Reaktionsansatz vorliegen.

8.4.1 Mechanismus der Glucosedehydrogenase (GDH) mit konkurrierenden Kofaktoren

Bei der Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA werden mit der NADH-abhängigen 3α -HSDH und der NADPH-abhängigen 7β -HSDH Enzyme eingesetzt, die verschiedene Kofaktoren benötigen. Beide werden hierbei von derselben GDH regeneriert. Dies wiederum bedeutet, dass zwei verschiedene erstbindende Substrate – NAD und NADP – um die Kofaktorbindestelle der GDH konkurrieren und sich somit gegenseitig kompetitiv inhibieren. Das Schema der Enzymreaktion ist in Abbildung 8.7 gezeigt. Hierbei stellen A_1 und Q_1 die zu betrachtenden erstbindenden Substrate / Produkte dar, während A_2 und Q_2 die nicht betrachteten, inhibitorisch wirkenden erstbindenden Substrate /Produkte darstellen.

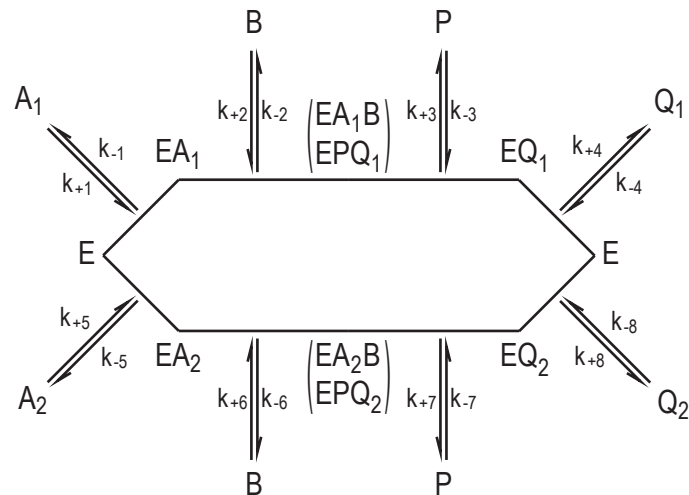


Abbildung 8.7: Schema eines ordered bi-bi-Mechanismus mit konkurrierenden erstbindenden Substraten.

Für die Modellierung ist es notwendig, die Regeneration der beiden Kofaktoren separat voneinander zu erfassen. Somit ist das Vorliegen einer Geschwindigkeitsgleichung notwendig, die zwischen beiden erstbindenden Substraten differenziert. Nach Anwendung des King-Altman-Verfahrens und dem Treffen der unter Abschnitt 8.2.1 beschriebenen Annahmen, ergibt sich für diesen Mechanismus folgende Geschwindigkeitsgleichung:

$$v = \frac{d[Q_1]}{dt} = \frac{n_4[A_1][B]^2 + n_6[A_1][B]}{d_{11}[Q_2][B]^2 + d_{14}[A_2][B]^2 + d_{17}[Q_1][B]^2 + d_{20}[A_1][B]^2 + d_{23}[B]^2 + d_{25}[Q_2][B] + d_{27}[A_2][B] + d_{29}[Q_1][B] + d_{31}[A_1][B] + d_{33}[B] + d_{34}[Q_2] + d_{35}[A_2] + d_{36}[Q_1] + d_{37}[A_1] + d_{38}} \quad (8.18)$$

mit:

$$\begin{aligned} n_4 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\ n_6 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{+8} (k_{-6} + k_{+7}) \\ d_{11} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{-8} \\ d_{14} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{+6} (k_{+7} + k_{+8}) \\ d_{17} &= k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\ d_{20} &= k_{+1}k_{+2} (k_{+3} + k_{+4}) k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\ d_{23} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\ d_{25} &= k_{-1}k_{+4} (k_{-2} + k_{+3}) k_{+6}k_{+7}k_{-8} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-8} (k_{-6} + k_{+7}) \\ d_{27} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{+8} (k_{-6} + k_{+7}) + k_{-1}k_{+4} (k_{-2} + k_{+3}) k_{+5}k_{+6} (k_{+7} + k_{+8}) \\ d_{29} &= k_{-1}k_{-4} (k_{-2} + k_{+3}) k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{-5}k_{+8} (k_{-6} + k_{+7}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
d_{31} &= k_{+1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3})k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+1}k_{+2}(k_{+3} + k_{+4})k_{-5}k_{+8}(k_{-6} + k_{+7}) \\
d_{33} &= k_{-1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3})k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{+8}(k_{-6} + k_{+7}) \\
d_{34} &= k_{-1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}k_{-8}(k_{-6}k_{+7}) \\
d_{35} &= k_{-1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3})k_{+5}k_{+8}(k_{-6}k_{+7}) \\
d_{36} &= k_{-1}k_{-4}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}k_{+8}(k_{-6}k_{+7}) \\
d_{37} &= k_{+1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}k_{+8}(k_{-6}k_{+7}) \\
d_{38} &= k_{-1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}k_{+8}(k_{-6}k_{+7})
\end{aligned}$$

Unter Berücksichtigung folgender Cleland-Definitionen:

$$K_{iq,1} = \frac{k_{-4}}{k_{+4}} \quad (8.19)$$

$$K_{iq,2} = \frac{k_{-8}}{k_{+8}} \quad (8.20)$$

lassen sich einige Terme wie folgt substituieren:

$$\begin{aligned}
d_{11} &= d_{23}/K_{iq,2} & d_{25} &= d_{33}/K_{iq,2} & d_{34} &= d_{38}/K_{iq,2} \\
d_{17} &= d_{23}/K_{iq,1} & d_{29} &= d_{33}/K_{iq,1} & d_{36} &= d_{38}/K_{iq,1}
\end{aligned}$$

Somit lässt sich die Geschwindigkeitsreaktion mit kinetischen Parametern wie folgt angeben:

$$v = \frac{V_{1,1}[A_1] \left(K_{mA,2} \frac{[B]}{K_{mB,1}} \frac{[B]}{K_{mB,2}} + K_{ia,2} \frac{[B]}{K_{mB,1}} \right)}{\left(K_{mA,2}[A_1] + K_{mA,1}[A_2] + K_{mA,1}K_{mA,2} \cdot \left(1 + \frac{[Q_1]}{K_{iq,1}} + \frac{[Q_2]}{K_{iq,2}} \right) \right) \frac{[B]}{K_{mB,1}} \frac{[B]}{K_{mB,2}} + \left(K_{ia,2}[A_1] + K_{mA,1}[A_2] + K_{mA,1}K_{ia,2} \cdot \left(1 + \frac{[Q_1]}{K_{iq,1}} + \frac{[Q_2]}{K_{iq,2}} \right) \right) \frac{[B]}{K_{mB,1}} + \left(K_{ia,1}[A_2] + K_{mA,2}[A_1] + K_{mA,2}K_{ia,1} \cdot \left(1 + \frac{[Q_1]}{K_{iq,1}} + \frac{[Q_2]}{K_{iq,2}} \right) \right) \frac{[B]}{K_{mB,2}} + \left(K_{ia,2}[A_1] + K_{ia,1}[A_2] + K_{ia,1}K_{ia,2} \cdot \left(1 + \frac{[Q_1]}{K_{iq,1}} + \frac{[Q_2]}{K_{iq,2}} \right) \right)} \quad (8.21)$$

Hierbei beziehen sich die Parameter $V_{1,1}$, $K_{mA,1}$, $K_{mB,1}$ etc. auf den Reaktionszweig mit dem Substrat A_1 und die Parameter $K_{mA,2}$, $K_{mB,2}$ etc. auf den Reaktionszweig mit dem Substrat A_2 .

Werden zudem sehr hohe Konzentrationen von B angenommen, d. h. sehr große $[B]/K_{mB,1}$ und zugleich $[B]/K_{mB,2}$, lässt sich die Geschwindigkeitsgleichung nochmals vereinfacht darstellen:

$$v \approx \frac{V_{1,1}[A_1]}{[A_1] + \left(1 + \frac{[A_2]}{K_{mA,2}} + \frac{[Q_1]}{K_{iq,1}} + \frac{[Q_2]}{K_{iq,2}}\right) K_{mA,1}} \quad (8.22)$$

An der vereinfachten Darstellung lässt sich gut erkennen, dass – wie bereits eingangs des Abschnittes behauptet – es sich hierbei um eine kompetitive Inhibition handelt, da sich der Inhibitionsterm im Nenner auf Seiten des konstanten Terms befindet. Weiterhin zeigt die vereinfachte Darstellung eine kompetitive Inhibierung durch die Produkte Q_1 und Q_2 , wie es für den Fall üblich ist, wenn die Konzentrationen an Q_1 und Q_2 nicht vernachlässigt werden. Aufgrund der Tatsache, dass diese Geschwindigkeitsreaktion nur die Reaktion eines Reaktionszweiges beschreibt, müssen das jeweils betrachtete Kofaktorpaar – NAD/NADH oder NADP/NADPH – und die dazugehörigen kinetischen Parameter entsprechend der Betrachtungsweise in die Gleichung eingesetzt werden. Die Gesamtgeschwindigkeit der GDH-Reaktion ergibt sich aus der Summe der NAD/NADH- und der NADP/NADPH-Reaktion.

8.4.2 Mechanismus der Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDH) mit konkurrierenden Gallensalzen

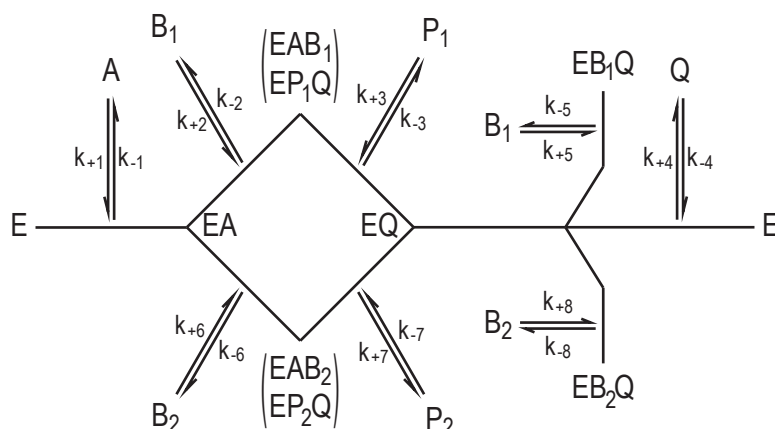


Abbildung 8.8: Schema eines ordered bi-bi-Mechanismus mit konkurrierenden zweifachbindenden Substraten und EBQ-Substratinhibition.

In der mehrstufigen Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA treten nicht nur bei der GDH zwei konkurrierende Substrate auf, sondern auch bei beiden HSDH. Die 3α -HSDH reduziert so-

wohl DHCA zu 7,12-Diketo-UDCA als auch 3,12-Diketo-UDCA zu 12-Keto-UDCA, während die 7 β -HSDH die Substrate DHCA bzw. 7,12-Diketo-UDCA akzeptiert und zu den Produkten 3,12-Diketo-UDCA bzw. 12-Keto-UDCA umsetzt. Anders als im Falle der GDH, bei der die Nikotinamid-Kofaktoren miteinander konkurrieren, handelt es sich bei den Gallensalzen um die zweitbindenden Substrate der HSDH. Weiterhin zu beachten ist, dass bei beiden HSDH eine EBQ-Substratinhibierung auftritt. Ein Schema des Enzymmechanismus ist in Abbildung 8.8 gezeigt.

Für die Herleitung der Geschwindigkeitsgleichung wurde das King-Altman-Verfahren verwendet. Da die beiden Gallensalz-Substrate der HSDH sich chemisch nur in der Anwesenheit einer Hydroxy- oder Oxo-Gruppe an C-3 bzw. C-7 unterscheiden, wurde zur Vereinfachung angenommen, dass die Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion beider Gallensalze identisch sind, und somit Folgendes gilt:

$$[k_{+2};k_{-2};k_{+3};k_{-3};k_{+5};k_{-5}] = [k_{+6};k_{-6};k_{+7};k_{-7};k_{+8};k_{-8}] \quad (8.23)$$

Durch diese Vereinfachung und nach Substitution der Konstanten $[k_{+6};k_{-6};k_{+7};k_{-7};k_{+8};k_{-8}]$ erhält man eine Geschwindigkeitsgleichung der folgenden Form:

$$v = \frac{d[P_1]}{dt} = \frac{Num_1[A][B_1] - Num_2[P_1][Q]}{Const + Coef_A[A] + Coef_B([B_1] + [B_2]) + Coef_P([P_1] + [P_2]) + Coef_Q[Q] \left(1 + \frac{k_{+5}}{k_{-5}}([B_1] + [B_2])\right) + Coef_{AB}[A]([B_1] + [B_2]) \left(1 + \frac{k_{+3}k_{+5}}{(k_{+3}+k_{+4})k_{-5}}([B_1] + [B_2])\right) + Coef_{AP}[A]([P_1] + [P_2]) + Coef_{BQ}([B_1] + [B_2])[Q] \left(1 + \frac{k_{+5}}{k_{-5}}([B_1] + [B_2])\right) + Coef_{PQ}([P_1] + [P_2])[Q] + Coef_{ABP}[A]([B_1] + [B_2])([P_1] + [P_2]) + Coef_{BPQ}([B_1] + [B_2])([P_1] + [P_2])[Q]} \quad (8.24)$$

mit:

$$\begin{aligned} Num_1 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4} & Coef_{AB} &= k_{+1}k_{+2}(k_{+3} + k_{+4}) \\ Num_2 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4} & Coef_{AP} &= k_{+1}k_{-2}k_{-3} \end{aligned}$$

$$\begin{array}{ll}
 \text{Const} & = k_{-1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3}) & \text{Coef}_{BQ} & = k_{+2}k_{+3}k_{-4} \\
 \text{Coef}_A & = k_{+1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3}) & \text{Coef}_{PQ} & = k_{-3}k_{-4}(k_{-1} + k_{-2}) \\
 \text{Coef}_B & = k_{+2}k_{+3}k_{+4} & \text{Coef}_{ABP} & = k_{+1}k_{+2}k_{-3} \\
 \text{Coef}_P & = k_{-1}k_{-2}k_{-3} & \text{Coef}_{BPQ} & = k_{+2}k_{-3}k_{-4} \\
 \text{Coef}_Q & = k_{-1}k_{-4}(k_{-2} + k_{+3}) & &
 \end{array}$$

Direkt nach Durchführung des King-Altman-Verfahrens enthält der Zähler zusätzlich zur oben angegebenen Gleichung folgenden Summanden:

$$\frac{k_{+2}k_{-2}k_{+3}k_{-3}}{k_{-2} + k_{+3}} (k_{+1}[A] + k_{-4}[Q]) ([B_1][P_2] - [B_2][P_1]) \quad (8.25)$$

Da aber durch die Annahme, dass die Geschwindigkeitskonstanten beider Substratreaktionen identisch sind, gelten muss:

$$\frac{[B_1]}{[P_1]} = \frac{[B_2]}{[P_2]} \quad (8.26)$$

führt das zu:

$$[B_1][P_2] - [B_2][P_1] = 0 \quad (8.27)$$

und somit zum Entfallen des Terms 8.25 aus dem Summanden. Die Geschwindigkeitsreaktion lässt sich wiederum mit kinetischen Konstanten gemäß Cleland-Definition darstellen:

$$v = \frac{V_1V_2[A][B_1] - \frac{V_1V_2}{K_{eq}}[P_1][Q]}{K_{ia}K_{mB}V_2 + K_{mB}V_2[A] + K_{mA}V_2([B_1] + [B_2]) + \frac{V_1K_{mQ}}{K_{eq}}([P_1] + [P_2]) + \frac{V_1K_{mP}}{K_{eq}}[Q] \left(1 + \frac{([B_1] + [B_2])}{K_{ii}}\right) + V_2[A]([B_1] + [B_2]) \left(1 + \frac{([B_1] + [B_2])}{K_{mi}}\right) + \frac{V_1K_{mQ}}{K_{eq}K_{ia}}[A]([P_1] + [P_2]) + \frac{K_{mA}V_2}{K_{iq}}([B_1] + [B_2])[Q] \left(1 + \frac{([B_1] + [B_2])}{K_{ii}}\right) + \frac{V_1}{K_{eq}}([P_1] + [P_2])[Q] + \frac{V_2}{K_{ip}}[A]([B_1] + [B_2])([P_1] + [P_2]) + \frac{V_1}{K_{eq}K_{ib}}([B_1] + [B_2])([P_1] + [P_2])[Q]} \quad (8.28)$$

Im Vergleich zu der Geschwindigkeitsgleichung mit nur einem Substrat (Gleichungen 8.7 und 8.8) lassen sich die Unterschiede der Geschwindigkeitsgleichung mit zwei konkurrierenden

Substraten wie folgt zusammenfassen: Im Zähler wurden das Substrat $[B]$ und das Produkt $[P]$ durch das jeweils zu betrachtenden Substrat-Produkt-Paar $[B_1]$ und $[P_1]$ ersetzt, während im Nenner $[B]$ und $[P]$ durch die Summen beider Substrate ($[B_1] + [B_2]$) und Produkte ($[P_1] + [P_2]$) ersetzt wurden.

Wie auch bei der für zwei konkurrierende Kofaktoren hergeleiteten Gleichung (Abschnitt 8.4.1), beschreibt diese Geschwindigkeitsgleichung lediglich die Reaktion eines der zwei Reaktionszweige, so dass die Gallensalze entsprechend der Betrachtungsweise entweder als $[B_1]$ und $[P_1]$ oder $[B_2]$ und $[P_2]$ eingesetzt werden müssen. Die Gesamtreaktion ergibt sich aus der Summe beider Reaktionszweige. In der Summe beider Reaktionszweige lässt sich zudem beobachten, dass auch im Zähler ($[B_1] + [B_2]$) bzw. ($[P_1] + [P_2]$) an der Position stehen, an der in der Geschwindigkeitsgleichung mit nur einem Substrat (Gleichungen 8.7 und 8.8) $[B]$ und $[P]$ auftauchen. Somit lässt sich die Gesamtreaktion auch als Geschwindigkeitsgleichung mit nur einem Substrat sehen, bei der $[B]$ und $[P]$ durch die Summe beider Substrate und Produkte, ($[B_1] + [B_2]$) und ($[P_1] + [P_2]$), substituiert sind.

Ausgehend von der in Abschnitt 8.3 aufgeführten Nicht-Bestimmbarkeit einzelner Parameter, wird diese Geschwindigkeitsgleichung für die jeweiligen Enzyme angepasst werden. Für die 7 β -HSDH bleibt die Form der Gleichung 8.24 erhalten, die Definitionen der Koeffizienten verändern sich hingegen wie folgt:

$$\begin{array}{ll}
 Num_1 & = k_{+1}k_{+3}k_{+4} & Coef_{AB} & = k_{+1}(k_{+3} + k_{+4}) \\
 Num_2 & = k_{-1}K_{ib}k_{-3}k_{-4} & Coef_{AP} & = k_{+1}K_{ib}k_{-3} \\
 Const & = k_{-1}k_{+4}K_{ib} & Coef_{BQ} & = k_{+3}k_{-4} \\
 Coef_A & = k_{+1}k_{+4}K_{ib} & Coef_{PQ} & = k_{-3}k_{-4}K_{ib} \\
 Coef_B & = k_{+3}k_{+4} & Coef_{ABP} & = k_{+1}k_{-3} \\
 Coef_P & = k_{-1}K_{ib}k_{-3} & Coef_{BPQ} & = k_{-3}k_{-4} \\
 Coef_Q & = k_{-1}k_{-4}K_{ib} & &
 \end{array}$$

Bei der 3 α -HSDH hingegen vereinfacht sich die Geschwindigkeitsgleichung zu folgender Gleichung:

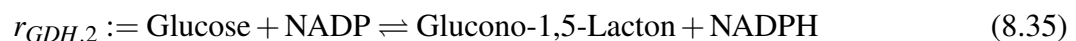
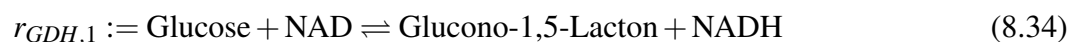
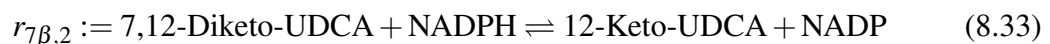
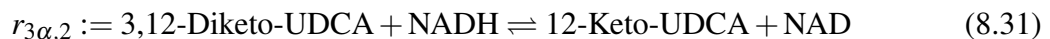
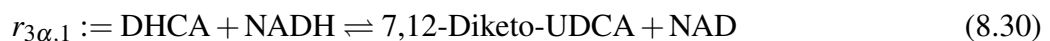
$$v = \frac{Num_1[A][B_1] - Num_2[P_1][Q]}{Coef_B([B_1] + [B_2]) + Coef_P([P_1] + [P_2]) + Coef_{AB}[A]([B_1] + [B_2]) \left(1 + \frac{([B_1] + [B_2])}{K_{ii}}\right) + Coef_{AP}[A]([P_1] + [P_2]) + Coef_{BQ}([B_1] + [B_2])[Q] \left(1 + \frac{([B_1] + [B_2])}{K_{ii}}\right) + Coef_{PQ}([P_1] + [P_2])[Q] + Coef_{ABP}[A]([B_1] + [B_2])([P_1] + [P_2]) + Coef_{BPQ}([B_1] + [B_2])([P_1] + [P_2])[Q]} \quad (8.29)$$

mit:

$$\begin{array}{ll} Num_1 & = k_{+1}K_{ip}k_{+4} & Coef_{AP} & = k_{+1}K_{ib} \\ Num_2 & = k_{-1}K_{ib}k_{-4} & Coef_{BQ} & = K_{ip}k_{-4} \\ Coef_B & = K_{ip}k_{+4} & Coef_{PQ} & = k_{-4}K_{ib} \\ Coef_P & = k_{-1}K_{ib} & Coef_{ABP} & = k_{+1} \\ Coef_{AB} & = k_{+1}K_{ip} & Coef_{BPQ} & = k_{-4} \end{array}$$

8.4.3 Mechanistische Prozessmodelle für die Reduktion von Dehydrocholsäure

Für das mechanistische Prozessmodell der Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA werden zunächst die Einzelreaktionen des Reaktionsnetzwerks wie folgt definiert:



Die jeweiligen Geschwindigkeitsgleichungen sind in den Abschnitten 8.4.1 und 8.4.2 beschrieben. Das dynamische Prozessmodell für einen Satzprozess im idealen Rührkesselreaktor wird durch Kopplung der Stoffbilanzen mit den Enzymkinetiken erzeugt:

$$\frac{dDHCA}{dt} = -r_{3\alpha,1} - r_{7\beta,1} \quad (8.36)$$

$$\frac{d3,12\text{-Diketo-UDCA}}{dt} = +r_{7\beta,1} - r_{3\alpha,2} \quad (8.37)$$

$$\frac{d7,12\text{-Diketo-UDCA}}{dt} = +r_{3\alpha,1} - r_{7\beta,2} \quad (8.38)$$

$$\frac{d12\text{-Keto-UDCA}}{dt} = +r_{3\alpha,2} + r_{7\beta,2} \quad (8.39)$$

$$\frac{dNAD}{dt} = -r_{GDH,1} + r_{3\alpha,1} + r_{3\alpha,2} \quad (8.40)$$

$$\frac{dNADP}{dt} = -r_{GDH,2} + r_{7\beta,1} + r_{7\beta,2} \quad (8.41)$$

$$\frac{dNADH}{dt} = +r_{GDH,1} - r_{3\alpha,1} - r_{3\alpha,2} \quad (8.42)$$

$$\frac{dNADPH}{dt} = +r_{GDH,2} - r_{7\beta,1} - r_{7\beta,2} \quad (8.43)$$

$$\frac{dGlucose}{dt} = -r_{GDH,1} - r_{GDH,2} \quad (8.44)$$

$$\frac{dGlucono-1,5\text{-Lacton}}{dt} = +r_{GDH,1} + r_{GDH,2} \quad (8.45)$$

Wie bereits in Abschnitt 8.2.1 beschrieben, reagiert Glucono-1,5-Lacton in einer schnellen Reaktion spontan und quasi irreversibel zu Gluconat. Aus dem Grund werden die Konzentrationen an Glucono-1,5-Lacton in den einzelnen Geschwindigkeitsreaktionen mit 0 angenommen. Die Berücksichtigung der Bildung von Glucono-1,5-Lacton im Prozessmodell hat somit keine Auswirkungen auf die Reaktionsgeschwindigkeiten und dient hier nur der Vollständigkeit. Auch ist die Bildung von Glucono-1,5-Lacton weniger als die Bildung des Lactons sondern als Bildung von Gluconat zu betrachten.

8.5 Validierung des Prozessmodells zur zweistufigen Reduktion von Dehydrocholsäure

Mit der in Abschnitt 8.3 beschriebenen Bestimmung der enzymkinetischen Parameter aller an der Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA beteiligten Einzelenzyme, kann unter Verwendung der in den Abschnitten 8.4.1, 8.4.2 und 8.4.3 hergeleiteten Modelle ein Gesamtprozessmodell für die Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA erstellt werden. Lediglich die bei der Parameterbestimmung für beide HSDH erfolgten Modifikationen der Geschwindigkeitsgleichung wurden analog in der Gleichung 8.24 übernommen, die die Reaktionsgeschwindigkeit bei Vorliegen konkurrierender Gallensalze als Substrat für die HSDH beschreibt. Dieses Modell soll unabhängig zur Parameterbestimmung experimentell validiert werden.

8.5.1 Experimentelle Validierung

Die experimentelle Validierung sollte nicht auf Basis der jeweils bestimmten Einzelenzymmodelle, sondern für das zusammengefügte Prozessmodell erfolgen. Hierzu wurden Biotransformationsreaktionen durchgeführt, bei denen sämtliche drei Enzyme, beide Kofaktoren NAD und NADP, sowie beide Substrate DHCA und Glucose im Reaktionsansatz vorhanden waren. Für die Validierungsansätze wurden die Konzentrationen an 3α -HSDH, 7β -HSDH, NAD, NADP und DHCA variiert, während die Konzentrationen an GDH und Glucose konstant gehalten wurden. Die Kombination der variablen Einflussgrößen wurde in Form eines 2^{5-3} *Fractional Factorial* Designs ausgewählt und ist in Tabelle 8.4 angegeben. Von der GDH wurde bei allen

Tabelle 8.4: Versuchsplan der experimentellen Validierung des Prozessmodells für die Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA.

Ansatz	3α -HSDH AU L ⁻¹	7β -HSDH AU L ⁻¹	NAD, μ M	NADP, μ M	DHCA, mM
1	1,63	0,45	25	50	2,5
2	1,63	0,45	50	50	1,25
3	1,63	0,89	25	25	2,5
4	1,63	0,89	50	25	1,25
5	3,25	0,45	25	25	1,25
6	3,25	0,45	50	25	2,5
7	3,25	0,89	25	50	1,25
8	3,25	0,89	50	50	2,5

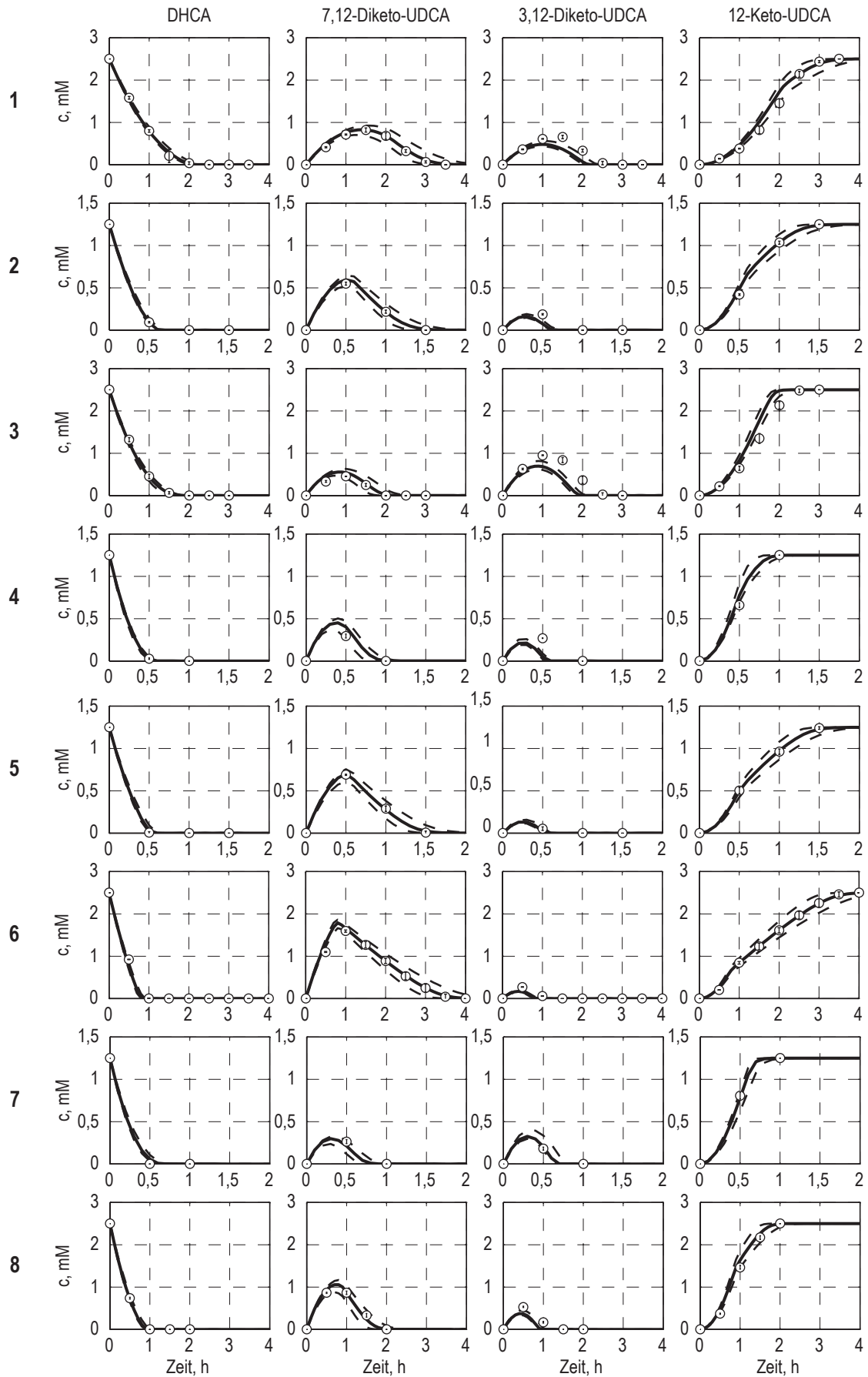


Abbildung 8.9: Experimentelle Validierung des mechanistischen Prozessmodells zur zweistufigen Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA. Jede Reihe bildet die Gallensalzverläufe eines Validierungsansatzes ab, wobei die Zahl links von den Diagrammen für die jeweilige Nummer des Ansatzes steht. Die Modellvorhersage der Gallensalzkonzentrationen sind mit durchgezogenen Linien dargestellt, während die 95 % Konfidenzintervalle gestrichelt abgebildet sind. Die weißen Kreise zeigen die experimentellen Gallensalzkonzentrationen. Die Reaktionen wurden im 2 mL-Maßstab in *Deep Well*-Platten bei 30 °C und pH 7,0 durchgeführt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in Abschnitt 4.7.1. Die Standardabweichung der Dreifachansätze sind dabei durch Fehlerindikatoren gekennzeichnet.

Ansätzen 4,21 mAU mL⁻¹ und von der Glucose 200 mM eingesetzt. Die genaue experimentelle Durchführung der Validierungsansätze ist in Abschnitt 4.7.1 beschrieben.

Die experimentellen Daten samt Standardabweichungen sind zusammen mit den Modellsimulationen und berechneten 95 % Konfidenzintervallen in Abbildung 8.9 gezeigt. Wie aus der Abbildung ersichtlich, stimmen Experiment und Vorhersage gut miteinander überein. Zwar werden bei einigen Ansätzen die Konzentrationen an 3,12-Diketo-UDCA tendenziell unterschätzt, jedoch befinden sich die Datenpunkte für DHCA, 7,12-Diketo-UDCA und 12-Keto-UDCA mit wenigen Ausnahmen innerhalb der berechneten Konfidenzintervalle.

8.5.2 Diskussion

Bei der experimentellen Validierung des mechanistischen Prozessmodells wurden im Vergleich zu den Experimenten zur Parameteridentifikation einige Modifikationen durchgeführt. Eine große Änderung war, dass sämtliche Enzyme, Kofaktoren und Substrate gleichzeitig im Reaktionsansatz vorhanden waren. Weiterhin wurde der Maßstab von 250 µL auf 2,0 mL vergrößert und die Reaktionen fanden in einem geschüttelten statt einem ruhenden System statt. Auch wurde anders als bei der Parameteridentifikation nicht die Veränderung der Kofaktorkonzentrationen photometrisch, sondern die Veränderung der Gallensalzkonzentrationen *via* HPLC gemessen.

All diese Veränderungen im Versuchsaufbau und der Analytik wurden bewusst vorgenommen, um systematische Fehler, die durch Ähnlichkeiten in der Versuchsdurchführung entstehen, weitestmöglich zu minimieren. Trotz eines völlig veränderten Versuchsaufbaus, konnten gute Übereinstimmungen zwischen experimentellen Daten und Modellvorhersagen festgestellt werden.

8.6 Analyse des Prozessmodells zur zweistufigen Reduktion von Dehydrocholsäure

Die Erstellung und Validierung eines Modells ist im Normalfall keine *ars gratia artis* sondern dient dem Zweck der Erkenntnisgewinnung. Mit diesem mechanistischen Modell ist es nun möglich, die zeitlichen Verläufe der Biotransformationen in Abhängigkeit von diversen Einflussgrößen zu analysieren.

In Abbildung 8.10 ist zu sehen, wie der Reaktionsverlauf von HSDH- bzw. Kofaktorkonzentrationen beeinflusst wird. Hierzu werden drei Szenarien untersucht: mit GDH als limitierendem Enzym ($0,5 \text{ AU L}^{-1}$ GDH, $5 - 15 \text{ AU L}^{-1}$ HSDH, Abbildung 8.10 A und B), mit den HSDH als limitierenden Enzymen (10 AU L^{-1} GDH, $0,15 - 0,75 \text{ AU L}^{-1}$ HSDH, Abbildung 8.10 C und D) sowie mit vergleichbaren Mengen an GDH und HSDH (2 AU L^{-1} GDH, $0,5 - 3,75 \text{ AU L}^{-1}$ HSDH, Abbildung 8.10 E und F). Hierbei wurde die Prozesszeit ermittelt, bei der $\geq 99 \%$ 12-Keto-UDCA-Anteil erreicht wird, sowie der Quotient der maximal akkumulierten Konzentrationen an 3,12-Diketo-UDCA und 7,12-Diketo-UDCA.

Im GDH-limitierten Szenario ist zu sehen, dass die HSDH-Aktivitäten keinen Einfluss auf Prozesszeit und Intermediatverhältnisse haben, während der Einfluss der Kofaktorkonzentrationen groß ist.

Im HSDH-limitierten Szenario üben hingegen die HSDH-Aktivitäten einen großen Einfluss auf den Reaktionsverlauf aus, während der Einfluss der Kofaktoren gering ist.

Im dritten Szenario mit ähnlichen Aktivitäten an HSDH und GDH beeinflussen sowohl HSDH-Aktivitäten als auch Kofaktorkonzentrationen die Biotransformation deutlich.

Die ersten beiden Szenarien zeigen, wie die jeweils limitierenden Faktoren der Reaktionen geschwindigkeitsbestimmend sind. Während im GDH-limitierten Fall die Geschwindigkeit der Kofaktorregenerierung von den Konzentrationen der beiden konkurrierenden Kofaktoren abhängt, ist im HSDH-limitierten Fall die Geschwindigkeit abhängig von den HSDH-Aktivitäten. Im dritten Szenario, bei vergleichbaren Aktivitäten aller drei Enzyme, sind sowohl HSDH-Reaktionen als auch die Kofaktorregenerierung limitierende Faktoren, wodurch sowohl

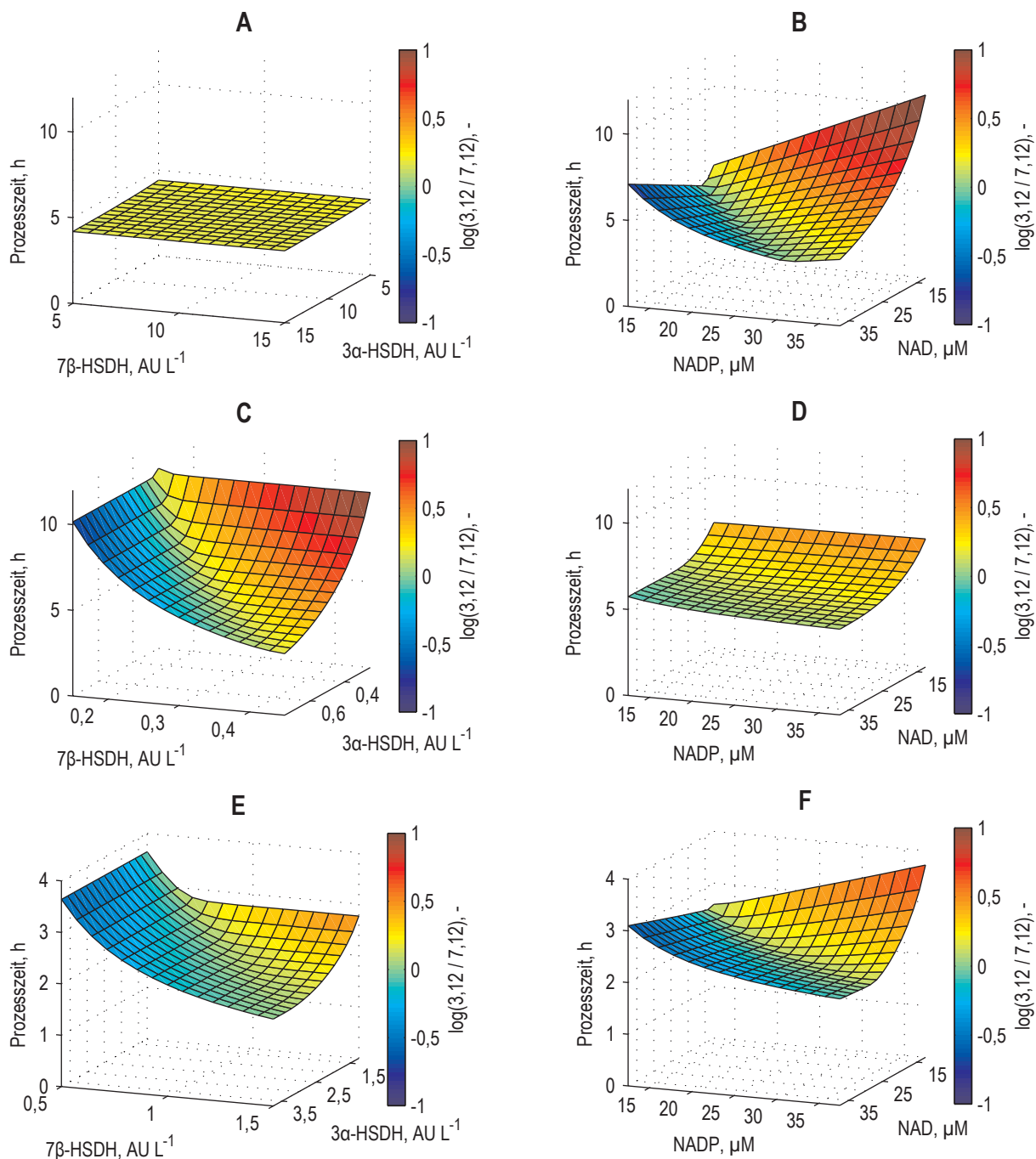


Abbildung 8.10: Einfluss von HSDH- bzw. Kofaktorkonzentrationen auf den Reaktionsverlauf. Die konstanten Konzentrationen sind **A:** 0,5 AU L⁻¹ GDH, 25 μ M NAD und NADP, **B:** 0,5 AU L⁻¹ GDH, 10 AU L⁻¹ 3α -HSDH und 10 AU L⁻¹ 7β -HSDH, **C:** 10 AU L⁻¹ GDH, 25 μ M NAD und NADP, **D:** 10 AU L⁻¹ GDH, 0,5 AU L⁻¹ 3α -HSDH und 0,3 AU L⁻¹ 7β -HSDH, **E:** 2 AU L⁻¹ GDH, 25 μ M NAD und NADP, **F:** 2 AU L⁻¹ GDH, 2,5 AU L⁻¹ 3α -HSDH und 1 AU L⁻¹ 7β -HSDH. Die vertikale Achse zeigt die Prozesszeit, bei der $\geq 99\%$ 12-Keto-UDCA-Anteil erreicht wird, der Logarithmus des Quotienten der maximal akkumulierten Konzentrationen an 3,12-Diketo-UDCA und 7,12-Diketo-UDCA ist farbcodiert dargestellt.

HSDH-Aktivität als auch Kofaktorkonzentrationen deutliche Einflüsse auf den Reaktionsverlauf haben.

Insgesamt betrachtet zeigt sich, dass die kürzesten Prozesszeiten erreicht werden, wenn während der Reaktion gleiche Mengen an 3,12-Diketo-UDCA und 7,12-Diketo-UDCA gebildet werden, was zuvor in dieser Arbeit bereits postuliert wurde und nun mit Hilfe dieses Modells gezeigt werden konnte. In Fällen, in denen HSDH-Aktivitäten einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeiten haben, ist zudem zu sehen, dass eine Erhöhung der HSDH-Aktivität immer mit einer Verkürzung der Prozesszeit einhergeht. In Fällen, in denen die Kofaktorregenerierung einen maßgeblichen Einfluss auf die Reaktion hat, ist es hingegen anders. Hier hat die gleichzeitige Erhöhung der Konzentrationen beider Kofaktoren nur einen geringen Einfluss auf die Prozesszeit. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Hogan & Woodley (2000) berichtet, die bei der Modellierung eines Enzymsystems mit einem einzigen Kofaktor feststellten, dass oberhalb eines bestimmten Wertes die absolute Kofaktorkonzentration nur noch wenig Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat. Viel wichtiger als die absoluten Konzentrationen sind hierbei die Verhältnisse der Kofaktorkonzentrationen zueinander. Am Beispiel in Abbildung 8.10 B ist zu sehen, dass die Prozesszeit bei 37,5 μM NADP und 12,5 μM NAD etwa 10,6 h beträgt, wird die NADP-Konzentration hingegen auf 12,5 μM verringert, so verkürzt sich die Prozesszeit auf etwa 5,4 h. Dieses scheinbar paradoxe Ergebnis erklärt sich aus der Tatsache, dass beide Kofaktoren um das Enzym GDH konkurrieren und sich somit kompetitiv inhibieren. So führt im genannten Beispiel eine Erhöhung der NADP-Konzentration zu einer Verlangsamung der NADH-Regeneration und somit zu einer Verlangsamung der ohnehin limitierenden 3 α -HSDH-Reaktion, was in der verlängerten Prozesszeit resultiert. Dass eine gleichzeitige Erhöhung beider Kofaktorkonzentrationen nur wenig Einfluss auf die Prozesszeit hat, zeigt sich besonders deutlich am Beispiel in Abbildung 8.10 F. Für dieses Phänomen ist zum einen die oben diskutierte Inhibition verantwortlich, gleichzeitig betrifft eine Erhöhung der Kofaktorkonzentration beide Oxidationszustände des Kofaktors, wodurch auch eine Verstärkung der Produktinhibition verursacht wird.

In Abbildung 8.11 wird zudem betrachtet, wie die Reaktionsverläufe sich verändern, wenn die DHCA-Konzentration und gleichzeitig die Konzentrationen sämtlicher Enzyme gleichmäßig erhöht werden. Dies ist besonders für einen Ganzzellprozess von Interesse, da

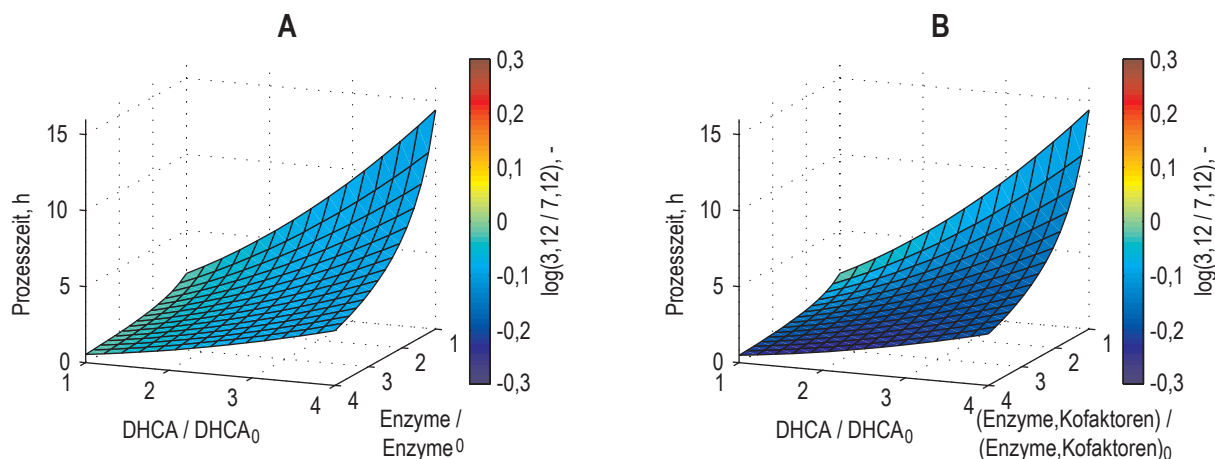


Abbildung 8.11: Einfluss von DHCA-Konzentrationen und Enzymaktivitäten auf den Reaktionsverlauf. In **A** ist die anfängliche Substratkonzentration von 2,5 mM sowie die Enzymaktivitäten (2 AU L^{-1} GDH, $2,5 \text{ AU L}^{-1}$ 3α -HSDH und 1 AU L^{-1} 7β -HSDH) um jeweils bis zu Faktor 4 erhöht, während die Kofaktorkonzentrationen konstant jeweils $25 \mu\text{M}$ betragen, in **B** wurden die Kofaktorkonzentrationen zusammen mit den Enzymaktivitäten erhöht.

hierbei das Verhältnis der drei Enzyme nicht variiert werden kann. In Abbildung 8.11 A wurde die anfängliche Konzentration von 2,5 mM DHCA um bis zu Faktor 4 erhöht, die Enzymaktivitäten (2 AU L^{-1} GDH, $2,5 \text{ AU L}^{-1}$ 3α -HSDH und 1 AU L^{-1} 7β -HSDH) wurden ebenfalls bis zu Faktor 4 erhöht, während die Kofaktorkonzentrationen bei jeweils $25 \mu\text{M}$ konstant gehalten wurden. Abbildung 8.11 B hingegen zeigt das gleiche Szenario, mit dem Unterschied, dass hier die Kofaktorkonzentrationen zusammen mit den Enzymaktivitäten erhöht wurden.

Werden die Kofaktorkonzentrationen konstant gehalten, so zeigt sich, dass die Enzymaktivitäten reziprok proportional zur Prozesszeit sind, bei einer Vervielfachung der Enzymaktivitäten verringert sich die Prozesszeit ebenfalls um Faktor 4. Die Korrelation von DHCA-Konzentration und Prozesszeit ist hingegen nicht direkt proportional. Hier führt eine Vervielfachung der Substratkonzentration zu einer Verlängerung der Prozesszeit um Faktor 7. Werden Substratkonzentrationen und Enzymaktivitäten gleichmäßig erhöht, verlängert sich die Prozesszeit. Bei einer Vervielfachung sowohl der Substratkonzentrationen als auch Enzymaktivitäten, verlängert sich die Prozesszeit um Faktor 1,7. Diese übermäßige Verlängerung der Prozessgeschwindigkeit mit Erhöhung der DHCA-Konzentration wurde experimentell bereits in Abschnitt 7.3.3 gezeigt und kann durch das Modell ebenfalls bestätigt werden. Die Ursache dürfte in der Substratinhibition der beiden HSDH zu finden sein.

Wenn zusätzlich zu den Enzymaktivitäten auch die Kofaktorkonzentrationen erhöht werden, so ergibt sich ein ähnliches Bild. Dies ist konsistent mit der zuvor getroffenen Aussage, dass

in diesen Konzentrationen eine Erhöhung der absoluten Kofaktorkonzentrationen nur einen geringen Einfluss auf den Reaktionsverlauf hat. Deutlicher ist der Unterschied, wenn die Bildung der Intermediate betrachtet wird. Beträgt der Quotient von 3,12-Diketo-UDCA und 7,12-Diketo-UDCA im ersten Fall 0,82 - 0,95, so vergrößert sich dieser Bereich durch die Erhöhung von Kofaktorkonzentrationen auf 0,58 - 0,95. Dies zeigt, dass die optimalen Anteile beider Kofaktoren nicht allein durch deren relativen Verhältnisse definiert werden kann, sondern eine Funktion derer absoluten Konzentration ist.

8.7 Diskussion

In diesem Kapitel erfolgte eine Modellierung der multienzymatischen Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA. Anders als im Kapitel zuvor wurde hierfür ein mechanistischer Ansatz gewählt, welcher eine dynamische Modellierung der Biokatalysereaktion erlaubt. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass hiermit eine große Zahl an Einflussvariablen und Antwortgrößen analysiert und somit mehr Erkenntnisgewinn erzielt werden kann als mit einem statischen empirischen Modell.

Das Augenmerk dieser Modellierung lag allein auf der enzymatischen Reaktion, weshalb mit isolierten und aufgereinigten Enzymen gearbeitet wurde. Eine mechanistische Modellierung bedeutet, dass die den Enzymen zugrunde liegenden Mechanismen bekannt sein müssen, weswegen diese für zwei der modellierten Enzyme zunächst aufgeklärt werden mussten. Da für die ermittelten Mechanismen keine Geschwindigkeitsgleichungen in der Literatur beschrieben sind, mussten diese hergeleitet werden. Eine Besonderheit des untersuchten Reaktionssystems ist, dass für alle drei Enzyme zwei konkurrierende Substrate vorliegen, die sich gegenseitig kompetitiv inhibieren, wodurch weitere Gleichungen aufgestellt werden mussten, die einen solchen Fall beschreiben.

Die Idee der Modellierung war, die enzymkinetischen Parameter für jedes Enzym einzeln zu bestimmen und anschließend aus den einzelnen Geschwindigkeitsgleichungen durch Kopplung der Stoffbilanzen ein Gesamtprozessmodell zu erstellen. Diese modulare Vorgehensweise hat zum einen den Vorteil, dass nur jeweils ein Teil der Parameter gleichzeitig bestimmt werden muss, was in einer besseren Bestimmbarkeit der einzelnen Parameter resultiert, zum anderen

ließen sich dadurch theoretisch einzelne Enzyme im Modell hinzufügen oder entfernen. So kann zum Beispiel durch Kombination einer einzigen HSDH mit der GDH ohne weitere Anpassung ein Teilmodell der Reaktion erstellt werden, auch wäre ein Austausch eines Enzyms, beispielsweise der GDH gegen eine FDH einfach zu realisieren (Braun *et al.*, 2011).

Während für die Parameterbestimmung die Reaktionen der Einzelenzyme photometrisch durch Erfassen der Kofaktorkonzentrationen gemessen wurden, erfolgte die Validierung des Modells in gekoppelten Biotransformationsansätzen, bei denen die Verläufe der Gallensalze per HPLC gemessen wurden. Die Wahl zweier grundsätzlich verschiedenen Versuchsaufbauten und Analytikmethoden verringert das Risiko methodenbedingter systematischer Fehler. Dennoch zeigten die Validierungsergebnisse, dass die experimentellen Daten weitestgehend innerhalb der ermittelten Konfidenzintervalle liegen und dass das Modell die Reaktionsverläufe ohne weitere Modifikation sowohl qualitativ als auch quantitativ vorhersagen kann.

Aufgrund des bereits besprochenen Augenmerks dieser Modellierung, unterliegt das Modell hinsichtlich der Übertragbarkeit auf das Ganzzellsystem einigen Limitationen. Zunächst musste aufgrund der Methodik bei niedrigen Gallensalzkonzentrationen gearbeitet werden, bei der diese noch löslich sind. Da die zuvor beschriebenen Ganzzellbiotransformationen mit wesentlich höheren Substratkonzentrationen durchgeführt werden, müsste für eine Adaptierung an das Ganzzellsystem das Modell um eine Löslichkeitskinetik der Gallensalze erweitert werden. Auch muss untersucht werden, ob aufgrund des Vorliegens einer – wenn auch beschädigten – Zellmembran das Modell um eine Stofftransportbarriere erweitert werden muss. Sollte dies der Fall sein, müsste auch geklärt werden, wie das Verhältnis der DHCA-Moleküle, die beide Reduktionsschritte in einer Zelle unterlaufen, zu denen ist, die sequenziell von zwei Zellen umgesetzt werden.

Trotz dieser Limitationen ist es möglich, auch für die Ganzzellbiotransformation wichtige Erkenntnisse aus dem Modell zu ziehen. So konnte gezeigt werden, dass bei Kofaktorkonzentrationen von 12,5 – 37,5 μM die Gesamtkonzentration der beiden Kofaktoren keinen wesentlichen Einfluss auf die Biotransformation hat, während hingegen deren relativen Verhältnisse entscheidend sind. So kann bei stark unbalancierten Reaktionen, welche durch eine unterschiedlich starke Akkumulation der beiden Intermediate gekennzeichnet sind, die Verringerung der Konzentration des einen Kofaktors annähernd den gleichen positiven Effekt auf die Prozesszeit haben,

wie die Erhöhung der Konzentration des anderen Kofaktors. Insgesamt konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Prozesszeiten am kürzesten sind, wenn die Bildung der Intermediate gleichmäßig erfolgt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine mechanistische Modellierung auch bei Multienzymreaktionen mit einem komplexen Reaktionsnetzwerk akkurat durchgeführt werden kann. Durch deren modularen Ansatz ließe sich die Methodik auch auf andere Enzymsysteme übertragen, und einmal kinetisch bestimmte Enzyme müssten für den Einsatz in einem anderen Enzymsystem nicht erneut modelliert werden. Somit wäre es zumindest denkbar, dass durch Modellierung immer weiterer Enzyme ein Modellbaukasten erstellt werden kann, mit dem Enzyme für ein Reaktionssystem zunächst *in silico* miteinander kombiniert werden können, bevor diese experimentell miteinander eingesetzt werden.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Das Gallensalz Ursodesoxycholsäure ist ein wichtiges Pharmazeutikum für die Behandlung einer Vielzahl von Leber- und Gallenerkrankungen, welches bislang in einem siebenstufigen chemischen Prozess hergestellt wird. Aufgrund seiner komplizierten Stereochemie sollte der Syntheseprozess durch Integration enzymatischer Schritte effizienter gestaltet werden. In dieser Arbeit sollte die zweistufige Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA untersucht werden, welche die enzymatischen Schritte eines alternativen chemo-enzymatischen, vierstufigen Synthesewegs darstellen.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines auf rekombinanten *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren basierten Satzverfahrens, bei denen beide Reduktionsschritte in einem Prozessschritt durchgeführt werden. Hierbei müssen die benötigten Enzyme, 3 α -HSDH und 7 β -HSDH, zusammen mit einem Kofaktorregenerierungsenzym innerhalb einer oder zweier *E. coli*-Zellen koexprimiert werden. Das Satzverfahren soll dabei schnell, effizient, robust und auf industrielle Maßstäbe skalierbar sein. Das Schema der enzymatischen Reaktion ist in Abbildung 9.1 gezeigt.

Als erster Ansatz hin zu diesem Prozess wurde die Kofaktorspezifität der 7 β -HSDH von NADPH zu NADH geändert, um durch Angleichung der Kofaktorspezifität an die 3 α -HSDH eine einfachere Kofaktorregenerierung zu ermöglichen. Dabei wurde zunächst die kofaktordeterminierende Position G39 identifiziert und durch ortsgerichtete Mutagenese zu Aspartat verändert, so dass bereits eine Mutante erhalten wurde, die NADH gegenüber NADPH bevorzugt. Durch Identifikation weiterer wichtiger Positionen und gerichteter Evolution wurde die Mutante G39D R40F R41K erzeugt, die bei prozessrelevanten DHCA-Konzentrationen von 10 mM und 0,5 mM NADH knapp 50 % der Aktivität des Wildtyps mit NADPH aufweist. Im Gegensatz zum Wildtypenzym weist die Mutante keine Substratinhibition auf, so dass sich

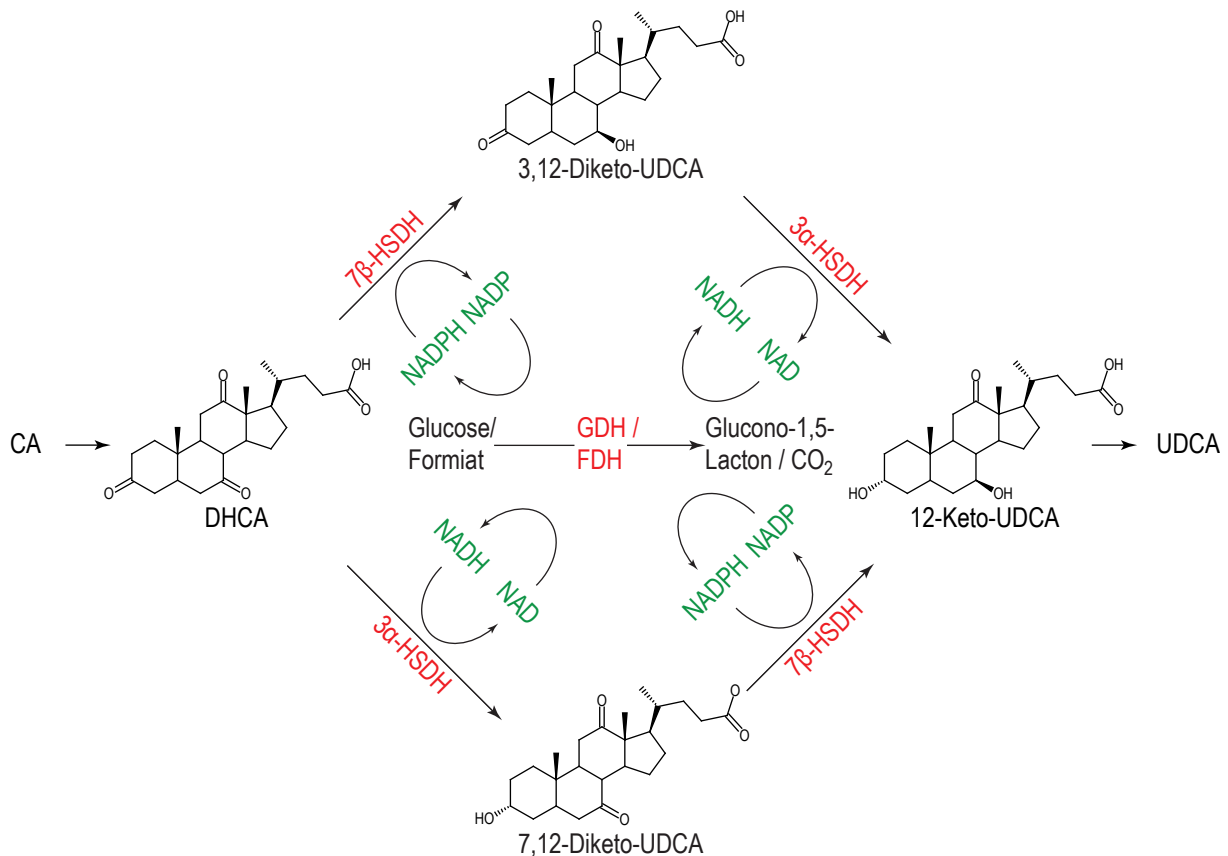


Abbildung 9.1: Schema der zweistufigen Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA unter Beteiligung eines bispezifischen Kofaktorregenerationsenzym.

der Aktivitätsvorsprung des Wildtyp-Enzyms bei noch höheren DHCA-Konzentrationen weiter verringert.

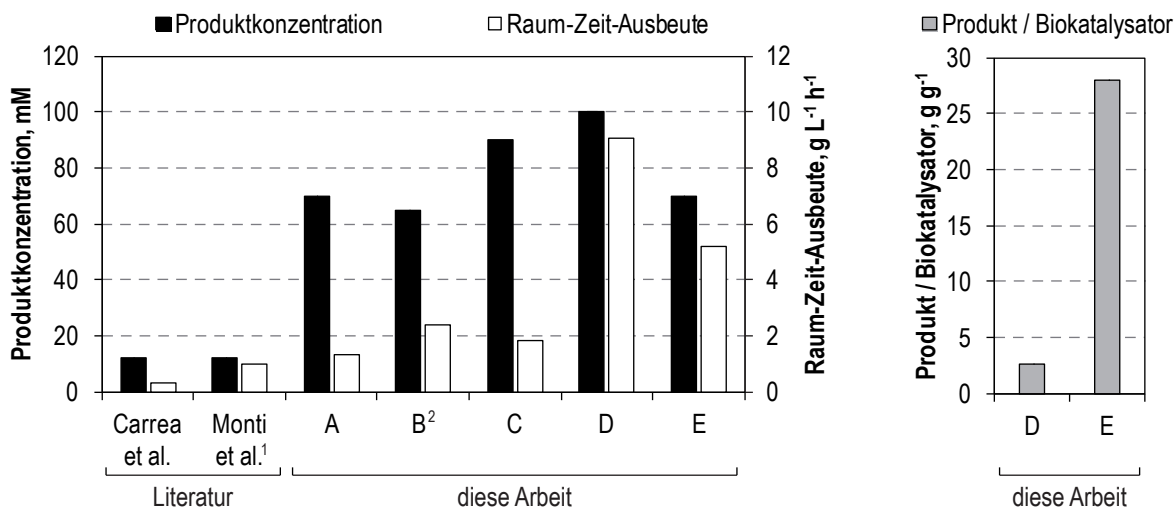
Für die Ganzzellbiokatalyse im Satzverfahren wurden vier Biokatalysestrategien entwickelt: (1) Verwendung eines *E. coli*-Ein-Zell-Systems mit 3α-HSDH, NADPH-abhängiger 7β-HSDH, bispezifischer FDH. (2) Verwendung eines *E. coli*-Ein-Zell-Systems mit 3α-HSDH, NADH-abhängiger 7β-HSDH, NAD-abhängiger FDH mit höherer Enzymaktivität. (3) Verwendung eines *E. coli*-Zwei-Zell-Systems, bei dem ein Biokatalysator eine 3α-HSDH und eine NADH-abhängige FDH exprimiert, der andere Biokatalysator eine NADPH-abhängige 7β-HSDH und eine bispezifische FDH. (4) Verwendung eines *E. coli*-Ein-Zell-Systems mit 3α-HSDH, NADPH-spezifischer 7β-HSDH und bispezifischer GDH.

Für jede der definierten Strategien wurde eine gesonderte Stammentwicklung durchgeführt, und diese Strategien wurden nach einer ersten Optimierung im Litermaßstab bei einer Biokatalysatorkonzentration von 15 g L⁻¹ miteinander verglichen. Mit dem *E. coli*-Ein-Zell-System

mit bispezifischer FDH konnte ein quasi vollständiger Umsatz von 70 mM DHCA zu 12-Keto-UDCA innerhalb von 21 h im Satzverfahren erzielt werden. Beim *E. coli*-Ein-Zell-System mit NADH-abhängiger 7 β -HSDH wurde zunächst die G39D-Einfachmutante verwendet. Zwar konnte im Litermaßstab kein vollständiger Umsatz von 100 mM DHCA im Satzverfahren erreicht werden, allerdings betrug die 12-Keto-UDCA-Konzentration nach 11 h bereits 65 mM. Mit dem *E. coli*-Zwei-Zell-System wurden innerhalb von 20 h 90 mM DHCA im Satzverfahren vollständig zu 12-Keto-UDCA umgesetzt, womit die Ergebnisse des *E. coli*-Ein-Zell-Systems mit bispezifischer FDH übertroffen werden konnten. Hierbei scheint der Vorteil der höheren Gesamtenzymaktivitäten den Nachteil einer zusätzlichen Membranbarriere bei der Biokatalyse zu überwiegen. Das *E. coli*-Zwei-Zell-System bietet zudem den Vorteil, dass die Biokatalysatoren in unterschiedlichen Anteilen eingesetzt werden können und somit eine Feinsteuerung der beiden HSDH-Aktivitäten im Satzverfahren ermöglichen. Nachteil ist jedoch, dass hierfür zwei getrennte Herstellungsprozesse für beide Biokatalysatoren erfolgen müssen. Das *E. coli*-Ein-Zell-System mit GDH erzielte mit der vollständigen Umsetzung von 100 mM DHCA zu 12-Keto-UDCA innerhalb von 4,5 h im Satzverfahren die besten Ergebnisse, wobei die hohe Enzymaktivität der bispezifischen GDH ausschlaggebend war, weshalb die Festlegung auf diesen Ansatz erfolgte. Ein Vergleich der Ganzzellansätze ist in Abbildung 9.2 gezeigt.

Zur Weiterentwicklung des Ansatzes mit dem *E. coli*-Ein-Zell-System mit GDH wurden zunächst zwei *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren hergestellt, die unterschiedliche Antibiotikaresistenzen vorweisen, ansonsten in ihren Eigenschaften jedoch identisch sind, so dass die Auswahl des Stammes entsprechend der Vorgaben des Herstellers erfolgen kann. Die Herstellung der rekombinanten *E. coli*-Zellen konnte bis in den 50 L-Maßstab im Hochzelldichteverfahren etabliert werden. Hierbei wurden 68 g_{BTM} L⁻¹ erreicht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Lagerung der rekombinanten *E. coli* bei -20 °C über 100 Tage zu keinem signifikanten Aktivitätsverlust führt und auch bis zu zehn Frost-Tau-Zyklen deren Aktivität nicht beeinträchtigen.

Bei der Optimierung des Ganzzellbiokatalyseprozesses stellte sich die geringe Löslichkeit des Produkts 12-Keto-UDCA als problematisch heraus, weswegen die eingesetzte Substratkonzentration auf 70 mM verringert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass Zellkonzentration und die Konzentrationen der beiden Kofaktoren NAD und NADP die maßgeblichen Einflussfaktoren auf den Biokatalyseprozess im Satzverfahren darstellen, und in einem empirischen Modell



¹mit CA als Substrat ²keine vollständige Umwandlung zu 12-Keto-UDCA

Abbildung 9.2: Vergleich der Ansätze dieser Arbeit und Ansätze aus der Literatur. Gezeigt sind **A:** *E. coli*-Ein-Zell-System mit bispezifischer FDH, **B:** *E. coli*-Ein-Zell-System mit NADH-abhängiger 7β -HSDH und NAD-spezifischer FDH, **C:** *E. coli*-Zwei-Zell-System mit zwei verschiedenen FDH, **D:** *E. coli*-Ein-Zell-System mit bispezifischer GDH, **E:** optimierter Ansatz mit dem *E. coli*-Ein-Zell-System mit bispezifischer GDH unter Zugabe von Kofaktoren und verringerter Biokatalysatormenge. Gezeigt sind finale Produktkonzentrationen, Raum-Zeit-Ausbeuten und die Verhältnisse Masse gebildeten Produkts / Masse Biokatalysator. Die Reaktionen der Ansätze A-D wurden bei 25 °C und pH 6,5 durchgeführt, während die Reaktion des Ansatzes E bei 30 °C und pH 7,0 durchgeführt wurde. Alle Reaktionen fanden im 1 L-Maßstab in einem Satzverfahren mit pH-Regelung statt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.3, 6.1.5, 6.3.4, 6.4.3 und 7.1.2.

konnten die jeweiligen Einflüsse beschrieben werden. Die Biokatalysatorkonzentration korreliert hierbei positiv mit den Geschwindigkeiten beider HSDH, die NAD-Konzentration positiv mit der Geschwindigkeit der 3α -HSDH und negativ mit der Geschwindigkeit der 7β -HSDH, während die NADP-Konzentration positiv mit der Geschwindigkeit der 7β -HSDH korreliert. Mit Hilfe des empirischen Modells konnten Reaktionsbedingungen identifiziert werden, bei denen nach 8 h Biotransformation ein vollständiger Umsatz erzielt werden kann. Durch Kombination mit einer Kostenfunktion konnte weiterhin gezeigt werden, wie sich das Modell für die Prozessoptimierung nutzen lässt. Eine wichtige Erkenntnis war, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden HSDH selektiv durch die Anteile der Kofaktoren steuern lassen. Der Ganzzellbiokatalysatoren oftmals inhärente Nachteil, dass sich Enzymaktivitäten untereinander nur schwer feinjustieren lassen, kann mit diesen beiden „Stellschrauben“ wieder ausgeglichen werden. Deswegen wurde bei dem *E. coli*-Ein-Zell-System mit GDH auch auf die Verwendung einer NADH-abhängigen 7β -HSDH verzichtet, da man sich dadurch dieser einfachen Prozesskontrolle, dem Verhältnis von NAD und NADP, berauben würde. Insgesamt konnten

nach der Optimierung im Litermaßstab 70 mM DHCA innerhalb von 5,5 h vollständig zu 12-Keto-UDCA im einfachen Satzverfahren umgesetzt werden, wobei die Biokatalysatorkonzentration um den Faktor 15 auf 1 g L^{-1} verringert werden konnte.

Zum besseren Verständnis des Reaktionssystems erfolgte zudem eine mechanistische Modellierung des Enzymsystems. Hierbei wurden zunächst die Enzymmechanismen der beiden HSDH experimentell aufgeklärt. Da keine Geschwindigkeitsgleichungen für die ermittelten Mechanismen in der Literatur vorhanden waren, wurden diese mittels King-Altman-Verfahren hergeleitet. Da in dem komplexen Reaktionsnetzwerk jedes Enzym zudem über zwei konkurrierende Substrate verfügt, die sich gegenseitig kompetitiv inhibieren, mussten weitere Geschwindigkeitsgleichungen mittels King-Altman-Verfahren hergeleitet werden, die dieses Phänomen beschreiben. Die Identifikation enzymkinetischer Parameter erfolgte anschließend für jedes Enzym einzeln mittels Verlaufskurvenanalyse. Dabei wurden nicht-identifizierbare Parameter ermittelt und durch Anpassung der Geschwindigkeitsgleichung aus dem Modell eliminiert, so dass Sätze eindeutig identifizierbarer Parameter übrig blieben. Das Prozessmodell wurde durch Kopplung der Stoffbilanzen der Einzelenzymmodelle erzeugt. Eine experimentelle Validierung des Prozessmodells unter zur Parameteridentifikation vollständig veränderten Reaktions-, Konzentrations-, Maßstabs- und Analytikbedingungen zeigte hohe Prädiktionseigenschaften: Der Großteil der experimentellen Messdaten liegt innerhalb der zuvor berechneten Konfidenzintervalle. Das Modell ist somit ohne Modifikation allgemein anwendbar.

Eine Analyse des Modells führte zu neuen Erkenntnissen hinsichtlich der weiteren Optimierung der enzymatischen Umsetzung. Auch konnte die zuvor postulierte Hypothese bestätigt werden, dass eine gleichmäßige Akkumulation der beiden Intermediate 3,12-Diketo-UDCA und 7,12-Diketo-UDCA während der Umsetzung anzustreben ist. Eine wichtige Erkenntnis war, dass im Bereich von Kofaktorkonzentrationen von $12,5 \mu\text{M}$ – $37,5 \mu\text{M}$ die absoluten Konzentrationen der beiden Kofaktoren nur geringen Einfluss auf die Dauer der Biotransformation haben, während das Verhältnis der beiden Kofaktoren untereinander ausschlaggebend ist. So kann bei einer unbalancierten Reaktion die Verringerung der Konzentration des einen Kofaktors zu einer ähnlichen Verkürzung der Prozesszeit führen, wie die Erhöhung der Konzentration des anderen Kofaktors.

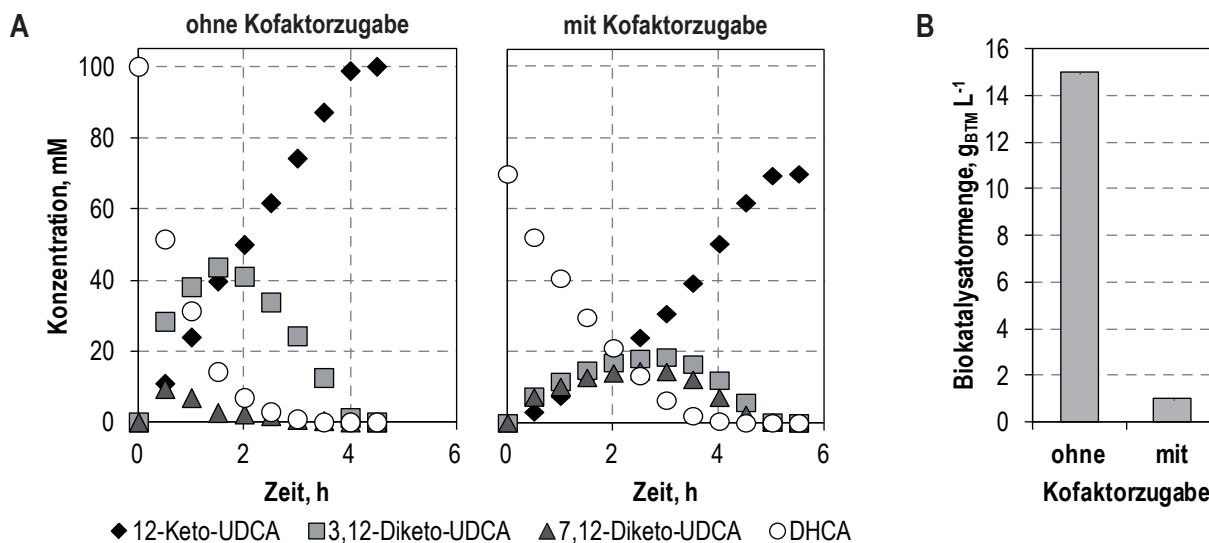


Abbildung 9.3: **A:** Reaktionsverläufe der Ansätze mit dem *E. coli*-Ganzzellbiokatalysator mit bispezifischer GDH zur Kofaktorregenerierung. Gezeigt ist die Reaktion ohne Kofaktorzugabe und die optimierte Reaktion mit Kofaktorzugabe bei verringerter Biokatalysatormenge. **B:** Gegenüberstellung der eingesetzten Biokatalysatormengen beider Ansätze. Die Reaktion ohne Kofaktorzugabe wurde bei 25 °C und pH 6,5 durchgeführt, während die Reaktion des Ansatzes mit Kofaktorzugabe bei 30 °C und pH 7,0 durchgeführt wurde. Beide Reaktionen fanden im 1 L-Maßstab in einem Satzverfahren mit pH-Regelung statt. Weitere Angaben zu Reaktionsbedingungen und Versuchsdurchführung finden sich in den Abschnitten 4.7.3, 6.4.3 und 7.1.2.

Zusammengefasst ließen sich ohne Kofaktorzusatz 100 mM DHCA mit $15 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$ *E. coli*-Ganzzellbiokatalysator innerhalb von 4,5 h vollständig zu 12-Keto-UDCA umsetzen. Bei Zugabe von Kofaktoren (NAD und NADP), wurden mit $1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$ Biokatalysator 70 mM DHCA innerhalb von 5,5 h vollständig zu 12-Keto-UDCA umgesetzt. Die Reaktionsverläufe sind in Abbildung 9.3 gezeigt.

Im Vergleich zur Literatur konnten hierbei die Produktkonzentration um bis zu Faktor 8 und die Raum-Zeit-Ausbeute der zweistufigen Reduktion von DHCA um bis zu Faktor 27 erhöht werden (Carrea *et al.* 1992; Monti *et al.* 2009, vgl. Abbildung 9.2). Die isolierte Ausbeute von $\geq 95 \%$ ergibt in Kombination mit der Ausbeute der chemischen Oxidation von CA zu DHCA von $\geq 90 \%$ (Liu *et al.*, 2012) eine Gesamtausbeute von 86 %, was deutlich höher ist als die von Monti *et al.* (2009) berichteten 73 % bei der direkten enzymatischen Umsetzung von CA zu 12-Keto-UDCA. Wird zusätzlich die Ausbeute der anschließenden Wolf-Kishner-Reduktion von 60 – 80 % mit eingerechnet, läge die Gesamtausbeute von CA zu UDCA im Bereich $\geq 51 - 68 \%$, und damit rund doppelt so hoch wie die des chemischen Syntheseprozesses (Carrea *et al.*, 1992).

Die Frage, ob das entwickelte Verfahren wirtschaftlich ist, lässt sich mangels valider Zahlen lediglich anhand von Kennzahlen aus der Literatur erörtern. Die erzielten Produktkonzentrationen von 40 bzw. 28 g L⁻¹ (entspricht 100 bzw. 70 mM 12-Keto-UDCA) und Raum-Zeit-Ausbeuten von 9,0 bzw. 5,2 g L⁻¹ h⁻¹, liegen deutlich über den von Wenda *et al.* (2011) genannten Mindestwerten für Feinchemikalien von 1 g L⁻¹ bzw. 0,1 g L⁻¹ h⁻¹, die für einen wirtschaftlichen Prozess als notwendig erachtet werden. Das Verhältnis Masse gebildeten Produkts / Masse Biokatalysator liegt im Falle der Zugabe von Kofaktoren bei 28, was über dem von Pollard & Woodley (2007) genannten Mindestwert von 15 und innerhalb des von Tufvesson *et al.* (2011) genannten Bereichs von 10 – 35 liegt, der für einen wirtschaftlichen Prozess erreicht werden muss (vgl. Abbildung 9.2). Die Kennzahlen deuten also darauf hin, dass der Prozess wirtschaftlich sein könnte.

Ansätze für weitere Prozessverbesserungen sind im Folgenden dargestellt: Für zwei der drei beteiligten Enzyme wurden bisher Wildtyp-Enzyme eingesetzt, die sich hinsichtlich ihrer Stabilität und Aktivität durch Protein-Engineering noch weiter optimieren ließen. Speziell die starke Substratinhibition der 3 α -HSDH könnte ein lohnenswerter Angriffspunkt sein. Mit optimierten Enzymen wäre anschließend eine neue Stammentwicklung und Prozessoptimierung nötig, bei der gegebenenfalls die Biokatalysatormenge weiter verringert werden könnte.

Auch könnte das Expressionssystem des Ganzzellbiokatalysators noch variiert werden. Speziell böte eine Integration der Expressionskassette ins bakterielle Genom eine höhere genetische Stabilität und die Möglichkeit einer antibiotikafreien Zellherstellung (Striedner *et al.*, 2010).

Auch das mechanistische Prozessmodell könnte sich noch um die Löslichkeitskinetik der Gallensalze und die Retention durch die Zellmembran erweitern lassen, so dass eine vollständige *in silico* Optimierung der Ganzzellbiokatalyse erfolgen könnte.

Literaturverzeichnis

- Abalain, J. H., Di Stefano, S., Amet, Y., Quemener, E., Abalain-Colloc, M. L., Floch, H. H. Cloning, DNA sequencing and expression of (3–7) β hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 44(2):133–139, 1993.
- Adams, M. W. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100 degrees C. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47:627–58, 1993.
- Aehle, W., editor. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, 3. edition, 2007.
- Albalak, A., Zeidel, M. L., Zucker, S. D., Jackson, A. A., Donovan, J. M. Effects of submicellar bile salt concentrations on biological membrane permeability to low molecular weight non-ionic solutes. *Biochemistry*, 35(24):7936–45, 1996.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3):403–10, 1990.
- Bardow, A., Marquardt, W. Incremental and simultaneous identification of reaction kinetics: methods and comparison. *Chem. Eng. Sci.*, 59(13):2673–2684, 2004.
- Batta, A. K., Salen, G., Shefer, S. Transformation of bile acids into iso-bile acids by *Clostridium perfringens*: Possible transport of 3 β -hydrogen via the coenzyme. *Hepatology*, 5(6):1126–1131, 1985.
- Batta, A. K., Aggarwal, S. K., Salen, G., Shefer, S. Selective reduction of oxo bile acids: synthesis of 3 beta-, 7 beta-, and 12 beta-hydroxy bile acids. *J. Lipid Res.*, 32(6):977–983, 1991.
- Begley, M., Gahan, C. G. M., Hill, C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29(4):625–51, 2005.
- Behrens, G. A., Hummel, A., Padhi, S. K., Schätzle, S., Bornscheuer, U. T. Discovery and Protein Engineering of Biocatalysts for Organic Synthesis. *Adv. Synth. Catal.*, 353(13):2191–2215, 2011.
- Bellamacina, C. R. The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J.*, 10(11):1257–69, 1996.
- Bennett, M. J., McKnight, S. L., Coleman, J. P. Cloning and characterization of the NAD-dependent 7 α -Hydroxysteroid dehydrogenase from *Bacteroides fragilis*. *Curr. Microbiol.*, 47(6):475–84, 2003.
- Berman, H. M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, 28(1):235–242, 2000.

- Bertau, M. Novel Developments in Biocatalytic Organic Chemistry. *Curr. Org. Chem.*, 6(11): 987–1014, 2002.
- Beuers, U., Spengler, U., Kruis, W., Aydemir, U., Wiebecke, B., Heldwein, W., Weinzierl, M., Pape, G. R., Sauerbruch, T., Paumgartner, G. Ursodeoxycholic acid for treatment of primary sclerosing cholangitis: a placebo-controlled trial. *Hepatology*, 16(3):707–14, 1992.
- Bhaduri, S., Mathur, P., Payra, P., Sharma, K. Coupling of Catalyses by Carbonyl Clusters and Dehydrogenases: Reduction of Pyruvate to l-Lactate by Dihydrogen. *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (46):12127–12128, 1998.
- Bhaumik, S. R., Sonawat, H. M. Kinetic mechanism of glucose dehydrogenase from *Halobacterium salinarum*. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 36(3):143–9, 1999.
- Bisswanger, H. *Enzyme Kinetics - Principles and Methods*. Wiley-VCH, Weinheim, 1. edition, 2008.
- Blaser, H.-U., Schmidt, E., editors. *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions*. Wiley-VCH, Weinheim, 1. edition, 2004.
- Blattner, F. R. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331): 1453–1462, 1997.
- Blundell, T. L., Sibanda, B. L., Sternberg, J. E., Thornton, J. M. Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature*, 326(26):347–352, 1987.
- Bommarius, A. S., Riebel-Bommarius, B. R. *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, 1. edition, 2004.
- Bommarius, A. S., Schwarm, M., Drauz, K. Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals - examples and perspectives. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 5(1-4):1–11, 1998.
- Bornscheuer, U. T., Pohl, M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5(2):137–143, 2001.
- Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., Robins, K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 485(7397):185–94, 2012.
- Bortolini, O., Medici, A., Poli, S. Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. *Steroids*, 62:564–577, 1997.
- Böttcher, D., Bornscheuer, U. T. Protein engineering of microbial enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 13:1–9, 2010.
- Bovara, R., Carrea, G., Riva, S., Secundo, F. A new enzymatic route to the synthesis of 12-ketoursodeoxycholic acid. *Biotechnol. Lett.*, 18(3):305–308, 1996.
- Box, G. E. P., Wilson, K. B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 13(1):1 – 45, 1951.
- Bradley, P., Misura, K. M. S., Baker, D. Toward high-resolution de novo structure prediction for small proteins. *Science*, 309(5742):1868–71, 2005.

- Braun, M. *Biokatalytische Herstellung von Cholsäurederivaten mit Hydroxysteroiddehydrogenasen*. PhD thesis, Technische Universität München, 2011.
- Braun, M., Link, H., Liu, L., Schmid, R. D., Weuster-Botz, D. Biocatalytic process optimization based on mechanistic modeling of cholic acid oxidation with cofactor regeneration. *Biotechnol. Bioeng.*, 108(6):1307–17, 2011.
- Braun, M., Sun, B., Anselment, B., Weuster-Botz, D. Novel whole-cell biocatalysts with recombinant hydroxysteroid dehydrogenases for the asymmetric reduction of dehydrocholic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 95(6):1457–68, 2012.
- Brendel, M., Bonvin, D., Marquardt, W. Incremental identification of kinetic models for homogeneous reaction systems. *Chem. Eng. Sci.*, 61(16):5404–5420, 2006.
- Briggs, G. E., Haldane, J. B. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochem. J.*, 19(2): 338–9, 1925.
- Bryant, F., Adams, M. W. W. Characterization of Hydrogenase from the Hyperthermophilic. *J. Biol. Chem.*, 264(9):5070–5079, 1989.
- Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U. T. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Wiley-VCH, Weinheim, 2. edition, 2012.
- Buckland, B. C., Robinson, D. K., Chartrain, M. Biocatalysis for pharmaceuticals—status and prospects for a key technology. *Metab. Eng.*, 2(1):42–8, 2000.
- Cadwell, R. C., Joyce, G. F. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.*, 2(1):28–33, 1992.
- Camps, M., Naukkarinen, J., Johnson, B. P., Loeb, L. A. Targeted gene evolution in *Escherichia coli* using a highly error-prone DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(17): 9727–32, 2003.
- Carballeira, J. D., Quezada, M. A., Hoyos, P., Simeó, Y., Hernaiz, M. J., Alcantara, A. R., Sinisterra, J. V. Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnol. Adv.*, 27(6):686–714, 2009.
- Carley, K. M., Kamneva, N. Y., Reminga, J. Response Surface Methodology. Technical report, CASOS, 2004.
- Carrea, G., Pilotti, A., Riva, S., Canzi, E., Ferrari, A. Enzymatic synthesis of 12-Ketoursodeoxycholic acid from dehydrocholic acid in a membrane reactor. *Biotechnol. Lett.*, 14(12):1131–1134, 1992.
- Carugo, O., Argos, P. NADP-dependent enzymes. I: Conserved stereochemistry of cofactor binding. *Proteins*, 28(1):10–28, 1997a.
- Carugo, O., Argos, P. NADP-dependent enzymes. II: Evolution of the mono- and dinucleotide binding domains. *Proteins*, 28(1):29–40, 1997b.
- Chen, R. R. Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74(4):730–8, 2007.

- Chenault, H. K., Whitesides, G. M. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 14(2):147–97, 1987.
- Christiaens, H., Leer, R. J., Pouwels, P. H., Verstraete, W. Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay. *Appl. Envir. Microbiol.*, 58(12):3792–3798, 1992.
- Cleland, W. W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products I. nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta - Spec. Sect. Enzymol. Subj.*, 67:104–137, 1963a.
- Cleland, W. W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products II. Inhibition: Nomenclature and theory. *Biochim. Biophys. Acta - Spec. Sect. Enzymol. Subj.*, 67:173–187, 1963b.
- Cleland, W. W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochim. Biophys. Acta - Spec. Sect. Enzymol. Subj.*, 67:188–196, 1963c.
- Cleland, W. W. An Analysis of Haldane Relationships. *Methods Enzymol.*, 87(1963):366–369, 1982.
- Cornish-Bowden, A. An automatic method for deriving steady-state rate equations. *Biochem. J.*, 165(1):55–9, 1977.
- Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Wiley-VCH, Weinheim, 4. edition, 2012.
- Cornish-Bowden, A. J. Analysis of progress curves in enzyme kinetics. *Biochem. J.*, 130(2): 637–9, 1972.
- Datsenko, K. A., Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(12):6640–5, 2000.
- De Boever, P., Wouters, R., Verschaeve, L., Berckmans, P., Schoeters, G., Verstraete, W. Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53(6):709–714, 2000.
- De Lacey, A. L., Detcheverry, M., Moiroux, J., Bourdillon, C. Construction of multicomponent catalytic films based on avidin-biotin technology for the electroenzymatic oxidation of molecular hydrogen. *Biotechnol. Bioeng.*, 68(1):1–10, 2000.
- De Smet, I., Van Hoorde, L., Vande Woestyne, M., Christiaens, H., Verstraete, W. Significance of bile salt hydrolytic activities of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.*, 79(3):292–301, 1995.
- Dennewald, D., Pitner, W.-R., Weuster-Botz, D. Recycling of the ionic liquid phase in process integrated biphasic whole-cell biocatalysis. *Process Biochem.*, 46(5):1132–1137, 2011.
- Doerner, K. C., Takamine, F., LaVoie, C. P., Mallonee, D. H., Hylemon, P. B. Assessment of fecal bacteria with bile acid 7 alpha-dehydroxylating activity for the presence of bai-like genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(3):1185–8, 1997.

- Domínguez, E., Lan, H. L., Okamoto, Y., Hale, P. D., Skotheim, T. A., Gorton, L., Hahn-Hägerdal, B. Reagentless chemically modified carbon paste electrode based on a phenothiazine polymer derivative and yeast alcohol dehydrogenase for the analysis of ethanol. *Biosens. Bioelectron.*, 8(3-4):229–237, 1993.
- Drewke, C., Ciriacy, M. Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 950(1):54–60, 1988.
- Duetz, W. A., van Beilen, J. B., Witholt, B. Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12(4):419–25, 2001.
- Duggleby, R. G. Quantitative analysis of the time courses of enzyme-catalyzed reactions. *Methods*, 24(2):168–74, 2001.
- Edenharder, R., Pfützner, A., Hammann, R. Characterization of NAD-dependent 3 alpha- and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and of NADP-dependent 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from *Peptostreptococcus productus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1004(2):230–8, 1989a.
- Edenharder, R., Pfützner, M., Hammann, R. NADP-dependent 3 beta-, 7 alpha- and 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities from a lecithinase-lipase-negative *Clostridium* species 25.11.c. *Biochim. Biophys. Acta*, 1002(1):37–44, 1989b.
- Egan, S. M., Schleif, R. F. A regulatory cascade in the induction of rhaBAD. *J. Mol. Biol.*, 234(1):87–98, 1993.
- Eguchi, T., Kuge, Y., Inoue, K., Yoshikawa, N., Mochida, K., Uwajima, T. NADPH regeneration by glucose dehydrogenase from *Gluconobacter scleroides* for l-leucovorin synthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56(5):701–3, 1992.
- Ekdahl, P. H., Sjövall, J. On the conjugation and formation of bile acids in the human liver. I. On the excretion of bile acids by patients with postoperative choledochostomy drainage; bile acids and steroids 61. *Acta Chir. Scand.*, 114(6):439–52, 1958.
- Eriksen, D. T., Lian, J., Zhao, H. Protein design for pathway engineering. *J. Struct. Biol.*, 185(2):234–42, 2014.
- Eszes, C. +., Sessions, R. +B., Clarke, A. R., Moreton, K. M., Holbrook, J. J. Removal of substrate inhibition in a lactate dehydrogenase from human muscle by a single residue change. *FEBS Lett.*, 399(3):193–7, 1996.
- Faber, K., editor. *Biotransformations in Organic Chemistry - A Textbook*. Springer Verlag, Berlin, 6. edition, 2011.
- Fahrenkamp-Uppenbrink, J.a. Chemistry Goes Green. *Science (80-.)*, 297(5582):798, 2002.
- Feng, Y., Siu, K., Wang, N., Ng, K.-M., Tsao, S.-W., Nagamatsu, T., Tong, Y. Bear bile: dilemma of traditional medicinal use and animal protection. *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 5:2, 2009.

- Ferrandi, E. E., Bertolesi, G. M., Polentini, F., Negri, A., Riva, S., Monti, D. In search of sustainable chemical processes: cloning, recombinant expression, and functional characterization of the 7α - and 7β -hydroxysteroid dehydrogenases from *Clostridium absonum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 95(5):1221–33, 2012.
- Ferrer, M., Beloqui, A., Golyshin, P. N. Screening metagenomic libraries for laccase activities. *Methods Mol. Biol.*, 668:189–202, 2010.
- Fessner, W.-D., Archelas, A., Demirjian, D. C., Furstoss, R., Griengl, H., Jaeger, K.-E., Morís-Varas, E., Öhrlein, R., Reetz, M. T., Reymond, J.-L., Schmidt, M., Servi, S., Shah, P. C., Tischer, W., Wedekind, F., editors. *Biocatalysis - From Discovery to Application*, volume 200 of *Topics in Current Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1999.
- Fieser, L. F. Steric course of reactions of steroids. *Experientia*, 6(8):312–316, 1950a.
- Fieser, L. F., Rajagopalan, S. Oxidation of Steroids. III. Selective Oxidations and Acylations in the Bile Acid Series. *J. Am. Chem. Soc.*, 72(12):5530–5536, 1950b.
- Fieser, L. F., Herz, J. E., Klohs, M. W., Romero, M. A., Utne, T. Cathylation (Carbethoxylation) of Steroid Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.*, 74(13):3309–3313, 1952.
- Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J. Biol. Chem.*, 277(28):25677–84, July 2002.
- Findrik, Z., Vasić-Racki, D. Biotransformation of D-methionine into L-methionine in the cascade of four enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, 98(5):956–67, 2007.
- Findrik, Z., Vasić-Racki, D., Lütz, S., Daussmann, T., Wandrey, C. Kinetic modeling of acetophenone reduction catalyzed by alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter* sp. *Biotechnol. Lett.*, 27(15):1087–95, 2005.
- Fischer, E. Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. *Zeitschrift für Physiol. Chemie*, 26:60–87, 1898.
- Fling, S. P., Gregerson, D. S. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.*, 155(1):83–8, 1986.
- Fossati, E., Polentini, F., Carrea, G., Riva, S. Exploitation of the alcohol dehydrogenase-acetone NADP-regeneration system for the enzymatic preparative-scale production of 12-ketochenodeoxycholic acid. *Biotechnol. Bioeng.*, 93(6):1216–20, 2006.
- Friman, S., Persson, H., Scherstén, T., Svanvik, J., Karlberg, I. Adjuvant treatment with ursodeoxycholic acid reduces acute rejection after liver transplantation. *Transplant. Proc.*, 24(1):389–90, 1992.
- Fromm, H. J. A simplified schematic method for deriving steady-state rate equations using a modification of the theory of graphsprocedure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40(3):692–697, 1970.

- Fu, Y. *Asymmetric reductions using novel ene-reductases from cyanobacteria*. Dissertation, Technische Universität München, 2013.
- Galský, J., Banský, G., Holubová, T., Kõnig, J. Effect of ursodeoxycholic acid in acute viral hepatitis. *J. Clin. Gastroenterol.*, 28(3):249–53, 1999.
- Gangloff, A., Garneau, A., Huang, Y. W., Yang, F., Lin, S. X. Human oestrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase specificity: enzyme regulation through an NADPH-dependent substrate inhibition towards the highly specific oestrone reduction. *Biochem. J.*, 356(Pt 1): 269–76, 2001.
- Ghosh, D., Erman, M., Wawrzak, Z., Duax, W. L., Pangborn, W. Mechanism of inhibition of 3 α ,20 β -hydroxysteroid dehydrogenase by a licorice-derived steroidal inhibitor. *Structure*, 2(10):973–980, 1994a.
- Ghosh, D., Wawrzak, Z., Weeks, C. M., Duax, W. L., Erman, M. The refined three-dimensional structure of 3 α ,20 β -hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases. *Structure*, 2(7):629–640, 1994b.
- Gleeson, D., Ruppin, D. C., Saunders, A., Murphy, G. M., Dowling, R. H. Final outcome of ursodeoxycholic acid treatment in 126 patients with radiolucent gallstones. *Q. J. Med.*, 76(279):711–29, 1990.
- Grill, J., Schneider, F., Crociani, J., Ballongue, J. Purification and Characterization of Conjugated Bile Salt Hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536. *Appl. Envir. Microbiol.*, 61(7):2577–2582, 1995.
- Grimm, C., Maser, E., Möbus, E., Klebe, G., Reuter, K., Ficner, R. The crystal structure of 3 α -phospho-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni* shows a novel oligomerization pattern within the short chain dehydrogenase/reductase family. *J. Biol. Chem.*, 275(52):41333–9, 2000.
- Gröger, H., Chamouveau, F., Orologas, N., Rollmann, C., Drauz, K., Hummel, W., Weckbecker, A., May, O. Enantioselective reduction of ketones with "designer cells" at high substrate concentrations: highly efficient access to functionalized optically active alcohols. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 45(34):5677–81, 2006.
- Groher, A., Hoelsch, K. Mechanistic model for the synthesis of N-acetylneuraminic acid using N-acetylneuraminic lyase from *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 83(null): 1–7, 2012.
- Gupta, A., Khare, S. K. Enzymes from solvent-tolerant microbes: useful biocatalysts for non-aqueous enzymology. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 29(1):44–54, 2009.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., Beckwith, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.*, 177(14): 4121–30, 1995.
- Hagey, L. R., Crombie, D. L., Espinosa, E., Carey, M. C., Igimi, H., Hofmann, A. F. Ursodeoxycholic acid in the *Ursidae*: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *J. Lipid Res.*, 34(11):1911–7, 1993.

- Hamilton, C. M., Aldea, M., Washburn, B. K., Babitzke, P., Kushner, S. R. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 171(9):4617–22, 1989.
- Helenius, A., Simons, K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.*, 415(1):29–79, 1975.
- Hilt, W., Pfeleiderer, G., Fortnagel, P. Glucose dehydrogenase from *Bacillus subtilis* expressed in *Escherichia coli*. I: Purification, characterization and comparison with glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1076(2):298–304, 1991.
- Hirano, S., Masuda, N. Characterization of NADP-dependent 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenases from *Peptostreptococcus productus* and *Eubacterium aerofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(5):1057–63, 1982.
- Hofmann, A. F. The preparation of chenodeoxycholic acid and its glycine and taurine conjugates. *Acta Chem. Scand.*, 17(1):173–186, 1963.
- Hofmann, A. F. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol. Sci.*, 14:24–29, 1999.
- Hofmann, A. F., Mysels, K. J. Bile salts as biological surfactants. *Colloids and Surfaces*, 30(1):145–173, 1988.
- Hofmann, A. F., Mysels, K. J. Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions. *J. Lipid Res.*, 33(5):617–626, 1992.
- Hofmann, A. F., Roda, A. Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J. Lipid Res.*, 25(13):1477–1489, 1984.
- Hogan, M. C, Woodley, J. M. Modelling of two enzyme reactions in a linked cofactor recycle system for chiral lactone synthesis. *Chem. Eng. Sci.*, 55(11):2001–2008, 2000.
- Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Holtmann, D. Enzymatic reductions for the chemist. *Green Chem.*, 13(9):2285–2313, 2011.
- Hölsch, K. *Asymmetrische Synthesen mit neuen Oxidoreduktasen aus Cyanobakterien*. PhD thesis, Technische Universität München, 2009.
- Hölsch, K., Weuster-Botz, D. Enantioselective reduction of prochiral ketones by engineered bifunctional fusion proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 56(4):131–40, 2010.
- Huang, M. A Simple Modification of the Wolff-Kishner Reduction. *J. Am. Chem. Soc.*, 68(12):2487–2488, 1946.
- Huang, M. Reduction of Steroid Ketones and other Carbonyl Compounds by Modified Wolff-Kishner Method. *J. Am. Chem. Soc.*, 71(10):3301–3303, 1949.
- Igimi, H., Carey, M. C. Cholesterol gallstone dissolution in bile: dissolution kinetics of crystalline (anhydrate and monohydrate) cholesterol with chenodeoxycholate, ursodeoxycholate, and their glycine and taurine conjugates. *J. Lipid Res.*, 22(2):254–70, 1981.

- Ikemi, M., Koizumi, N., Ishimatsu, Y. Sorbitol production in charged membrane bioreactor with coenzyme regeneration system: I. Selective retainment of NADP(H) in a continuous reaction. *Biotechnol. Bioeng.*, 36(2):149–54, 1990.
- Illanes, A., Cauerrhff, A., Wilson, L., Castro, G. R. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour. Technol.*, 115:48–57, 2012.
- Im, E., Martinez, J. D. Ursodeoxycholic Acid (UDCA) Can Inhibit Deoxycholic Acid (DCA)-induced Apoptosis via Modulation of EGFR/Raf-1/ERK Signaling in Human Colon Cancer Cells. *J. Nutr.*, 134(2):483–486, 2004.
- Indge, K. J., Childs, R. E. A new method for deriving steady-state rate equations suitable for manual or computer use. *Biochem. J.*, 155(3):567–70, 1976.
- Ishige, T., Honda, K., Shimizu, S. Whole organism biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9(2): 174–80, 2005.
- Jenzsch, M., Gnoth, S., Beck, M., Kleinschmidt, M., Simutis, R., Lübbert, A. Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes. *J. Biotechnol.*, 127(1):84–94, 2006.
- Jeromin, G., Bertau, M. *Bioorganikum*. Wiley-VCH, Weinheim., 1st edition, 2005.
- Johannes, T. W., Zhao, H. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9(3):261–7, 2006.
- Jones, J. B., Sneddon, D. W., Higgins, W., Lewis, A. J. Preparative-scale reductions of cyclic ketones and aldehyde substrates of horse liver alcohol dehydrogenase with in situ sodium dithionite recycling of catalytic amounts of NAD. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 15:856, 1972.
- Jörnvall, H., Persson, M., Jeffery, J. 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):4226–30, 1981.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 34(18):6003–13, 1995.
- Jörnvall, H., Höög, J. O., Persson, B. SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett.*, 445(2-3): 261–4, February 1999.
- Jose, J., Maas, R. M., Teese, M. G. Autodisplay of enzymes—molecular basis and perspectives. *J. Biotechnol.*, 161(2):92–103, 2012.
- Julliard, M., Le Petit, J. Regeneration of NAD⁺ and NADP⁺ cofactors by photosensitized electron transfer. *Photochem. Photobiol.*, 36(3):283–290, 1982.
- Julsing, M. K., Kuhn, D., Schmid, A., Bühler, B. Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition. *Biotechnol. Bioeng.*, 109(5):1109–19, 2012.

- Jung, G., Denève, P., Becquart, J., Mayaux, J.-F. High-cell density fermentation studies of recombinant *Escherichia coli* strains expressing human interleukin-1 β . *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, 139:129–146, 1988.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H., Persson, B. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Eur. J. Biochem.*, 269(18):4409–4417, September 2002.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Persson, B. Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models. *FEBS J.*, 277(10):2375–86, 2010.
- Karzanov, V. V., Correa, C. M., Bogatsky, Y. G., Netrusov, A. I. Alternative NAD(+)-dependent formate dehydrogenases in the facultative methylotroph *Mycobacterium vaccae* 10. *FEMS Microbiol. Lett.*, 65(1):95–9, 1991.
- Kato, N., Sahm, H., Wagner, F. Steady-state kinetics of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from a methanol-utilizing yeast, *Candida boidinii*. *Biochim. Biophys. Acta*, 566(1):12–20, 1979.
- Kaur, J., Sharma, R. Directed evolution: an approach to engineer enzymes. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 26(3):165–99, 2006.
- Kazlauskas, R. Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations, and opportunities. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4(1):81–88, 2000.
- Kazlauskas, R. J., Bornscheuer, U. T. Finding better protein engineering strategies. *Nat. Chem. Biol.*, 5(8):526–9, 2009.
- Keinan, E., Hafeli, E. K., Seth, K. K., Lamed, R. Thermostable enzymes in organic synthesis. 2. Asymmetric reduction of ketones with alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobium brockii*. *J. Am. Chem. Soc.*, 108(1):162–169, 1986.
- Khare, S., Cerda, S., Wali, R. K., Lintig, F. C. von, Tretiakova, M., Joseph, L., Stoiber, D., Cohen, G., Nimmagadda, K., Hart, J., Sitrin, M. D., Boss, G. R., Bissonnette, M. Ursodeoxycholic Acid Inhibits Ras Mutations, Wild-type Ras Activation, and Cyclooxygenase-2 Expression in Colon Cancer. *Cancer Res.*, 63(13):3517–3523, 2003.
- Khersonsky, O., Tawfik, D. S. Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. *Annu. Rev. Biochem.*, 79:471–505, 2010. ISSN 1545-4509.
- King, E. L., Altman, C. A Schematic Method of Deriving the Rate Laws for Enzyme-Catalyzed Reactions. *J. Phys. Chem.*, 60(10):1375–1378, 1956.
- Kirsch, R. D., Joly, E. An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic Acids Res.*, 26(7):1848–50, 1998.
- Klibanov, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409(6817):241–6, 2001.
- Kragl, U., Vasic-Racki, D., Wandrey, C. Continuous production of L-tert-leucine in series of two enzyme membrane reactors. *Bioprocess Eng.*, 14(6):291–297, 1996.

- Kratzer, R., Pukl, M., Egger, S., Nidetzky, B. Whole-cell bioreduction of aromatic alpha-keto esters using *Candida tenuis* xylose reductase and *Candida boidinii* formate dehydrogenase co-expressed in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.*, 7:37, 2008.
- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., Faber, K. Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 8(2):120–6, 2004.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, 30(1):81–7, 1987.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–5, 1970.
- Langemann, T., Koller, V. J., Muhammad, A., Kudela, P., Mayr, U. Beate, Lubitz, W. The Bacterial Ghost platform system: production and applications. *Bioeng. Bugs*, 1(5):326–36, 2010.
- Lederberg, J., Bloom, B. R. *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press, San Diego, 2. edition, 2000.
- Lee, J.-Y., Arai, H., Nakamura, Y., Fukiya, S., Wada, M., Yokota, A. Contribution of the 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Ruminococcus gnavus* N53 to ursodeoxycholic acid formation in the human colon. *J. Lipid Res.*, 54(11):3062–9, 2013.
- Lee, S. K., Kim, M.-H. Updates in the treatment of gallstones. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 3(6):649–60, 2009.
- León, R., Fernandes, P., Pinheiro, H. M., Cabral, J. M. S. Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb. Technol.*, 23(7-8):483–500, 1998.
- Leung, D. W., Chen, E., Goeddel, D. V. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Tech.*, 1:11–15, 1989.
- Li, Y.-W., Zhu, X.-Y., But, Paul P.-H., Yeung, H.-W. Ethnopharmacology of bear gall bladder: I. *J. Ethnopharmacol.*, 47(1):27–31, 1995.
- Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C., editors. *Industrial Biotransformations*. Wiley-VCH, Weinheim, 2. edition, 2006.
- Lindley, P. F., Carey, M. C. Molecular packing of bile acids: Structure of ursodeoxycholic acid. *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.*, 17(2):231–249, 1987.
- Lineweaver, H., Burk, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56(3):658–666, 1934.
- Liu, H., Naismith, J. H. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol.*, 8:91, 2008.
- Liu, L., Aigner, A., Schmid, R. D. Identification, cloning, heterologous expression, and characterization of a NADPH-dependent 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Collinsella aerofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90(1):127–135, 2010.

- Liu, L., Braun, M., Gebhardt, G., Weuster-Botz, D., Gross, R., Schmid, R. D. One-step synthesis of 12-ketoursodeoxycholic acid from dehydrocholic acid using a multienzymatic system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(2):633–639, 2012.
- Löffler, G., Petrides, P. E. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin, 6. edition, 1998.
- Lorsch, J. R., Szostak, J. W. In vitro evolution of new ribozymes with polynucleotide kinase activity. *Nature*, 371(6492):31–6, 1994.
- Lundeen, S. G., Savage, D. C. Characterization and purification of bile salt hydrolase from *Lactobacillus* sp. strain 100-100. *J. Bacteriol.*, 172(8):4171–4177, 1990.
- Macdonald, I. A., Meier, E. C., Mahony, D. E., Costain, G. A. 3 α -, 7 α - and 12 α -hydroxysteroid dehydrogenase activities from *Clostridium perfringens*. *Biochim. Biophys. Acta*, 450(2):142–53, 1976.
- Macdonald, I. A., Rochon, Y. P., Hutchison, D. M., Holdeman, L. V. Formation of ursodeoxycholic acid from chenodeoxycholic acid by a 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase-elaborating *Eubacterium aerofaciens* strain cocultured with 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase-elaborating organisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(5):1187–95, 1982.
- Macdonald, I. A., Hutchison, D. M., Forrest, T. P., Bokkenheuser, V. D., Winter, J., Holdeman, L. V. Metabolism of primary bile acids by *Clostridium perfringens*. *J. Steroid Biochem.*, 18(1):97–104, 1983.
- Maiwald, T., Timmer, J. Dynamical modeling and multi-experiment fitting with PottersWheel. *Bioinformatics*, 24(18):2037–43, 2008.
- Marekov, L., Krook, M., Jörnvall, H. Prokaryotic 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase is an enzyme of the α -short-chain, non-metalloenzymeTM alcohol dehydrogenase type. *FEBS Lett.*, 266(1-2):51–54, 1990.
- Marsili-Libelli, S., Guerrizio, S., Checchi, N. Confidence regions of estimated parameters for ecological systems. *Ecol. Modell.*, 165(2-3):127–146, 2003.
- Maser, E., Möbus, E., Xiong, G. Functional expression, purification, and characterization of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 272(2):622–8, 2000.
- May, O., Nguyen, P. T., Arnold, F. H. Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat. Biotechnol.*, 18(3):317–20, 2000.
- Medici, A., Pedrini, P., Bianchini, E., Fantin, G., Guerrini, A., Natalini, B., Pellicciari, R. 7 α -OH epimerisation of bile acids via oxido-reduction with *Xanthomonas maltophilia*. *Steroids*, 67(1):51–6, 2002.
- Michaelis, L., Menten, M. L. Die Kinetik der invertinwirkung. *Biochem. Z.*, 49:333–369, 1913.
- Michalik, C., Schmidt, T., Zavrel, M., Ansorge-Schumacher, M., Spiess, A., Marquardt, W. Application of the incremental identification method to the formate oxidation using formate dehydrogenase. *Chem. Eng. Sci.*, 62(18-20):5592–5597, 2007.

- Mitamura, T., Urabe, I., Okada, H. Enzymatic properties of isozymes and variants of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Eur. J. Biochem.*, 186(1-2):389–393, 1989.
- Mitamura, T., Ehora, R. V., Nakai, T., Makino, Y., Negoro, S., Urabe, I., Okada, H. Structure of isozyme genes of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IAM1030. *J. Ferment. Bioeng.*, 70(6):363–369, 1990.
- Möbus, E., Maser, E. Molecular cloning, overexpression, and characterization of steroid-inducible 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. A novel member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J. Biol. Chem.*, 273(47):30888–96, 1998.
- Montgomery, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. Wiley, New York, USA, 7. edition, 2009.
- Monti, D., Ferrandi, E. E., Zanellato, I., Hua, L., Polentini, F., Carrea, G., Riva, S. One-Pot Multienzymatic Synthesis of 12-Ketoursodeoxycholic Acid: Subtle Cofactor Specificities Rule the Reaction Equilibria of Five Biocatalysts Working in a Row. *Adv. Synth. Catal.*, 351(9): 1303–1311, 2009.
- Nagao, T., Mitamura, T., Wang, X. H., Negoro, S., Yomo, T., Urabe, I., Okada, H. Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. *J. Bacteriol.*, 174(15):5013–20, 1992.
- Nakamura, K., Yamanaka, R. Light mediated cofactor recycling system in biocatalytic asymmetric reduction of ketone. *Chem. Commun.*, 16:1782–1783, 2002.
- Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T., Harada, T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14(18):2659–2681, 2003.
- Nguyen, D. L., Juran, B. D., Lazaridis, K. N. Primary biliary cirrhosis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 24(5):647–54, 2010.
- Ohshima, T., Ito, Y., Sakuraba, H., Goda, S., Kawarabayasi, Y. The *Sulfolobus tokodaii* gene ST1704 codes highly thermostable glucose dehydrogenase. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 23(2-6): 281–289, 2003.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., Jörnvall, H. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem. Biol. Interact.*, 143-144:247–53, 2003.
- Oppermann, U. C., Maser, E. Characterization of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *Eur. J. Biochem.*, 241(3):744–9, 1996.
- Oppermann, U. C., Filling, C., Berndt, K. D., Persson, B., Benach, J., Ladenstein, R., Jörnvall, H. Active site directed mutagenesis of 3 β /17 β -hydroxysteroid dehydrogenase establishes differential effects on short-chain dehydrogenase/reductase reactions. *Biochemistry*, 36(1):34–40, 1997.

- Orsi, B. A., Tipton, K. F. Kinetic analysis of progress curves. *Methods Enzymol.*, 63:159–183, 1979.
- Panke, S., Held, M., Wubbolts, M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15(4):272–9, 2004.
- Pasteur, M. L. Mémoire sur la fermentation de l'acide tartrique. *R. Hebd. Seance Acad. Sci. Paris*, 46:615–618, 1858.
- Pedrini, P., Andreotti, E., Guerrini, A., Dean, M., Fantin, G., Giovannini, P. P. *Xanthomonas maltophilia* CBS 897.97 as a source of new 7 β - and 7 α -hydroxysteroid dehydrogenases and cholyglycine hydrolase: improved biotransformations of bile acids. *Steroids*, 71(3): 189–98, 2006.
- Persson, B. Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem. Biol. Interact.*, 143-144:271–278, 2003.
- Persson, B., Hedlund, J., Jörnvall, H. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the MDR superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65(24):3879–94, 2008.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25(13):1605–12, 2004.
- Phillips, R. S. Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: Prospects for exploitation. *Trends Biotechnol.*, 14(1):13–16, 1996.
- Pire, C., Marhuenda-egea, F. C., Esclapez, J., Alcaraz, L., Ferrer, J., José Bonete, M. Stability and Enzymatic Studies of Glucose Dehydrogenase from the Archaeon *Haloferax mediterranei* in reverse micelles. *Biocatal. Biotransformation*, 22(1):17–23, 2004.
- Polisky, B., Bishop, R. J., Gelfand, D. H. A plasmid cloning vehicle allowing regulated expression of eukaryotic DNA in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 73(11):3900–4, 1976.
- Pollard, D. J., Woodley, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol.*, 25(2):66–73, 2007.
- Purkarthofer, T., Gruber, K., Gruber-Khadjawi, M., Waich, K., Skranc, W., Mink, D., Griengl, H. A biocatalytic Henry reaction—the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* also catalyzes nitroaldol reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 45(21):3454–6, 2006.
- Ramaley, R. F., Vasantha, N. Glycerol protection and purification of *Bacillus subtilis* glucose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 258(20):12558–65, 1983.
- Raman, S., Vernon, R., Thompson, J., Tyka, M., Sadreyev, R., Pei, J., Kim, D., Kellogg, E., DiMaio, F., Lange, O., Kinch, L., Sheffler, W., Kim, B.-H., Das, R., Grishin, N. V., Baker, D. Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins*, 77 Suppl 9:89–99, 2009.
- Rao, S. T., Rossmann, M. G. Comparison of super-secondary structures in proteins. *J. Mol. Biol.*, 76(2):241–56, 1973.

- Reed, M. C., Lieb, A., Nijhout, H. F. The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. *Bioessays*, 32(5):422–9, 2010.
- Reetz, M. T., Jaeger, K.-E. Superior Biocatalysts by Directed Evolution. In Fessner, Wolf-Dieter, Archelas, A., Demirjian, D. C., Furstoss, R., Griengl, H., Jaeger, K. E., Morís-Varas, E., Öhrlein, R., Reetz, M. T., Reymond, J.-L., Schmidt, M., Servi, S., Shah, P. C., Tischer, W., Wedekind, F., editors, *Biocatal. - From Discov. to Appl.*, pages 31–57. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1999.
- Reetz, M. T., Kahakeaw, D., Sanchis, J. Shedding light on the efficacy of laboratory evolution based on iterative saturation mutagenesis. *Mol. Biosyst.*, 5(2):115–22, 2009.
- Richter, N., Neumann, M., Liese, A., Wohlgemuth, R., Weckbecker, A., Eggert, T., Hummel, W. Characterization of a whole-cell catalyst co-expressing glycerol dehydrogenase and glucose dehydrogenase and its application in the synthesis of L-glyceraldehyde. *Biotechnol. Bioeng.*, 106(4):541–52, 2010.
- Ridlon, J. M., Kang, D.-J., Hylemon, P. B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.*, 47(2):241–59, 2006.
- Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W. A., Pohl, H.-D., Korz, D., Sanders, E. A., Roß, A., Deckwer, W.-D. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotechnol.*, 20(1):17–27, 1991.
- Rossmann, M., Liljas, A., Brändén, C., Banaszak, L. Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. In Boyer, P. D., editor, *The Enzymes*. Academic Press, New York, 3rd edition, 1975.
- Rozzell, J. D. Commercial scale biocatalysis: myths and realities. *Bioorg. Med. Chem.*, 7(10): 2253–2261, 1999.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487–491, 1988.
- Salen, G., Colalillo, A., Verga, D., Bagan, E., Tint, G. S., Shefer, S. Effect of high and low doses of ursodeoxycholic acid on gallstone dissolution in humans. *Gastroenterology*, 78(6): 1412–8, 1980.
- Sali, A., Blundell, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, 234(3):779–815, 1993.
- Sambrook, J., Russell, D. W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, volume 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 3. edition, 2001.
- Samuelsson, B. Preparation of Ursodeoxycholic Acid and $3\alpha,7\beta,12\alpha$ -Trihydroxycholanic Acid. *Acta Chem. Scand.*, 14:17–20, 1960.
- Sanchez, S., Demain, A. L. Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. *Org. Process Res. Dev.*, 15(1):224–230, 2011.

- Sanchis, J., Fernández, L., Carballeira, J. D., Drone, J., Gumulya, Y., Höbenreich, H., Kaha-keaw, D., Kille, S., Lohmer, R., Peyralans, J. J.-P., Podtetenieff, J., Prasad, S., Soni, P., Taglieber, A., Wu, S., Zilly, F. E., Reetz, M. T. Improved PCR method for the creation of saturation mutagenesis libraries in directed evolution: application to difficult-to-amplify templates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81(2):387–97, 2008.
- Schewe, H., Kaup, B.-A., Schrader, J. Improvement of P450(BM-3) whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78(1):55–65, 2008.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409(6817):258–68, 2001.
- Schmidt, T., Michalik, C., Zavrel, M., Spiess, A., Marquardt, W., Ansorge-Schumacher, M. B. Mechanistic model for prediction of formate dehydrogenase kinetics under industrially relevant conditions. *Biotechnol. Prog.*, 26(1):73–8, 2010.
- Schoemaker, H. E., Mink, D., Wubbolts, M. G. Dispelling the myths—biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, 299(5613):1694–7, 2003.
- Schubert, T., Hummel, W., Müller, M. Highly Enantioselective Preparation of Multifunctionalized Propargylic Building Blocks. *Angew. Chemie*, 114(4):656–659, 2002.
- Schulze, B., Wubbolts, M. G. Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(6):609–615, 1999.
- Schuster, M., Aaviksaar, A., Jakubke, H.-D. Enzyme-catalyzed peptide synthesis in ice. *Tetrahedron*, 46(24):8093–8102, 1990.
- Schütte, H., Flossdorf, J., Sahm, H., Kula, M.-R. Purification and Properties of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.*, 62(1):151–160, 1976.
- Segel, I. H. *Enzyme Kinetics - Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley & Sons, Hoboken, USA, 1993.
- Shaffer, E. A. Gallstone disease: Epidemiology of gallbladder stone disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 20(6):981–96, 2006.
- Shaked, Z., Whitesides, G. M. Enzyme-catalyzed organic synthesis: NADH regeneration by using formate dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.*, 102(23):7104–7105, 1980.
- Sherrod, J. A., Hylemon, P. B. Partial purification and characterization of NAD-dependent 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Biochim. Biophys. Acta*, 486(2):351–8, 1977.
- Silbernagl, S., Agamemnon, D. *Taschenatlas der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 6. edition, 2003.
- Simons, K. T., Kooperberg, C., Huang, E., Baker, D. Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions. *J. Mol. Biol.*, 268(1):209–25, 1997.

- Skålhegg, B. A. On the 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. Purification and Properties. *Eur. J. Biochem.*, 46(1):117–125, 1974.
- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M.-R., Pohl, M. Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Eur. J. Biochem.*, 267(5):1280–1289, 2000.
- Söding, J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics*, 21(7): 951–60, 2005.
- Söding, J., Biegert, A., Lupas, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, 33(Web Server issue):W244–8, 2005.
- Sørensen, H. P., Mortensen, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 115(2):113–28, 2005.
- Stemmer, W. P. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 370(6488): 389–91, 1994.
- Stiehl, A., Czygan, P., Kommerell, B., Weis, H. J., Holtermüller, K. H. Ursodeoxycholic acid versus chenodeoxycholic acid. Comparison of their effects on bile acid and bile lipid composition in patients with cholesterol gallstones. *Gastroenterology*, 75(6):1016–20, 1978.
- Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J. New Constraints Between Kinetic Parameters Explain the (Un)identifiability of Enzymatic Rate Constants. *Biotechnol. Bioeng.*, 52:433–437, 1996.
- Straathof, A. J. J., Panke, S., Schmid, A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13(6):548–556, 2002.
- Striedner, G., Pfaffenzeller, I., Markus, L., Nemecek, S., Grabherr, R., Bayer, K. Plasmid-free T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 105(4):786–94, 2010.
- Studier, F. W. W., Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, 189(1):113–30, 1986.
- Suller, M. T., Lloyd, D. Fluorescence monitoring of antibiotic-induced bacterial damage using flow cytometry. *Cytometry*, 35(3):235–41, 1999.
- Sumner, J. B., Somers, G. F. *Chemistry and Methods of Enzymes*. Academic Press, New York, 1953.
- Sun, Boqiao, Kantzow, Christina, Bresch, Sven, Castiglione, Kathrin, Weuster-Botz, Dirk. Multi-enzymatic one-pot reduction of dehydrocholic acid to 12-keto-ursodeoxycholic acid with whole-cell biocatalysts. *Biotechnol. Bioeng.*, 110(1):68–77, 2013.
- Sutherland, J. D., Macdonald, I. A. The metabolism of primary, 7-oxo, and 7 beta-hydroxy bile acids by *Clostridium absonum*. *J. Lipid Res.*, 23(5):726–32, 1982a.
- Sutherland, J. D., Macdonald, I., Forrest, T. The Enzymic and Chemical Synthesis of Ursodeoxycholic and Chenodeoxycholic Acid from Cholic Acid. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 12 (4):307–321, 1982b.

- Talalay, P., Dobson, M. M., Tapley, D. F. Oxidative degradation of testosterone by adaptive enzymes. *Nature*, 170(4328):620–1, 1952.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A., Mitsui, Y. Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family. *Structure*, 4(1): 33–45, 1996a.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Tanabe, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D., Mitsui, Y. Crystal structures of the binary and ternary complexes of 7 α-hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 35(24):7715–30, 1996b.
- Terpe, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72(2):211–22, 2006.
- Thanassi, D. G., Cheng, L. W., Nikaido, H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 179(8):2512–8, 1997.
- Theorell, H., Chance, B. Studies on Liver Alcohol Dehydrogenase II. The Kinetics of the Compound of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase and Reduced Diphosphopyridine Nucleotide. *Acta Chem. Scand.*, 5:1127–1144, 1951.
- Tishkov, V. I., Popov, V. O. Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomol. Eng.*, 23 (2-3):89–110, 2006.
- Tishkov, V. I., Galkin, A. G., Fedorchuk, V. V., Savitsky, P. A., Rojkova, A. M., Gieren, H., Kula, M. R. Pilot scale production and isolation of recombinant NAD⁺- and NADP⁺-specific formate dehydrogenases. *Biotechnol. Bioeng.*, 64(2):187–93, 1999.
- Tufvesson, P., Lima-Ramos, J., Nordblad, M., Woodley, J. M. Guidelines and Cost Analysis for Catalyst Production in Biocatalytic Processes. *Org. Process Res. Dev.*, 15(1):266–274, 2011.
- van der Donk, W. A., Zhao, H. Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14(4):421–6, 2003.
- Van Hecke, W., Bhagwat, A., Ludwig, R., Dewulf, J., Haltrich, D., Van Langenhove, H. Kinetic modeling of a bi-enzymatic system for efficient conversion of lactose to lactobionic acid. *Biotechnol. Bioeng.*, 102(5):1475–82, 2009.
- Vasic-Racki, D., Kragl, U., Liese, A. Benefits of Enzyme Kinetics Modelling. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 17(1):7–18, 2003.
- Vrtis, J. M., White, A. K., Metcalf, W. W., van der Donk, W. A. Phosphite Dehydrogenase: An Unusual Phosphoryl Transfer Reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(11):2672–2673, 2001.
- Wagenknecht, P. S., Penney, J. M., Hembre, R. T. Transition-Metal-Catalyzed Regeneration of Nicotinamide Coenzymes with Hydrogen 1. *Organometallics*, 22(6):1180–1182, 2003.
- Webb, E. C., editor. *Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. Academic Press, New York, 6. edition, 1992.

- Weckbecker, A., Gröger, H., Hummel, W. Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 120: 195–242, 2010.
- Wells, J. E., Hylemon, P. B. Identification and characterization of a bile acid 7 α -dehydroxylation operon in *Clostridium* sp. strain TO-931, a highly active 7 α -dehydroxylating strain isolated from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(3):1107–13, 2000.
- Wenda, S., Illner, S., Mell, A., Kragl, U. Industrial biotechnology - the future of green chemistry? *Green Chem.*, 13(11):3007, 2011.
- Wichmann, R., Vasic-Racki, D. Cofactor Regeneration at the Lab Scale. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 92:225 – 60, 2005.
- Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., Mattes, R., Siemann, M., Altenbuchner, J. High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnol. Bioeng.*, 73(2):95–103, 2001.
- Wolfenden, R., Snider, M. J. The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts. *Acc. Chem. Res.*, 34(12):938–945, 2001.
- Wolff, L. Methode zum Ersatz des Sauerstoffatoms der Ketone und Aldehyde durch Wasserstoff. [Erste Abhandlung.]. *Justus Liebig's Ann. der Chemie*, 394(1):86–108, 1912.
- Wong, C. H., Gordon, J., Cooney, C. L., Whitesides, G. M. Regeneration of NAD(P)H using glucose-6-sulfate and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Org. Chem.*, 46(23):4676–4679, 1981.
- Woodley, J. M. Choice of biocatalyst form for scalable processes. *Biochem. Soc. Trans.*, 34(Pt 2):301–3, 2006.
- Woodyer, R., van der Donk, W. A, Zhao, H. Relaxing the nicotinamide cofactor specificity of phosphite dehydrogenase by rational design. *Biochemistry*, 42(40):11604–14, 2003.
- Wyatt, P., Warren, S. *Organic Synthesis: Strategy and Control*. Wiley & Sons, Holboken, 1. edition, 2007.
- Yamamoto, H., Mitsunashi, K., Kimoto, N., Kobayashi, Y., Esaki, N. Robust NADH-regenerator: improved α -halo-ketone-resistant formate dehydrogenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67(1):33–9, 2005.
- Yoshimoto, T., Higashi, H., Kanatani, A., Lin, X. S., Nagai, H., Oyama, H., Kurazono, K., Tsuru, D. Cloning and sequencing of the 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of the expressed enzyme. *J. Bacteriol.*, 173(7): 2173–9, 1991.
- Yun, H., Yang, Y.-H., Cho, B.-K., Hwang, B.-Y., Kim, B.-G. Simultaneous synthesis of enantiomerically pure (R)-1-phenylethanol and (R)- α -methylbenzylamine from racemic α -methylbenzylamine using ω -transaminase/alcohol dehydrogenase/glucose dehydrogenase coupling reaction. *Biotechnol. Lett.*, 25(10):809–14, 2003.

- Zhang, W., O'Connor, K., W., Daniel I. C., Li, Z. Bioreduction with efficient recycling of NADPH by coupled permeabilized microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(3):687–94, 2009.
- Zhang, Y. I-TASSER: fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins*, 77 Suppl 9:100–13, 2009.
- Zhang, Y., Kolinski, A., Skolnick, J. TOUCHSTONE II: a new approach to ab initio protein structure prediction. *Biophys. J.*, 85(2):1145–64, 2003.
- Zheng, L., Baumann, U., Reymond, J.-L. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.*, 32(14):e115, 2004.
- Zhong, J., Karberg, M., Lambowitz, A. M. Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker. *Nucleic Acids Res.*, 31(6):1656–1664, 2003.

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat
AU	<i>artificial units</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BTM	Biotrockenmasse
<i>C. aerofaciens</i>	<i>Collinsella aerofaciens</i>
<i>C. testosteroni</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>
CA	Cholsäure
CDCA	Chenodesoxycholsäure
CIP	<i>cleaning in place</i>
CMC	<i>critical micellar concentration</i>
CV	Säulenvolumen (<i>column volumes</i>)
DHCA	Dehydrocholsäure
Dibac ₃ [3]	bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)-Trimethinoxonol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FDH	Formiatdehydrogenase
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
G6PDH	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
GDH	Glucosedehydrogenase
Glc	Glucose
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSDH	Hydroxysteroiddehydrogenase
IMAC	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
ISM	iterative Sättigungsmutagenese
ITB	Institut für Technische Biologie
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>

IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KPi	Kaliumphosphat
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDR	<i>long chain dehydrogenase / reductase</i>
<i>M. vaccae</i>	<i>Mycobacterium vaccae</i>
MDR	<i>medium chain dehydrogenase / reductase</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasenkettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PTDH	Phosphitdehydrogenase
RNA	Ribonukleinsäure
SDR	<i>short chain dehydrogenase / reductase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIP	<i>sterilization in place</i>
TB	<i>terrific broth</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	Spurenelementlösung (<i>trace element solution</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
TTN	<i>total turnover number</i>
UCSF	<i>University of California in San Francisco</i>
UDCA	Ursodesoxycholsäure
USD	US Dollar
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent auf Volumen bezogen (1 % = 10 g L ⁻¹)

A Allgemeines Material

A.1 Geräte

Allgemeine Geräte:

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Explorer 10 mg-210 g	Ohaus, Gießen
Analysenwaage, Explorer 5 g-32 kg	Ohaus, Gießen
Analysenwaage, Extend	Satorius, Göttingen
Büchnertrichter, Rotilabo 156 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Durchflussscytometer CyFlow SL	Partec, Münster, Germany
Eismaschine AF80	Scotsman, Mailand, Italien
Elektrophorese-Stromquelle E 802	Consort, Turnhout, Belgien
Elektrophorese-Stromquelle peqPower 300	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektroporationsgerät, Gene Pulser XCell	BioRad, München
Flachbettscanner	Hewlett-Packard, Böblingen
Gefrierschrank, -20° C	Liebherr, Biberach an der Riss
Gefrierschrank, -80 °C	GFL, Hamburg
Gel iX Imager INTAS	Science Imaging Instruments, Göttingen
Heizblock, Standard Heatblock	VWR, Darmstadt
Hochdruckhomogenisators Ariete	GEA Niro Soavi, Lübeck
Kompaktschüttler KS 15	Bühler, Hechingen
Kühlbrutschrank KB 400	Binder, Tuttlingen
Küvetten-Photometer, Biomate	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Küvetten-Photometer, Genesys 10S	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer Variomag Monotherm	Variomag, USA
Mehrfachrührplatte Multipoint 15	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Mehrfachrührplatte Variomag Poly 15	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Mehrkanalpipetten Transferpette electronic 10 µL - 200 µL	Brand, Wertheim
Membran-Vakuumpumpe Laboport	KnfLab, Trenton, New Jersey, USA
Midi-Gellaufapparatur MGU 402T	C.B.S. Scientific, Del Mar, USA
Mikrotiterplatten-Inkubator Shaker DTS-2	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Mikrotiterplatten-Photometer, EL 808	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Mikrotiterplatten-Photometer, Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikrotiterplatten-Photometer, Multiskan FC	Thermo Scientific, Rockford, USA
Mikrowelle	BOSCH, Stuttgart
pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott, Mainz
pH-Meter CG 843	Schott, Mainz
pH-Meter, Checker	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten 2,5 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 20 µL, 200 µL, 1000 µL, 10 mL	Brand, Wertheim
Rührplatte für Tank, Magnet	2mag, München
Saugflasche, 2 L	Schott, Mainz

Schüttelinkubator Multitron	Infors, Bottmingen, Schweiz
Schüttelinkubator WiseCube	witeg Labortechnik GmbH, Wertheim
Schwingmühle, MM 200	Retsch, Haan
SDS-Gelelektrophorese-Kammer	OWI, Portsmouth, USA
SDS-Gelelektrophorese-Kammer	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen
Sterilbank, Variolab, Mobilion W90	Waldner Electronics, Wangen
Tank 200 L	Rütten Engineering, Tagelswangen, Schweiz
Tellerseparator CSA 08	GEA Westfalia, Oelde
Thermocycler, Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler, MJMini	BioRad, München
Thermomixer, confort	Eppendorf, Hamburg
Thermoshaker, RiO	QUANTIFOIL Instruments, Jena
Tischzentrifuge, Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Trockenschrank E 28	Binder, Tuttlingen
Verbindungsstück Vakuumpumpe und Saugflasche:	Duran group, Mainz
Kunststoff-Olive gerade	
Vortexer, Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Vortexer, REAX top	Heidolph, Kelheim
Wasserbad Typ 1002	GFL, Hannover
Wasserbad W15 C15	Thermo Haake, Karlsruhe
White/2UV Transilluminator	UVP, Upland, USA
Wippe	Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Garching
Zentrifuge, Biofuge Stratos	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Bioreaktorsysteme:

Gerät	Hersteller
6-Blatt-Scheibenrührer	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Bioreaktor, 75 L, LP75L	Bioengineering AG, Wald, Schweiz
Kontrolleinheit	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Rührkesselreaktorsystem	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Labfors-Reaktor, 1,2 L	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Software Iris-NT Pro Version 4.11	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Bioreaktor Labfors	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Labfors-Reaktor, 7,5 L	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Easy Load Masterflex L/S 7518-00	Isamtec SA, Glattbrugg, Schweiz
Schlauchpumpe ISM 444	Isamtec SA, Glattbrugg, Schweiz
Schlauchpumpe Periplex W1	Bioengineering AG, Wald, Schweiz
Schlauchpumpe Periplex W2	Bioengineering AG, Wald, Schweiz
pH-Elektrode 405-DPAS-SC-K8S/150	Mettler-Toledo, Gießen
pH-Elektrode 405-DPAS-SC-K8S/325	Mettler-Toledo, Gießen
pO ₂ -Elektrode InPro 6000	Mettler-Toledo, Gießen
pO ₂ -Elektrode InPro 6800	Mettler-Toledo, Gießen
Zulauf-Waage Scout Pro	Ohaus, Pine Brook, USA
Reaktorwaage QC35EDE-S	Sartorius, Göttingen

FPLC-Systeme und Chromatographiesäulen(-materialien):

Gerät	Hersteller
Chromatographiesäule ECO Plus, Durchmesser: 50 mm	Kronlab, Dinslaken
Chromatographie-System, ÄKTA pilot	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
GradiFrac FPLC-Einheit	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

HisTrap FF crude Säulen, 1 mL und 5 mL	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
IV-7 Ventil	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Pumpe P50	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Säulenmaterial Ni-Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
UV-Spectrophotometer LKB Uvicord S II 280 nm	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Filter	

HPLC-Systeme und Chromatographiesäulen:

Gerät	Hersteller
HPLC Autosampler, Finnigan Surveyor Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPLC LC Pumpe, Finnigan Surveyor Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPLC PDA Detektor, Finnigan Surveyor Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPLC RI Detektor, Finnigan Surveyor Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPLC Säule, Hibar 125-4 Purospher RP-18e (5 µm)	Merck, Darmstadt
Sterilfilter Mini Kleenpak Supor® EAV 0,2 µm	Pall, Fribourg, Schweiz

Querstromfiltrationssystem und Filterkassetten:

Gerät	Hersteller
Cross-Flow-Filtration, SartoJet Membran Pumpe 17521-110	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Filterkassette, Sartoco Slice Cassette Hydrosart 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Filterkassette, Sartoco Slice Cassette Hydrosart 10 kDa	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Filterkassettenhalter Sartoco-Slice 17521	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen

A.2 Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	Hersteller	Produktnummer
12-Keto-Chenodesoxycholsäure	unb.	PharmaZell	–
12-Keto-Ursodesoxycholsäure	unb.	PharmaZell	–
3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure	unb.	PharmaZell	–
7,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure	unb.	PharmaZell	–
Acetonitril	HPLC Ultra Gradient grade	J.T. Baker	9017
Agar-Agar	unb.	Carl Roth	5210
Agarose NEE0	DNA-Grad	Carl Roth	2267
Ammoniak, 25 %	≥ 25 %	Carl Roth	5460
Ammoniumchlorid	≥ 99,0 %	Carl Roth	5470
Ammoniumeisen(III)-citrat	unb.	Merck	103762
Ammoniumformiat	≥ 95 %	Carl Roth	5093
di-Ammoniumhydrogencitrat	unb.	Merck	101155
di-Ammoniumhydrogenphosphat	≥ 97 %	Carl Roth	0268
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	≥ 98,0 %	Merck	103762
di-Ammoniumsulfat	≥ 99,5 %	Merck	101217
Ampicillin Natriumsalz	≥ 99,0 %	Carl Roth	K029
Antifoam 204	≥ 98,5 %	Sigma Aldrich	A6426

bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)-Trimethinonol (Dibac ₃ [3])	≥ 95 %	Sigma Aldrich	D8189
Bromphenolblau	ACS	Merck	108122
Calciumchlorid-Dihydrat	≥ 99,5 %	Merck	102382
Chloramphenicol	≥ 98,5 %	Carl Roth	3886
Cholsäure	≥ 99 %	New Zealand Pharmaceuticals	–
Citronensäure-Monohydrat	≥ 99,5 %	Carl Roth	5110
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	ACS	Merck	102539
Coomassie Blau G 250	unb.	Carl Roth	9598
Coomassie Blau R 250	unb.	Carl Roth	3862
Dehydrocholsäure	unb.	PharmaZell	–
Dehydrocholsäure-Natriumsalz	~95 %	Sigma Aldrich	D3875
D-Glucose, wasserfrei	ACS	Carl Roth	X997
D-Glukose-Monohydrat	≥ 98,5 %	Carl Roth	6780
Dimethylsulfoxid (DMSO)	≥ 99,8 %	Carl Roth	4720
1,4-Dithiothreitol (DTT)	≥ 99,0 %	Merck	111474
Ethylendiamin-tetraessigsäure(EDTA)- Dinatriumsalz-Dihydrat	≥ 99,0 %	Merck	108418
Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat	ACS	Merck	103943
Essigsäure	≥ 99,8 %	Merck	100056
Ethanol	≥ 99,5 %	Carl Roth	5054
Ethidiumbromid	≥ 98 %	Carl Roth	7870
Glycerin	≥ 98,0 %	Carl Roth	7530
Glycerin	≥ 86 %	Carl Roth	4043
Hefeextrakt OHLY KAT	unb.	Dt. Hefewerke	–
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- ethansulfonsäure (HEPES)	≥ 99,0 %	Merck	110110
Imidazol	≥ 99,0 %	Alfa Aesar	A10221
Isopropanol	≥ 99,5 %	Carl Roth	9866
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	≥ 99 %	Carl Roth	2316
Kaliumacetat	Ph. Eur.	Merck	104820
di-Kaliumhydrogenphosphat	≥ 99,0 %	Carl Roth	P749
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99,0 %	Carl Roth	3907
Kaliumhydroxid	≥ 85 %	Carl Roth	6751
Kanamycinsulfat	≥ 750 I.U./mg	Carl Roth	T832
Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat	≥ 99,0 %	Merck	102790
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	≥ 99,5 %	Merck	105886
Mangan(II)-Chlorid-Tetrahydrat	≥ 99,0 %	Merck	105927
Mangan(II)-Sulfat-Monohydrat	≥ 98,0 %	Merck	105941
2-Morpholinoethansulfonsäure-H ₂ O (MES)	≥ 99,0 %	Merck	106126
β-Mercaptoethanol	≥ 99,0 %	Merck	115433
Methanol	HPLC grade	J.T. Baker	9093
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	≥ 99,0 %	Carl Roth	6979
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	≥ 99,0 %	Carl Roth	2367
NAD	~98 %	Carl Roth	AE11
NADH-Dinatriumsalz	≥ 98,0 %	Carl Roth	AE12
NADP-Dinatriumsalz	≥ 97 %	Carl Roth	AE13
NADPH-Tetranatriumsalz	≥ 97,0 %	Carl Roth	AE14
Natriumchlorid	≥ 99,0 %	Carl Roth	P029
Natriumcitrat	≥ 99,5 %	Fluka	71497
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	≥ 99,0 %	Merck	106346
di-Natriumhydrogenphosphat	≥ 99,0 %	Merck	106586
Natriumdodecylsulfat (SDS)	≥ 85,0 %	Merck	817034
Natriumformiat	≥ 98,0 %	Fluka	71540

Natriumhydroxid	≥ 99,0 %	Carl Roth	9356
Novobiocin-Natriumsalz	≥ 90 %	Sigma Aldrich	N1628
ortho-Phosphorsäure 85,0 %	pro analysi	Merck	100563
Pepton aus Casein	unb.	Carl Roth	8986.1
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	≥ 99,0 %	Carl Roth	6367
Roti-Blue 5x	unb.	Carl Roth	A152
Rotiphorese® 10X SDS-PAGE	unb.	Carl Roth	3060
Rotiphorese® Gel 40 (19:1)	unb.	Carl Roth	3030
Roti-Safe GelStain	unb.	Carl Roth	3865
Rubidiumchlorid	≥ 99,9	Sigma-Aldrich	R2252
Salzsäure 32,0 %	pro analysi	Merck	100319
Tetracyclin-Hydrochlorid	≥ 90 %	Carl Roth	0237
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	≥ 99,9 %	Carl Roth	4855
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)	≥ 99,0 %	Carl Roth	9090
Zinksulfat-Heptahydrat	≥ 99,5 %	Merck	108883

A.3 Enzyme

Enzym	Hersteller	Produktnummer
DNase I	Sigma Aldrich	D4527
Lysozym	Sigma Aldrich	L6876
<i>Phusion</i> High-Fidelity PCR-Polymerase	New England Biolabs	M0530
<i>Phusion</i> Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific	F-537
Restriktionsenzym <i>BspI</i>	New England Biolabs	R0585
Restriktionsenzym <i>DpnI</i>	New England Biolabs	R0176
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	New England Biolabs	R0101
Restriktionsenzym <i>HindIII</i> -HF	New England Biolabs	R3104
Restriktionsenzym <i>KpnI</i> -HF	New England Biolabs	R3142
Restriktionsenzym <i>NcoI</i> -HF	New England Biolabs	R3193
Restriktionsenzym <i>NdeI</i>	New England Biolabs	R0111
Restriktionsenzym <i>NotI</i> -HF	New England Biolabs	R3189
Restriktionsenzym <i>XbaI</i>	New England Biolabs	R0145
Restriktionsenzym <i>XhoI</i>	New England Biolabs	R0146
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs	M0202
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs	M0267

A.4 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96 Well Optical Bottom Plates	Nunc, Wiesbaden
DeepWell-Platten, 2 mL	Nunc, Wiesbaden
Filterpapier, Durchmesser 150 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Glasperlen, Durchmesser: 0,25-0,50 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Glaswaren	Schott, Mainz
HisPur™ Ni-NTA Resin Spin Columns, 3 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPLC-Vials	VWR, Darmstadt

Kreuzmagnetührstäbchen, Durchmesser: 10 mm	VWR, Darmstadt
Kreuzmagnetührstäbchen, Durchmesser: 20 mm	VWR, Darmstadt
Küvetten, Kunststoff	Ratiolab, Dreieich
Küvetten, Quartz	Hellma Analytics, Mühlheim
Parafilm	Pechinery, Wisconsin, USA
Petrischalen	Starlab, Helsinki, Finnland
Reaktionsgefäße (0,2 mL und 0,5 mL)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 mL und 2 mL)	neoLab, Heidelberg
Reaktionsgefäße (15 mL und 50 mL)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Spritzenfilter Sterilfilter (0,2 µm)	Millipore, Molsheim, Frankreich
Verschlussfolie für Mikrotiterplatten, Breathe Easy	Diversified Biotech, Dedham, USA
Vivaspin 20 mL Zentrifugalkonzentrator, Größenausschlussgrenze 10 kDa	Sartorius, Göttingen

A.5 Standards und Kits

Standard / Kit	Hersteller	Produktnummer
100 bp DNA-ladder extended	Carl Roth	T835
Bicinchonin-Säure (bicinchoninic acid, BCA), Protein Assay Kit	Pierce	23227
Desoxynukleotid (dNTP)-Mix	New England Biolabs	N0447S
GenElute Gel Extraction Kit	Sigma Aldrich	NA1111
GenElute HP Plasmid Miniprep Kit	Sigma Aldrich	PLN70
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma Aldrich	NA1020
HisPur Ni-NTA Spin Columns, 3mL	Pierce	88226
Perfect Protein Marker, 10-225 kDa	Novagen	69079-3
Quick Ligation Kit	New England Biolabs	M2200
Roti-Mark Standard	Carl Roth	T851

A.6 Oligonukleotide

Klonierungsprimer:

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
3alpha fwd EcoRI FDHStop	GAATTCGTGAAAGGAGATATACATGTCCATCATCGTGATAAGCGG
3alpha fwd HindIII	CCCAAGCTTAAGGAGATATACATGTCCATCATCGTGATAAGCG
3alpha fwd NdeI	GGAATTCATATGTCCATCATCGTGATAAGCGG
3alpha rev HindIII	CCCAAGCTTTCAGAACTGTGTCTGGGCGC
3alpha rev KpnI	CGGGGTACCTCAGAACTGTGTCTGGGCGC
3alpha rev NotI	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGAACTGTGTCTGGGCGC
7beta fwd EcoRI FDHStop	GCGAATTCGTGAAAGGAGATATACATGAACCTGAGGGAGAAGTACCG
7beta fwd NdeI	GGAATTCATATGAACCTGAGGGAGAAGTACG
7beta rev HindIII	CCCAAGCTTCTAGTCGCGGTAGAACGA
7beta rev NotI	ATAAGAATGCGGCCGCTAGTCGCGGTAGAACGACC
bsGDH 3' rev	GGAAGGCCAGTTCAGCAGTTTACCTTTGTTGCC
bsGDH 5' fwd	GCCGCCCGCGTATTCTTAGGAATCGCC

bsGDH fwd NcoI	CATGCCATGGGTATGTATCCGGATTTAAAAGGAAAAGTCG TC
bsGDH fwd NdeI	GGGATTCCATATGTATCCGGATTTAAAAGGAAAAGTCGTC
bsGDH fwd rbs NotI	AAGGAAAAAAGCGGCCGCAAGGAGATATACATGTATCCGG ATTTAAAAGGAAAAGTCGTC
bsGDH rev EcoRI	GGAATTCTTAACCGCGGCCTGCCTGG
bsGDH rev XhoI	CCGCTCGAGTTAACCGCGGCCTGCCTGG
FDH fwd HindIII	CCCAAGCTTAAGGAGATATATATGGCAAAGGTCCTGTGCG TTCTT
FDH fwd NcoI	CATGCCATGGCAAAGGTCCTGTGCGTTCTT
FDH fwd NdeI	GGGTTTCATATGGCAAAGGTCCTGTGCG
FDH rev EcoRI	CCGGAATTCTCAGACCGCCTTCTTGAACCTTG
FDH rev HindIII	CCCAAGCTTTCAGACCGCCTTCTTGAACCTTGGC
FDH rev KpnI	CGGGGTACCTCAGACCGCCTTCTTGAACCTTG
FDH rev NotI	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGACCGCCTTCTTGAACCTTG
pCOLA fwd XbaI	CCGTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGG
pCOLA MCS1end fwd HindIII	CCCAAGCTTATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAG
pCOLA MCS1end fwd NotI	ATAAGAATGCGGCCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAG

Mutageneseprimer:

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
7beta mut G39A fwd	CGTCGTCATGGTTCGCCCCGTCGCGAGG
7beta mut G39A rev	CCTCGCGACGGGCGACCATGACGACG
7beta mut G39D fwd	CGTCGTCATGGTTCGACCGTCGCGAGG
7beta mut G39D rev	CCTCGCGACGGTTCGACCATGACGACG
7beta mut G39S fwd	CGTCGTCATGGTTCAGCCGTCGCGAGG
7beta mut G39S rev	CCTCGCGACGGCTGACCATGACGACG
7beta mut G39D R40A fwd	CGTCGTCATGGTTCGACGCGCGCGAGG
7beta mut G39D R40C fwd	CGTCGTCATGGTTCGACTGCCGCGAGG
7beta mut G39D R40D fwd	CGTCGTCATGGTTCGACGATCGCGAGG
7beta mut G39D R40E fwd	CGTCGTCATGGTTCGACGAACGCGAGG
7beta mut G39D R40F fwd	CGTCGTCATGGTTCGACTTTTCGCGAGG
7beta mut G39D R40G fwd	CGTCGTCATGGTTCGACGGCCGCGAGG
7beta mut G39D R40H fwd	CGTCGTCATGGTTCGACCATCGCGAGG
7beta mut G39D R40I fwd	CGTCGTCATGGTTCGACATTCGCGAGG
7beta mut G39D R40I rev	CGCGAATGTCGACCATGACGACG
7beta mut G39D R40K fwd	CGTCGTCATGGTTCGACAAACGCGAGG
7beta mut G39D R40L fwd	CGTCGTCATGGTTCGACCTGCGCGAGG
7beta mut G39D R40M fwd	CGTCGTCATGGTTCGACATGCGCGAGG
7beta mut G39D R40N fwd	CGTCGTCATGGTTCGACAACCGCGAGG
7beta mut G39D R40P fwd	CGTCGTCATGGTTCGACCCGCGCGAGG
7beta mut G39D R40Q fwd	CGTCGTCATGGTTCGACCAGCGCGAGG
7beta mut G39D R40S fwd	CGTCGTCATGGTTCGACAGCCGCGAGG
7beta mut G39D R40T fwd	CGTCGTCATGGTTCGACACCCGCGAGG
7beta mut G39D R40V fwd	CGTCGTCATGGTTCGACGTTTCGCGAGG
7beta mut G39D R40W fwd	CGTCGTCATGGTTCGACTGGCGCGAGG
7beta mut G39D R40Y fwd	CGTCGTCATGGTTCGACTATCGCGAGG
7beta DF mut R41 NDT fwd	CGTCGTCATGGTTCGACTTTNDTGAGGAGAAGCTG
7beta DF mut R41 VMG fwd	CGTCGTCATGGTTCGACTTTVMGGAGGAGAAGCTG
7beta DF mut K44Q fwd	CGTCGTCATGGTTCGACTTTTCGCGAGGAGCAGCTG
7beta DF mut R41K fwd	CGTCGTCATGGTTCGACTTTAAAGAGGAGAAGCTG
7beta DFK mut K44NDT fwd	GTCGACTTTAAAGAGGAGNDTCTGAACGTGCTC
7beta DFK mut K44VMG fwd	GTCGACTTTAAAGAGGAGVMGCTGAACGTGCTC
AntiMid rev	CCGCCGCATCCATAACCGCCAGTTGTTTACCC

FDH mut G221D fwd

CCTGCACTACACCGACCGTCACCGCCTGC

Sonstige Primer:

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
7alpha KOcheck fwd	TTAATTGAGCTCCTGTACCCCACCACC
7alpha KOcheck rev	GTGTTTAAATTCTGACAACCTGAGACTCGAC
T7 fwd	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 term rev	CTAGTTATTGCTCAGCGGT

A.7 Medien und Puffer

Bezeichnung	Komponenten
LB-Medium	10 g L ⁻¹ NaCl, 10 g L ⁻¹ Pepton aus Casein, 5 g L ⁻¹ Hefeextrakt
TB-Medium	12 g L ⁻¹ Pepton aus Casein, 24 g L ⁻¹ Hefeextrakt, 0,4 % Glycerin (v/v), 2,13 g L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , 12,54 g L ⁻¹ K ₂ HPO ₄
Minimalmedium nach Wilms <i>et al.</i> (2001)	1,0 g L ⁻¹ Diammoniumhydrogencitrat, 2,0 g L ⁻¹ Na ₂ SO ₄ , 2,68 g L ⁻¹ (NH ₃) ₂ SO ₄ , 0,5 g L ⁻¹ NH ₃ Cl, 14,6 g L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ , 4,0 g L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O
Spurenelementlösung nach Wilms <i>et al.</i> (2001)	0,5 g L ⁻¹ CaCl ₂ , 0,18 g L ⁻¹ ZnSO ₄ x 7 H ₂ O, 0,10 g L ⁻¹ MnSO ₄ x H ₂ O, 11,13 g L ⁻¹ Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O, 13,9 g L ⁻¹ FeCl ₃ x 6 H ₂ O, 0,16 g L ⁻¹ CuSO ₄ x 5 H ₂ O, 0,18 g L ⁻¹ CoCl ₂ x 6 H ₂ O
Induktionslösung für <i>E. coli</i> -Bibliotheken	12 g L ⁻¹ Pepton aus Casein, 24 g L ⁻¹ Hefeextrakt, 0,4 % Glycerin (v/v), 2,13 g L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , 12,54 g L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ , 7 mM IPTG
Aufschlusspuffer für <i>E. coli</i> -Bibliotheken	50 mM Kaliumphosphat, 10 mM MgCl ₂ , 70 kU mL ⁻¹ Lysozym, 50 U mL ⁻¹ DNaseI, pH 7,5
TFB1-Medium	30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8
TFB2-Medium	10 mM 3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl ₂ , 15 % (v/v) Glycerin, pH 6,5
HisTrap-Bindepuffer	50 mM Natriumphosphat, 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4 für GDH zusätzlich: 20 % Glycerin(v/v)
HisTrap-Elutionspuffer	50 mM Natriumphosphat, 500 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4 für GDH zusätzlich: 20 % Glycerin(v/v)
HisPur-Äquilibrierungspuffer	20 mM Natriumphosphat, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, pH 7,4
HisPur-Bindepuffer	20 mM Natriumphosphat, 25 mM Imidazol, 300 mM NaCl, pH 7,4
HisPur-Elutionspuffer	20 mM Natriumphosphat, 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, pH 7,4
SDS-Sammelgelpuffer, 2x	250 mM Tris-HCl, 0,4 % SDS (w/v), pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer, 4x	1,5 M Tris-HCl, 0,8 % SDS (w/v), pH 8,8
Laemmlipuffer, 5x	300 mM Tris-HCl, 50 % Glycerin (v/v), 10 % SDS (w/v), 5 % β-Mercaptoethanol (v/v), 0,05 % Bromphenolblau (w/v), pH 6,8
Fairbanks A	25 % Isopropanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v), 0,05 % Coomassie Brilliant Blau R250 (w/v)
Fairbanks B	10 % Isopropanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v), 0,005 % Coomassie Brilliant Blau R250 (w/v)
Fairbanks C	10 % Essigsäure (v/v)
TAE-Puffer, 10x	400 mM Tris, 10 mM EDTA, 1,14 % Eisessig (v/v), pH 8,0

B Herleitungen von Geschwindigkeitsreaktionen

B.1 Ordered bi-bi-Mechanismus mit EBQ-Substratinhibition

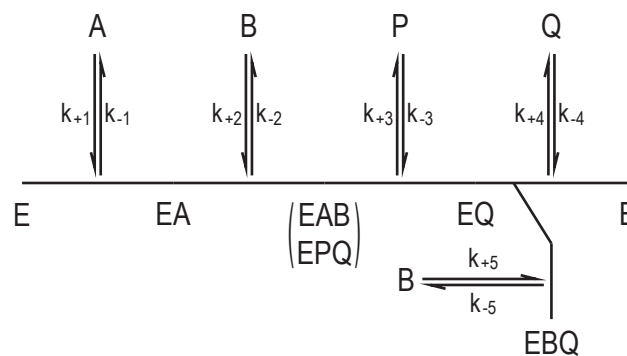
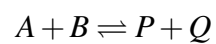
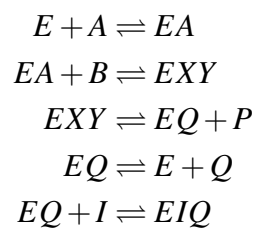


Abbildung B.1: Schema eines ordered bi-bi-Mechanismus mit EBQ-Substratinhibierung.

Zunächst wird folgende Gesamtreaktion definiert:



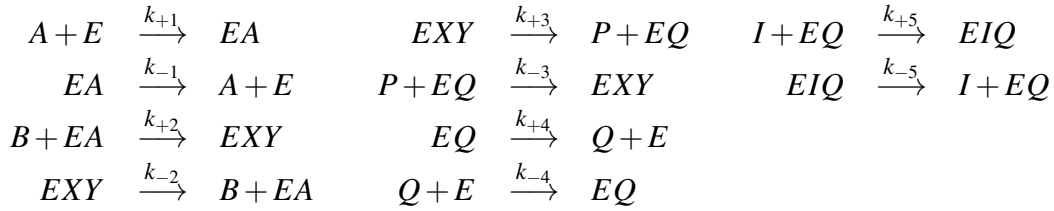
Die Einzelreaktionen sind wie folgt:



Dabei existieren folgende Enzymformen:



Die Geschwindigkeitskonstanten werden wie folgt definiert:



Die Geschwindigkeitsgleichung nach Durchlaufen des King-Altman-Verfahrens ist wie folgt:

$$v = \frac{Num_1[A][B] - Num_2[P][Q]}{Const + Coef_A[A] + Coef_B[B] + Coef_P[P] + Coef_Q[Q] + Coef_{AB}[A][B] + Coef_{AP}[A][P] + Coef_{BQ}[B][Q] + Coef_{PQ}[P][Q] + Coef_{QI}[Q][I] + Coef_{ABP}[A][B][P] + Coef_{BPQ}[B][P][Q] + Coef_{ABI}[A][B][I] + Coef_{BQI}[B][Q][I]} \quad (B.1)$$

mit:

$$\begin{array}{ll}
 Num_1 & = k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5} \\
 Num_2 & = k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5} \\
 Const & = k_{-1}k_{+4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3}) \\
 Coef_A & = k_{+1}k_{+4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3}) \\
 Coef_B & = k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5} \\
 Coef_P & = k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5} \\
 Coef_Q & = k_{-1}k_{-4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3}) \\
 Coef_{AB} & = k_{+1}k_{+2}k_{-5}(k_{+3} + k_{+4}) \\
 Coef_{AP} & = k_{+1}k_{-2}k_{-3}k_{-5} \\
 Coef_{BQ} & = k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{-5} \\
 Coef_{PQ} & = k_{-3}k_{-4}k_{-5}(k_{-1} + k_{-2}) \\
 Coef_{QI} & = k_{-1}k_{-4}k_{+5}(k_{-2} + k_{+3}) \\
 Coef_{ABP} & = k_{+1}k_{+2}k_{-3}k_{-5} \\
 Coef_{BPQ} & = k_{+2}k_{-3}k_{-4}k_{-5} \\
 Coef_{ABI} & = k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+5} \\
 Coef_{BQI} & = k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{+5}
 \end{array}$$

Durch Division von Zähler und Nenner durch k_{-5} verändern sich die Koeffizienten wie folgt:

$$\begin{array}{ll}
 Num_1 & = k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4} \\
 Num_2 & = k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4} \\
 Const & = k_{-1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3}) \\
 Coef_A & = k_{+1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3}) \\
 Coef_B & = k_{+2}k_{+3}k_{+4} \\
 Coef_P & = k_{-1}k_{-2}k_{-3} \\
 Coef_Q & = k_{-1}k_{-4}(k_{-2} + k_{+3}) \\
 Coef_{AB} & = k_{+1}k_{+2}(k_{+3} + k_{+4}) \\
 Coef_{AP} & = k_{+1}k_{-2}k_{-3} \\
 Coef_{BQ} & = k_{+2}k_{+3}k_{-4} \\
 Coef_{PQ} & = k_{-3}k_{-4}(k_{-1} + k_{-2}) \\
 Coef_{QI} & = k_{-1}k_{-4}(k_{+5}/k_{-5})(k_{-2} + k_{+3}) \\
 Coef_{ABP} & = k_{+1}k_{+2}k_{-3} \\
 Coef_{BPQ} & = k_{+2}k_{-3}k_{-4} \\
 Coef_{ABI} & = k_{+1}k_{+2}k_{+3}(k_{+5}/k_{-5}) \\
 Coef_{BQI} & = k_{+2}k_{+3}k_{-4}(k_{+5}/k_{-5})
 \end{array}$$

Durch Substitution von $[I]$ mit $[B]$ und Umstellung des Nenners ergibt sich folgende Geschwindigkeitsgleichung:

$$v = \frac{Num_1[A][B] - Num_2[P][Q]}{Const + Coef_A[A] + Coef_B[B] + Coef_P[P] + Coef_Q[Q] \left(1 + \frac{k_{+5}}{k_{-5}}[B]\right) + Coef_{AB}[A][B] \left(1 + \frac{k_{+3}k_{+5}}{(k_{+3}+k_{+4})k_{-5}}[B]\right) + Coef_{AP}[A][P] + Coef_{BQ}[B][Q] \left(1 + \frac{k_{+5}}{k_{-5}}[B]\right) + Coef_{PQ}[P][Q] + Coef_{ABP}[A][B][P] + Coef_{BPQ}[B][P][Q]} \quad (B.2)$$

mit:

$$\begin{array}{ll} Num_1 & = k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4} & Coef_{AB} & = k_{+1}k_{+2}(k_{+3} + k_{+4}) \\ Num_2 & = k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4} & Coef_{AP} & = k_{+1}k_{-2}k_{-3} \\ Const & = k_{-1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3}) & Coef_{BQ} & = k_{+2}k_{+3}k_{-4} \\ Coef_A & = k_{+1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3}) & Coef_{PQ} & = k_{-3}k_{-4}(k_{-1} + k_{-2}) \\ Coef_B & = k_{+2}k_{+3}k_{+4} & Coef_{ABP} & = k_{+1}k_{+2}k_{-3} \\ Coef_P & = k_{-1}k_{-2}k_{-3} & Coef_{BPQ} & = k_{+2}k_{-3}k_{-4} \\ Coef_Q & = k_{-1}k_{-4}(k_{-2} + k_{+3}) & & \end{array}$$

Die Koeffizienten sind hierbei identisch zum ordered bi-bi-Mechanismus. Damit lässt sich die Gleichung auch mit kinetischen Konstanten gemäß Cleland-Definition (vgl. Tabelle 3.5) darstellen:

$$v = \frac{V_1V_2[A][B] - \frac{V_1V_2}{K_{eq}}[P][Q]}{K_{ia}K_{mB}V_2 + K_{mB}V_2[A] + K_{mA}V_2[B] + \frac{V_1K_{mQ}}{K_{eq}}[P] + \frac{V_1K_{mP}}{K_{eq}}[Q] \left(1 + \frac{[B]}{K_{ii}}\right) + V_2[A][B] \left(1 + \frac{[B]}{K_{ml}}\right) + \frac{V_1K_{mQ}}{K_{eq}K_{ia}}[A][P] + \frac{K_{mA}V_2}{K_{iq}}[B][Q] \left(1 + \frac{[B]}{K_{ii}}\right) + \frac{V_1}{K_{eq}}[P][Q] + \frac{V_2}{K_{ip}}[A][B][P] + \frac{V_1}{K_{eq}K_{ib}}[B][P][Q]} \quad (B.3)$$

Hierbei müssen zusätzlich folgende zwei Inhibitionskonstanten definiert werden:

$$K_{ml} = \frac{Coef_{AB}}{Coef_{ABI}} = \frac{(k_{+3} + k_{+4})k_{-5}}{k_{+3}k_{+5}} \quad (B.4)$$

$$K_{ii} = \frac{\text{Coef}_Q}{\text{Coef}_I} = \frac{\text{Coef}_{BQ}}{\text{Coef}_{BQI}} = \frac{k_{-5}}{k_{+5}} \quad (\text{B.5})$$

Wobei folgendes gilt:

$$K_{ml} = \frac{k_{+3} + k_{+4}}{k_{+3}} \cdot K_{ii} = \frac{K_{iq}V_2}{K_{mQ}V_1} \cdot K_{ii} \quad (\text{B.6})$$

B.2 Mechanismus der HSDH mit konkurrierenden Gallensalzen

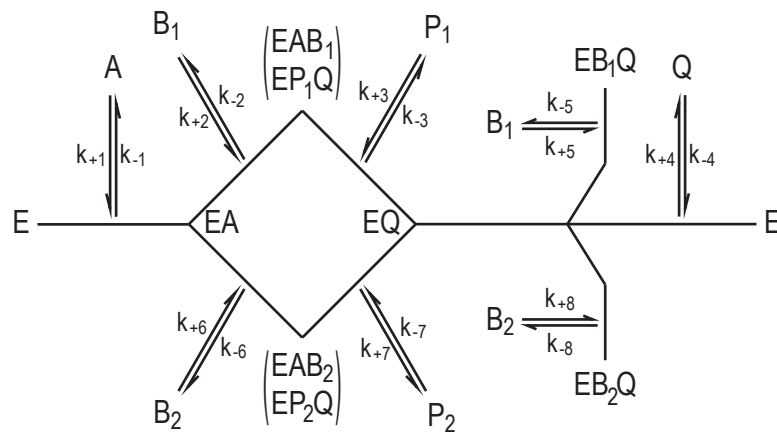
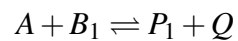
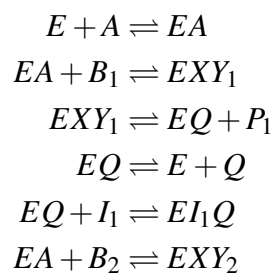


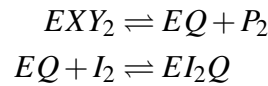
Abbildung B.2: Schema eines ordered bi-bi-Mechanismus mit konkurrierenden zweitbindenden Substraten und EBQ-Substratinhibierung.

Zunächst wird folgende Gesamtreaktion definiert:

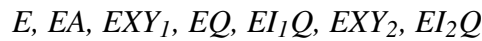


Die Einzelreaktionen sind wie folgt:

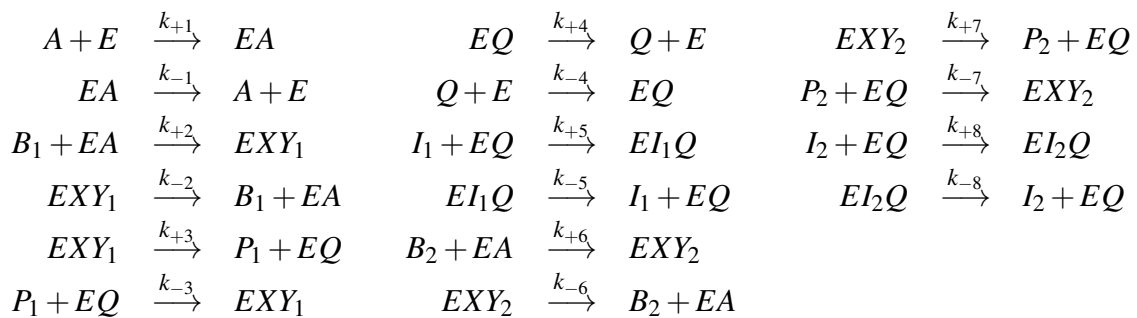




Dabei existieren folgende Enzymformen:



Die Geschwindigkeitskonstanten werden wie folgt definiert:



Die Geschwindigkeitsgleichung nach Durchlaufen des King-Altman-Verfahrens ist wie folgt:

$$v = \frac{d[P_1]}{dt} = \frac{-n_1[P_1][Q][B_2] + n_2[B_1][Q][P_2] - n_3[A][P_1][B_2] + n_4[A][B_1][P_2] - n_5[P_1][Q] + n_6[A][B_1]}{+d_1[Q][B_2][P_2] + d_2[Q][I_2][B_2] + d_3[Q][I_1][B_2] + d_4[P_1][Q][B_2] + d_5[B_1][Q][P_2] + d_6[B_1][Q][I_2] + d_7[B_1][Q][I_1] + d_8[B_1][P_1][Q] + d_9[A][B_2][P_2] + d_{10}[A][I_2][B_2] + d_{11}[A][I_1][B_2] + d_{12}[A][P_1][B_2] + d_{13}[A][B_1][P_2] + d_{14}[A][B_1][I_2] + d_{15}[A][B_1][I_1] + d_{16}[A][B_1][P_1] + d_{17}[Q][P_2] + d_{18}[Q][B_2] + d_{19}[Q][I_2] + d_{20}[Q][I_1] + d_{21}[P_1][Q] + d_{22}[B_1][Q] + d_{23}[A][P_2] + d_{24}[A][B_2] + d_{25}[A][P_1] + d_{26}[A][B_1] + d_{27}[P_2] + d_{28}[B_2] + d_{29}[Q] + d_{30}[P_1] + d_{31}[B_1] + d_{32}[A] + d_{33}} \quad (\text{B.7})$$

mit:

$$\begin{aligned} n_1 &= k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{+6}k_{+7}k_{-8} \\ n_2 &= k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{-7}k_{-8} \\ n_3 &= k_{+1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{+6}k_{+7}k_{-8} \\ n_4 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{-5}k_{-6}k_{-7}k_{-8} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
n_5 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
n_6 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_1 &= (k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5}k_{-7}k_{+6}k_{-8} \\
d_2 &= k_{+6}k_{+7}k_{+8}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5} \\
d_3 &= k_{+5}k_{+6}k_{+7}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-8} \\
d_4 &= k_{+6}(k_{-2} + k_{+7})k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{-8} \\
d_5 &= k_{+2}k_{-4}k_{-5}(k_{-6} + k_{+3})k_{-7}k_{-8} \\
d_6 &= k_{+2}k_{+3}k_{+8}k_{-4}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7}) \\
d_7 &= k_{+2}k_{+3}k_{+5}k_{-4}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_8 &= k_{+2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_9 &= k_{+1}k_{+6}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}k_{-7}k_{-8} \\
d_{10} &= k_{+1}k_{+6}k_{+7}k_{+8}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
d_{11} &= k_{+1}k_{+5}k_{+6}k_{+7}(k_{-2} + k_{+3})k_{-8} \\
d_{12} &= k_{+1}k_{+6}(k_{-2} + k_{+7})k_{-3}k_{-5}k_{-8} \\
d_{13} &= k_{+1}k_{+2}k_{-5}(k_{-6} + k_{+3})k_{-7}k_{-8} \\
d_{14} &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+8}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7}) \\
d_{15} &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_{16} &= k_{+1}k_{+2}k_{-3}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_{17} &= (k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5}(k_{-6} + k_{-1})k_{-7}k_{-8} \\
d_{18} &= k_{+6}k_{+7}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5}k_{-8} \\
d_{19} &= k_{+8}k_{-1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7}) \\
d_{20} &= k_{+5}k_{-1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_{21} &= (k_{-2} + k_{-1})k_{-3}k_{-4}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_{22} &= k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_{23} &= k_{+1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}k_{-6}k_{-7}k_{-8} \\
d_{24} &= k_{+1}k_{+6}(k_{+7} + k_{+4})(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}k_{-8} \\
d_{25} &= k_{+1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_{26} &= k_{+1}k_{+2}(k_{+4} + k_{+3})k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_{27} &= k_{-1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}k_{-6}k_{-7}k_{-8} \\
d_{28} &= (k_{-2} + k_{+3})k_{+4}k_{-5}k_{+6}k_{+7}k_{-8} \\
d_{29} &= k_{-1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_{30} &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_{31} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_{32} &= k_{+1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8} \\
d_{33} &= k_{+4}k_{-1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}(k_{-6} + k_{+7})k_{-8}
\end{aligned}$$

Mit der Annahme, dass nicht zwischen B_1 und B_2 bzw. zwischen P_1 und P_2 oder zwischen I_1 und I_2 unterschieden wird, gilt folgendes:

$$k_{+2} = k_{+6}$$

$$k_{-2} = k_{-6}$$

$$k_{+3} = k_{+7}$$

$$k_{-3} = k_{-7}$$

$$k_{+5} = k_{+8}$$

$$k_{-5} = k_{-8}$$

Somit gilt für die Koeffizienten:

$$\begin{aligned}
 n_1 &= k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{+2}k_{+3}k_{-5} \\
 n_2 &= k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{-5}k_{-2}k_{-3}k_{-5} \\
 n_3 &= k_{+1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{+2}k_{+3}k_{-5} \\
 n_4 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{-5}k_{-2}k_{-3}k_{-5} \\
 n_5 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 n_6 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 d_1 &= (k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5}k_{-3}k_{+2}k_{-5} \\
 d_2 &= k_{+2}k_{+3}k_{+5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5} \\
 d_3 &= k_{+5}k_{+2}k_{+3}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5} \\
 d_4 &= k_{+2}(k_{-2} + k_{+3})k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{-5} \\
 d_5 &= k_{+2}k_{-4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-3}k_{-5} \\
 d_6 &= k_{+2}k_{+3}k_{+5}k_{-4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3}) \\
 d_7 &= k_{+2}k_{+3}k_{+5}k_{-4}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 d_8 &= k_{+2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 d_9 &= k_{+1}k_{+2}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}k_{-3}k_{-5} \\
 d_{10} &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 d_{11} &= k_{+1}k_{+5}k_{+2}k_{+3}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 d_{12} &= k_{+1}k_{+2}(k_{-2} + k_{+3})k_{-3}k_{-5}k_{-5} \\
 d_{13} &= k_{+1}k_{+2}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-3}k_{-5} \\
 d_{14} &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+5}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3}) \\
 d_{15} &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 d_{16} &= k_{+1}k_{+2}k_{-3}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 d_{17} &= (k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5}(k_{-2} + k_{-1})k_{-3}k_{-5} \\
 d_{18} &= k_{+2}k_{+3}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5}k_{-5} \\
 d_{19} &= k_{+5}k_{-1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3}) \\
 d_{20} &= k_{+5}k_{-1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 d_{21} &= (k_{-2} + k_{-1})k_{-3}k_{-4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 d_{22} &= k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 d_{23} &= k_{+1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}k_{-2}k_{-3}k_{-5} \\
 d_{24} &= k_{+1}k_{+2}(k_{+3} + k_{+4})(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}k_{-5} \\
 d_{25} &= k_{+1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 d_{26} &= k_{+1}k_{+2}(k_{+4} + k_{+3})k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
 d_{27} &= k_{-1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}k_{-2}k_{-3}k_{-5} \\
 d_{28} &= (k_{-2} + k_{+3})k_{+4}k_{-5}k_{+2}k_{+3}k_{-5}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
d_{29} &= k_{-1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
d_{30} &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
d_{31} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
d_{32} &= k_{+1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5} \\
d_{33} &= k_{+4}k_{-1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}(k_{-2} + k_{+3})k_{-5}
\end{aligned}$$

Nach Kürzen von $(k_{-2} + k_{+3})(k_{-5})^2$ und Umformung des Nenners sowie Substitution von $[I_1]$ mit $[B_1]$ und $[I_2]$ mit $[B_2]$ ergibt sich folgende Geschwindigkeitsgleichung:

$$\begin{aligned}
v = \frac{d[P_1]}{dt} &= \frac{Num_1[A][B_1] - Num_2[P_1][Q] + \frac{k_{+2}k_{-2}k_{+3}k_{-3}}{k_{-2}+k_{+3}}(k_{+1}[A] + k_{-4}[Q])([B_1][P_2] - [B_2][P_1])}{Const + Coef_A[A] + Coef_B([B_1] + [B_2]) + Coef_P([P_1] + [P_2]) + Coef_Q[Q] \left(1 + \frac{k_{+5}}{k_{-5}}([B_1] + [B_2])\right) + Coef_{AB}[A]([B_1] + [B_2]) \left(1 + \frac{k_{+3}k_{+5}}{(k_{+3}+k_{+4})k_{-5}}([B_1] + [B_2])\right) + Coef_{AP}[A]([P_1] + [P_2]) + Coef_{BQ}([B_1] + [B_2])[Q] \left(1 + \frac{k_{+5}}{k_{-5}}([B_1] + [B_2])\right) + Coef_{PQ}([P_1] + [P_2])[Q] + Coef_{ABP}[A]([B_1] + [B_2])([P_1] + [P_2]) + Coef_{BPQ}([B_1] + [B_2])([P_1] + [P_2])[Q]} \quad (B.8)
\end{aligned}$$

mit:

$$\begin{aligned}
Num_1 &= n_6 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4} \\
Num_2 &= n_5 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4} \\
Const &= d_{33} &= k_{-1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3}) \\
Coef_A &= d_{32} &= k_{+1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3}) \\
Coef_B &= d_{28} = d_{31} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4} \\
Coef_P &= d_{27} = d_{30} &= k_{-1}k_{-2}k_{-3} \\
Coef_Q &= d_{29} &= k_{-1}k_{-4}(k_{-2} + k_{+3}) \\
Coef_{AB} &= d_{24} = d_{26} &= k_{+1}k_{+2}(k_{+3} + k_{+4}) \\
Coef_{AP} &= d_{23} = d_{25} &= k_{+1}k_{-2}k_{-3} \\
Coef_{BQ} &= d_{18} = d_{22} &= k_{+2}k_{+3}k_{-4} \\
Coef_{PQ} &= d_{17} = d_{21} &= k_{-3}k_{-4}(k_{-1} + k_{-2}) \\
Coef_{ABP} &= d_9 = d_{12} = d_{13} = d_{16} &= k_{+1}k_{+2}k_{-3} \\
Coef_{BPQ} &= d_1 = d_4 = d_5 = d_8 &= k_{+2}k_{-3}k_{-4}
\end{aligned}$$

Da durch die Annahme, dass die Geschwindigkeitskonstanten beider Substratreaktionen identisch sind, gelten muss:

$$\frac{[B_1]}{[P_1]} = \frac{[B_2]}{[P_2]} \quad (\text{B.9})$$

führt das zu:

$$[B_1][P_2] - [B_2][P_1] = 0 \quad (\text{B.10})$$

und somit:

$$v = \frac{d[P_1]}{dt} = \frac{Num_1[A][B_1] - Num_2[P_1][Q]}{Const + Coef_A[A] + Coef_B([B_1] + [B_2]) + Coef_P([P_1] + [P_2]) + Coef_Q[Q] \left(1 + \frac{k_{+5}}{k_{-5}} ([B_1] + [B_2])\right) + Coef_{AB}[A] ([B_1] + [B_2]) \left(1 + \frac{k_{+3}k_{+5}}{(k_{+3}+k_{+4})k_{-5}} ([B_1] + [B_2])\right) + Coef_{AP}[A] ([P_1] + [P_2]) + Coef_{BQ}([B_1] + [B_2])[Q] \left(1 + \frac{k_{+5}}{k_{-5}} ([B_1] + [B_2])\right) + Coef_{PQ}([P_1] + [P_2])[Q] + Coef_{ABP}[A] ([B_1] + [B_2]) ([P_1] + [P_2]) + Coef_{BPQ}([B_1] + [B_2]) ([P_1] + [P_2])[Q]} \quad (\text{B.11})$$

Die Geschwindigkeitsreaktion lässt sich wiederum mit kinetischen Konstanten gemäß Cleland-Definition darstellen:

$$v = \frac{V_1 V_2 [A][B_1] - \frac{V_1 V_2}{K_{eq}} [P_1][Q]}{K_{ia} K_{mB} V_2 + K_{mB} V_2 [A] + K_{mA} V_2 ([B_1] + [B_2]) + \frac{V_1 K_{mQ}}{K_{eq}} ([P_1] + [P_2]) + \frac{V_1 K_{mP}}{K_{eq}} [Q] \left(1 + \frac{([B_1] + [B_2])}{K_{ii}}\right) + V_2 [A] ([B_1] + [B_2]) \left(1 + \frac{([B_1] + [B_2])}{K_{mi}}\right) + \frac{V_1 K_{mQ}}{K_{eq} K_{ia}} [A] ([P_1] + [P_2]) + \frac{K_{mA} V_2}{K_{iq}} ([B_1] + [B_2]) [Q] \left(1 + \frac{([B_1] + [B_2])}{K_{ii}}\right) + \frac{V_1}{K_{eq}} ([P_1] + [P_2]) [Q] + \frac{V_2}{K_{ip}} [A] ([B_1] + [B_2]) ([P_1] + [P_2]) + \frac{V_1}{K_{eq} K_{ib}} ([B_1] + [B_2]) ([P_1] + [P_2]) [Q]} \quad (\text{B.12})$$

B.3 Mechanismus der GDH mit konkurrierenden Kofaktoren

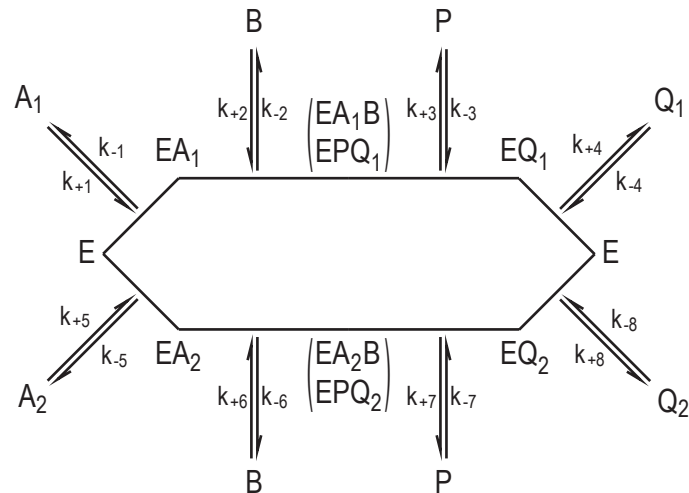
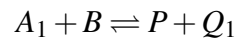
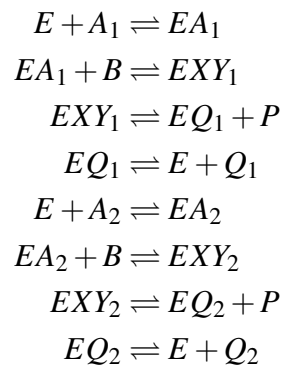


Abbildung B.3: Schema eines ordered bi-bi-Mechanismus mit konkurrierenden erstbindenden Substraten.

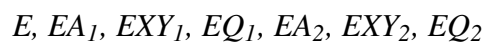
Zunächst wird folgende Gesamtreaktion definiert:



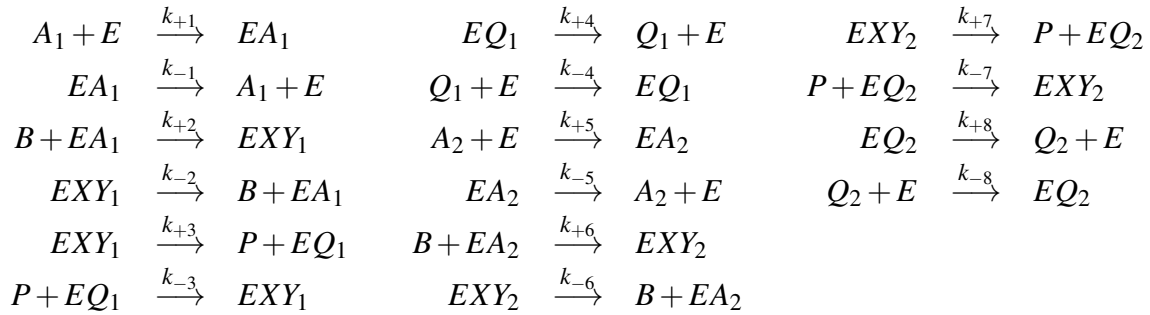
Die Einzelreaktionen sind wie folgt:



Dabei existieren folgende Enzymformen:



Die Geschwindigkeitskonstanten werden wie folgt definiert:



Die Geschwindigkeitsgleichung nach Durchlaufen des King-Altman-Verfahrens ist wie folgt:

$$v = \frac{d[Q_1]}{dt} = \frac{-n_1[Q_1][P]^2 - n_2[Q_1][B][P] + n_3[A_1][B][P] + n_4[A_1][B]^2 - n_5[Q_1][P] + n_6[A_1][B]}{d_1[Q_2][B][P]^2 + d_2[Q_2][B]^2[P] + d_3[A_2][B][P]^2 + d_4[A_2][B]^2[P] + d_5[Q_1][B][P]^2 + d_6[Q_1][B]^2[P] + d_7[A_1][B][P]^2 + d_8[A_1][B]^2[P] + d_9[Q_2][P]^2 + d_{10}[Q_2][B][P] + d_{11}[Q_2][B]^2 + d_{12}[A_2][P]^2 + d_{13}[A_2][B][P] + d_{14}[A_2][B]^2 + d_{15}[Q_1][P]^2 + d_{16}[Q_1][B][P] + d_{17}[Q_1][B]^2 + d_{18}[A_1][P]^2 + d_{19}[A_1][B][P] + d_{20}[A_1][B]^2 + d_{21}[P]^2 + d_{22}[B][P] + d_{23}[B]^2 + d_{24}[Q_2][P] + d_{25}[Q_2][B] + d_{26}[A_2][P] + d_{27}[A_2][B] + d_{28}[Q_1][P] + d_{29}[Q_1][B] + d_{30}[A_1][P] + d_{31}[A_1][B] + d_{32}[P] + d_{33}[B] + d_{34}[Q_2] + d_{35}[A_2] + d_{36}[Q_1] + d_{37}[A_1] + d_{38}} \quad (\text{B.13})$$

mit:

$$\begin{aligned}
n_1 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
n_2 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\
n_3 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
n_4 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\
n_5 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{+7}k_{+8} \\
n_6 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} + k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{+7}k_{+8} \\
d_1 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{+6}k_{-7}k_{-8} \\
d_2 &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+6}k_{-7}k_{-8} \\
d_3 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{+5}k_{+6}k_{-7} \\
d_4 &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{+6}k_{-7} \\
d_5 &= k_{+2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
d_6 &= k_{+2}k_{-3}k_{-4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\
d_7 &= k_{+1}k_{+2}k_{-3}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
d_8 &= k_{+1}k_{+2}k_{-3}k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\
d_9 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-6}k_{-7}k_{-8} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{-7}k_{-8}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
d_{10} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-6}k_{-7}k_{-8} + k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{+6}k_{-7}k_{-8} + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{+6}k_{-7}k_{-8} \\
&\quad + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-7}k_{-8} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{+6}k_{+7}k_{-8} \\
d_{11} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{-8} \\
d_{12} &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{+5}k_{-6}k_{-7} \\
d_{13} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{-6}k_{-7} + k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{+5}k_{+6}k_{-7} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{+5}k_{+6}k_{+8} \\
&\quad + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{+6}k_{-7} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{+5}k_{+6}k_{+7} \\
d_{14} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{+6}k_{+8} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{+6}k_{+7} \\
d_{15} &= k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} + k_{-1}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
d_{16} &= k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{-1}k_{-3}k_{-4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} \\
&\quad + k_{+2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{+7}k_{+8} + k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
d_{17} &= k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\
d_{18} &= k_{+1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
d_{19} &= k_{+1}k_{-2}k_{-3}k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+1}k_{+2}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} + k_{+1}k_{+2}k_{-3}k_{-5}k_{-6}k_{+8} \\
&\quad + k_{+1}k_{+2}k_{-3}k_{-5}k_{+7}k_{+8} + k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
d_{20} &= k_{+1}k_{+2}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\
d_{21} &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
d_{22} &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
d_{23} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\
d_{24} &= k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{-6}k_{-7}k_{-8} + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{-6}k_{-7}k_{-8} + k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{-5}k_{-7}k_{-8} \\
&\quad + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-7}k_{-8} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{-6}k_{-8} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{+7}k_{-8} \\
d_{25} &= k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{-8} + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{-8} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{-8} \\
&\quad + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{+7}k_{-8} \\
d_{26} &= k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{+5}k_{-6}k_{-7} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{+5}k_{-6}k_{+8} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{+5}k_{+7}k_{+8} \\
&\quad + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{-6}k_{-7} \\
d_{27} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{-6}k_{+8} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{+7}k_{+8} + k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{+5}k_{+6}k_{+8} \\
&\quad + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{+6}k_{+8} + k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{+5}k_{+6}k_{+7} + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{+6}k_{+7} \\
d_{28} &= k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} + k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{+7}k_{+8} + k_{-1}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} \\
&\quad + k_{-1}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{+7}k_{+8} + k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} + k_{-1}k_{+3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
d_{29} &= k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{-1}k_{+3}k_{-4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} \\
&\quad + k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{-5}k_{+7}k_{+8} \\
d_{30} &= k_{+1}k_{-2}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} + k_{+1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{-6}k_{+8} + k_{+1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{+7}k_{+8} \\
&\quad + k_{+1}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
d_{31} &= k_{+1}k_{-2}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+1}k_{+3}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+1}k_{+2}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} \\
&\quad + k_{+1}k_{+2}k_{+4}k_{-5}k_{+7}k_{+8} + k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{-5}k_{-6}k_{+8} + k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{-5}k_{+7}k_{+8} \\
d_{32} &= k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{-6}k_{+8} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{+7}k_{+8} \\
&\quad + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{-7} \\
d_{33} &= k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} \\
&\quad + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{+7}k_{+8} \\
d_{34} &= k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{-8} + k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{-5}k_{+7}k_{-8} + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{-8} \\
&\quad + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{+7}k_{-8} \\
d_{35} &= k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{+5}k_{-6}k_{+8} + k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{+5}k_{+7}k_{+8} + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{-6}k_{+8} \\
&\quad + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{+5}k_{+7}k_{+8} \\
d_{36} &= k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} + k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{-5}k_{+7}k_{+8} + k_{-1}k_{+3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} \\
&\quad + k_{-1}k_{+3}k_{-4}k_{-5}k_{+7}k_{+8} \\
d_{37} &= k_{+1}k_{-2}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} + k_{+1}k_{-2}k_{+4}k_{-5}k_{+7}k_{+8} + k_{+1}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} \\
&\quad + k_{+1}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{+7}k_{+8}
\end{aligned}$$

$$d_{38} = k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} + k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{-5}k_{+7}k_{+8} + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-6}k_{+8} \\ + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{+7}k_{+8}$$

Durch Vernachlässigung von $[P]$ vereinfacht sich die Gleichung wie folgt:

$$v = \frac{d[Q_1]}{dt} = \frac{n_4[A_1][B]^2 + n_6[A_1][B]}{d_{11}[Q_2][B]^2 + d_{14}[A_2][B]^2 + d_{17}[Q_1][B]^2 + d_{20}[A_1][B]^2 + d_{23}[B]^2 + \\ d_{25}[Q_2][B] + d_{27}[A_2][B] + d_{29}[Q_1][B] + d_{31}[A_1][B] + d_{33}[B] + \\ d_{34}[Q_2] + d_{35}[A_2] + d_{36}[Q_1] + d_{37}[A_1] + d_{38}} \quad (\text{B.14})$$

mit:

$$\begin{aligned} n_4 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4} \cdot k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\ n_6 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4} \cdot k_{-5}k_{+8} (k_{-6} + k_{+7}) \\ d_{11} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4} \cdot k_{+6}k_{+7}k_{-8} \\ d_{14} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4} \cdot k_{+5}k_{+6} (k_{+7} + k_{+8}) \\ d_{17} &= k_{+2}k_{+3}k_{-4} \cdot k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\ d_{20} &= k_{+1}k_{+2} (k_{+3} + k_{+4}) \cdot k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\ d_{23} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4} \cdot k_{+6}k_{+7}k_{+8} \\ d_{25} &= k_{-1}k_{+4} (k_{-2} + k_{+3}) \cdot k_{+6}k_{+7}k_{-8} + k_{+2}k_{+3}k_{+4} \cdot k_{-5}k_{-8} (k_{-6} + k_{+7}) \\ d_{27} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4} \cdot k_{+5}k_{+8} (k_{-6} + k_{+7}) + k_{-1}k_{+4} (k_{-2} + k_{+3}) \cdot k_{+5}k_{+6} (k_{+7} + k_{+8}) \\ d_{29} &= k_{-1}k_{-4} (k_{-2} + k_{+3}) \cdot k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+2}k_{+3}k_{-4} \cdot k_{-5}k_{+8} (k_{-6} + k_{+7}) \\ d_{31} &= k_{+1}k_{+4} (k_{-2} + k_{+3}) \cdot k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+1}k_{+2} (k_{+3} + k_{+4}) \cdot k_{-5}k_{+8} (k_{-6} + k_{+7}) \\ d_{33} &= k_{-1}k_{+4} (k_{-2} + k_{+3}) \cdot k_{+6}k_{+7}k_{+8} + k_{+2}k_{+3}k_{+4} \cdot k_{-5}k_{+8} (k_{-6} + k_{+7}) \\ d_{34} &= k_{-1}k_{+4} (k_{-2} + k_{+3}) \cdot k_{-5}k_{-8} (k_{-6}k_{+7}) \\ d_{35} &= k_{-1}k_{+4} (k_{-2} + k_{+3}) \cdot k_{+5}k_{+8} (k_{-6}k_{+7}) \\ d_{36} &= k_{-1}k_{-4} (k_{-2} + k_{+3}) \cdot k_{-5}k_{+8} (k_{-6}k_{+7}) \\ d_{37} &= k_{+1}k_{+4} (k_{-2} + k_{+3}) \cdot k_{-5}k_{+8} (k_{-6}k_{+7}) \\ d_{38} &= k_{-1}k_{+4} (k_{-2} + k_{+3}) \cdot k_{-5}k_{+8} (k_{-6}k_{+7}) \end{aligned}$$

beziehungsweise:

$$\begin{aligned} n_4 &= V_{1,1}K_{mA,2} \\ n_6 &= V_{1,1}K_{ia,2}K_{mB,2} \\ d_{11} &= (K_{mA,1}K_{mA,2})/K_{iq,2} = d_{23}/K_{iq,2} \\ d_{14} &= K_{mA,1} \\ d_{17} &= (K_{mA,1}K_{mA,2})/K_{iq,1} = d_{23}/K_{iq,1} \\ d_{20} &= K_{mA,2} \\ d_{23} &= K_{mA,1}K_{mA,2} \\ d_{25} &= (K_{ia,1}K_{mB,1}K_{mA,2} + K_{mA,1}K_{ia,2}K_{mB,2})/K_{iq,2} = d_{33}/K_{iq,2} \\ d_{27} &= K_{mA,1}K_{mB,2} + K_{ia,1}K_{mB,1} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
d_{29} &= (K_{ia,1}K_{mB,1}K_{mA,2} + K_{mA,1}K_{ia,2}K_{mB,2})/K_{iq,1} = d_{33}/K_{iq,1} \\
d_{31} &= K_{mB,1}K_{mA,2} + K_{ia,2}K_{mB,2} \\
d_{33} &= K_{ia,1}K_{mB,1}K_{mA,2} + K_{mA,1}K_{ia,2}K_{mB,2} \\
d_{34} &= (K_{ia,1}K_{mB,1}K_{ia,2}K_{mB,2})/K_{iq,2} = d_{38}/K_{iq,2} \\
d_{35} &= K_{ia,1}K_{mB,1}K_{mB,2} \\
d_{36} &= (K_{ia,1}K_{mB,1}K_{ia,2}K_{mB,2})/K_{iq,1} = d_{38}/K_{iq,2} \\
d_{37} &= K_{mB,1}K_{ia,2}K_{mB,2} \\
d_{38} &= K_{ia,1}K_{mB,1}K_{ia,2}K_{mB,2}
\end{aligned}$$

Durch Umformung und Kürzen von $K_{mB,1}K_{mB,2}$ ergibt sich folgende Geschwindigkeitsgleichung:

$$v = \frac{d[Q_1]}{dt} = \frac{V_{1,1}[A_1] \left(K_{mA,2} \frac{[B]}{K_{mB,1}} \frac{[B]}{K_{mB,2}} + K_{ia,2} \frac{[B]}{K_{mB,1}} \right)}{\left(K_{mA,2}[A_1] + K_{mA,1}[A_2] + K_{mA,1}K_{mA,2} \cdot \left(1 + \frac{[Q_1]}{K_{iq,1}} + \frac{[Q_2]}{K_{iq,2}} \right) \right) \frac{[B]}{K_{mB,1}} \frac{[B]}{K_{mB,2}} + \left(K_{ia,2}[A_1] + K_{mA,1}[A_2] + K_{mA,1}K_{ia,2} \cdot \left(1 + \frac{[Q_1]}{K_{iq,1}} + \frac{[Q_2]}{K_{iq,2}} \right) \right) \frac{[B]}{K_{mB,1}} + \left(K_{ia,1}[A_2] + K_{mA,2}[A_1] + K_{mA,2}K_{ia,1} \cdot \left(1 + \frac{[Q_1]}{K_{iq,1}} + \frac{[Q_2]}{K_{iq,2}} \right) \right) \frac{[B]}{K_{mB,2}} + \left(K_{ia,2}[A_1] + K_{ia,1}[A_2] + K_{ia,1}K_{ia,2} \cdot \left(1 + \frac{[Q_1]}{K_{iq,1}} + \frac{[Q_2]}{K_{iq,2}} \right) \right)} \quad (\text{B.15})$$

Für sehr große $[B]/K_{mB,1}$ und zugleich $[B]/K_{mB,2}$ gilt zudem:

$$v \approx \frac{V_{1,1}[A_1]}{[A_1] + \left(1 + \frac{[A_2]}{K_{mA,2}} + \frac{[Q_1]}{K_{iq,1}} + \frac{[Q_2]}{K_{iq,2}} \right) K_{mA,1}} \quad (\text{B.16})$$

C Verlaufskurven für Parameterschätzung

C.1 Verlaufskurven der Glucosedehydrogenase (GDH) mit NAD

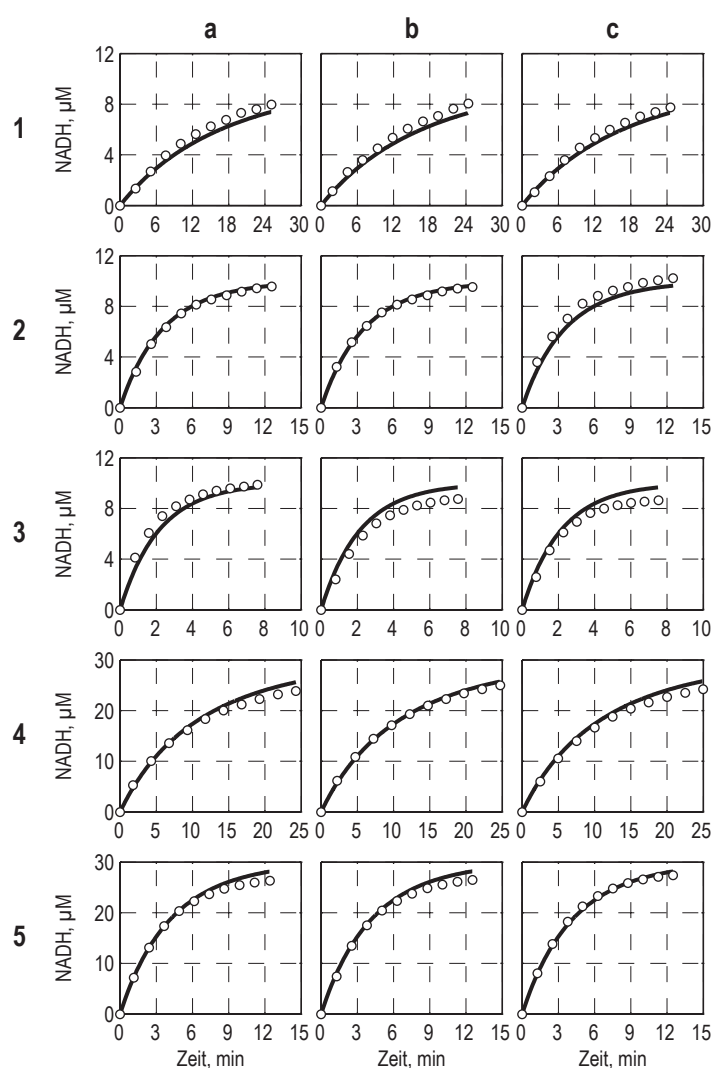


Abbildung C.1: Verlaufskurven der GDH mit α -D-Glucose als Substrat und NAD als Kofaktor. Gezeigt sind die Ansätze 1 bis 5, die Triplikate sind mit a, b und c bezeichnet. Die experimentellen Daten sind durch weiße Kreise dargestellt während die gemäß Gleichung 8.4 angepassten Reaktionsverläufe als durchgezogene Linien abgebildet sind. Die NADH-Konzentrationen wurden photometrisch durch Extinktionsmessung bei 340 nm ermittelt. Die Reaktionen fanden im 250 μL -Maßstab bei 30 $^{\circ}\text{C}$ und pH 7,0 statt. Die detaillierten Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 4.5.7 aufgeführt.

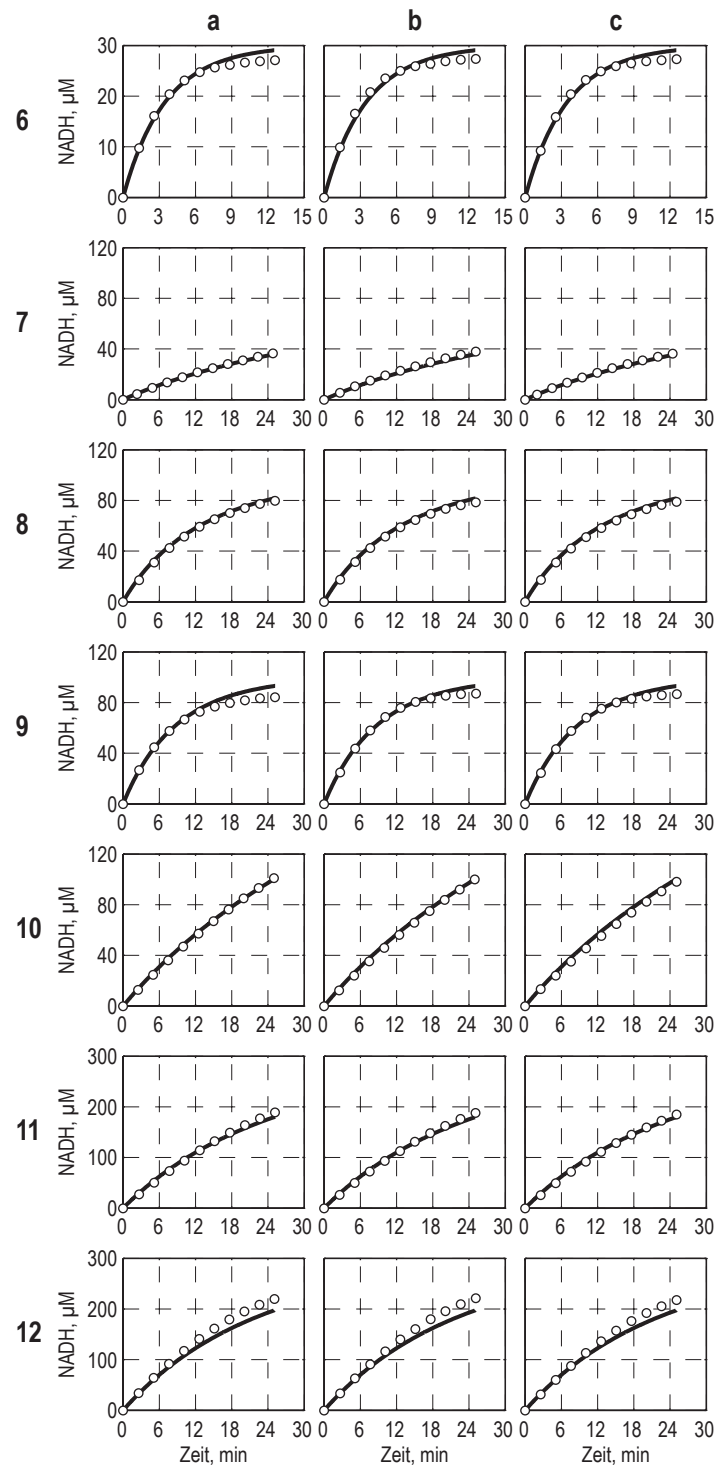


Abbildung C.2: Verlaufskurven der GDH mit α -D-Glucose als Substrat und NAD als Kofaktor. Gezeigt sind die Ansätze 6 bis 12, die Triplikate sind mit a, b und c bezeichnet. Die experimentellen Daten sind durch weiße Kreise dargestellt während die gemäß Gleichung 8.4 angepassten Reaktionsverläufe als durchgezogene Linien abgebildet sind. Die NADH-Konzentrationen wurden photometrisch durch Extinktionsmessung bei 340 nm ermittelt. Die Reaktionen fanden im 250 μ L-Maßstab bei 30 $^{\circ}$ C und pH 7,0 statt. Die detaillierten Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 4.5.7 aufgeführt.

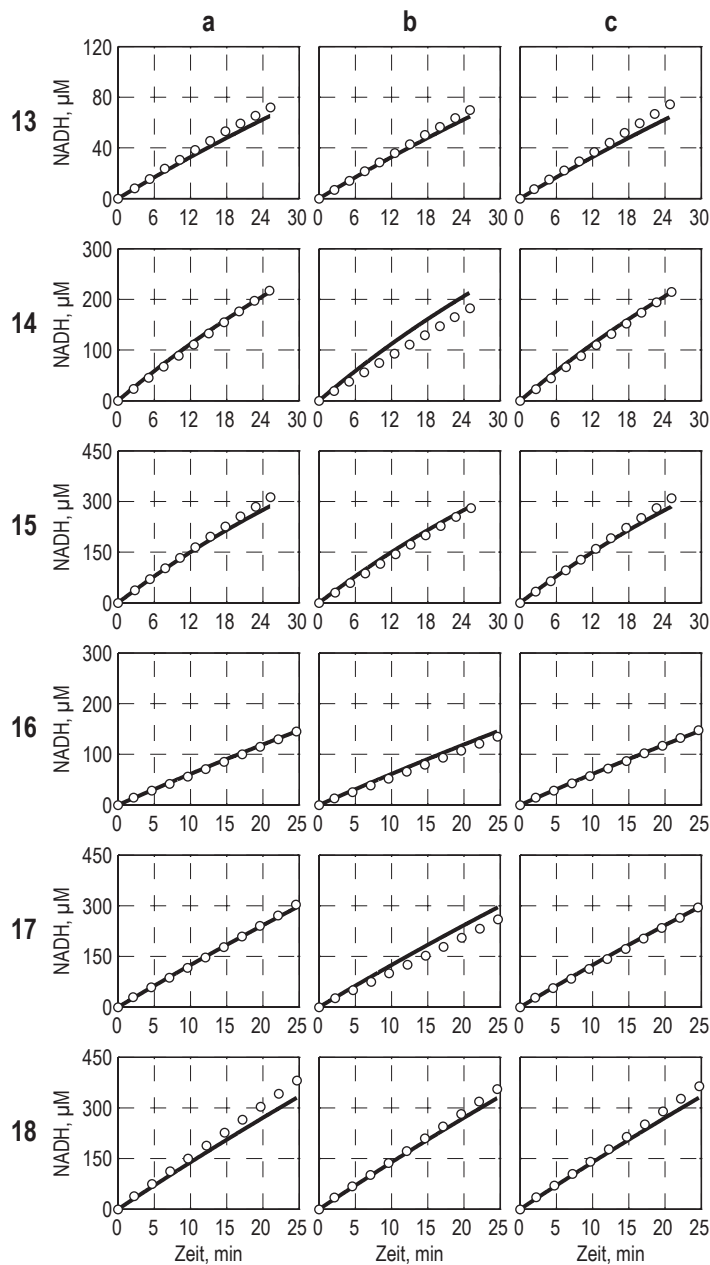


Abbildung C.3: Verlaufskurven der GDH mit α -D-Glucose als Substrat und NAD als Kofaktor. Gezeigt sind die Ansätze 13 bis 18, die Triplikate sind mit a, b und c bezeichnet. Die experimentellen Daten sind durch weiße Kreise dargestellt während die gemäß Gleichung 8.4 angepassten Reaktionsverläufe als durchgezogene Linien abgebildet sind. Die NADH-Konzentrationen wurden photometrisch durch Extinktionsmessung bei 340 nm ermittelt. Die Reaktionen fanden im 250 μ L-Maßstab bei 30 $^{\circ}$ C und pH 7,0 statt. Die detaillierten Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 4.5.7 aufgeführt.

C.2 Verlaufskurven der Glucosedehydrogenase (GDH) mit NADP

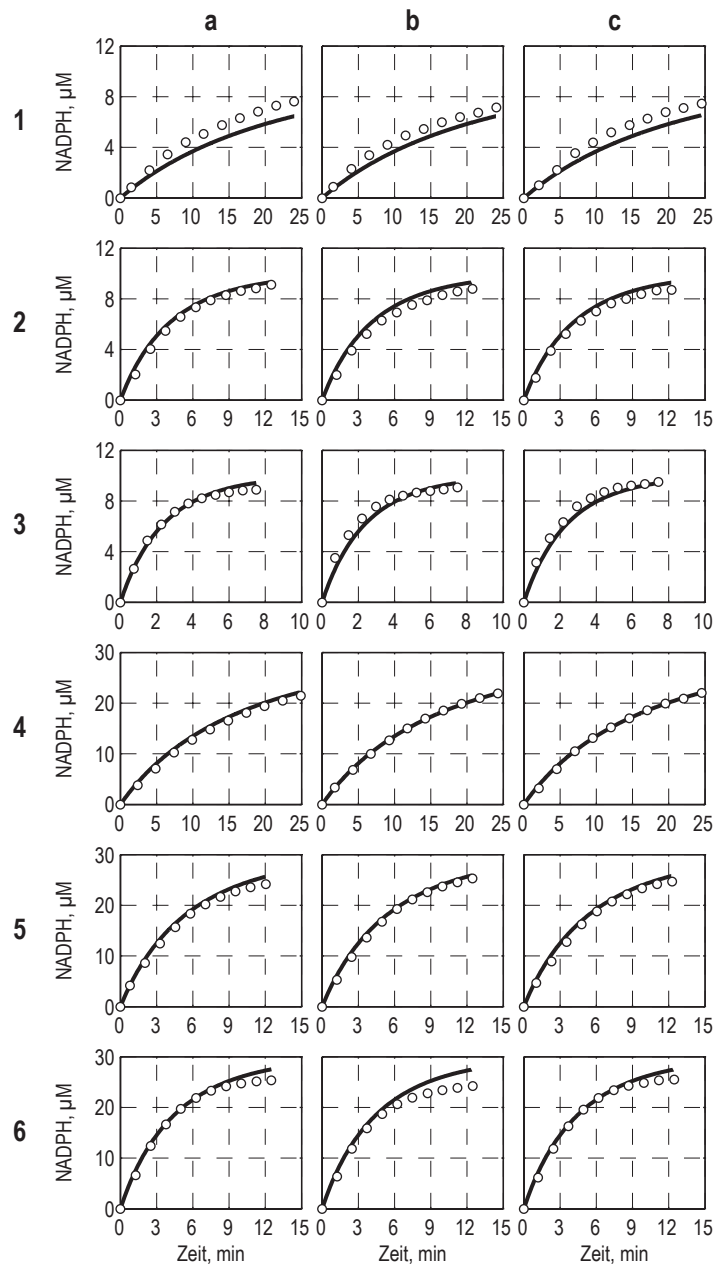


Abbildung C.4: Verlaufskurven der GDH mit α -D-Glucose als Substrat und NADP als Kofaktor. Gezeigt sind die Ansätze 1 bis 6, die Triplikate sind mit a, b und c bezeichnet. Die experimentellen Daten sind durch weiße Kreise dargestellt während die gemäß Gleichung 8.4 angepassten Reaktionsverläufe als durchgezogene Linien abgebildet sind. Die NADPH-Konzentrationen wurden photometrisch durch Extinktionsmessung bei 340 nm ermittelt. Die Reaktionen fanden im 250 μL -Maßstab bei 30 $^{\circ}\text{C}$ und pH 7,0 statt. Die detaillierten Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 4.5.7 aufgeführt.

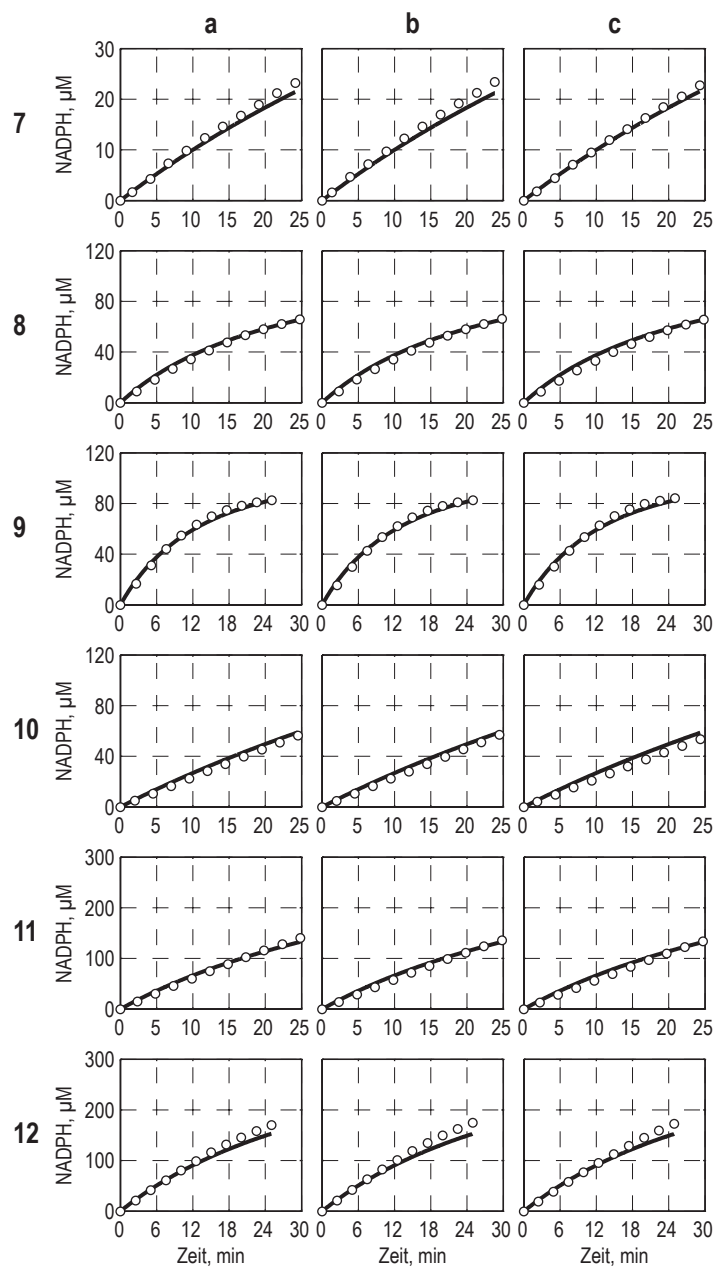


Abbildung C.5: Verlaufskurven der GDH mit α -D-Glucose als Substrat und NADP als Kofaktor. Gezeigt sind die Ansätze 7 bis 12, die Triplikate sind mit a, b und c bezeichnet. Die experimentellen Daten sind durch weiße Kreise dargestellt während die gemäß Gleichung 8.4 angepassten Reaktionsverläufe als durchgezogene Linien abgebildet sind. Die NADPH-Konzentrationen wurden photometrisch durch Extinktionsmessung bei 340 nm ermittelt. Die Reaktionen fanden im 250 μ L-Maßstab bei 30 $^{\circ}$ C und pH 7,0 statt. Die detaillierten Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 4.5.7 aufgeführt.

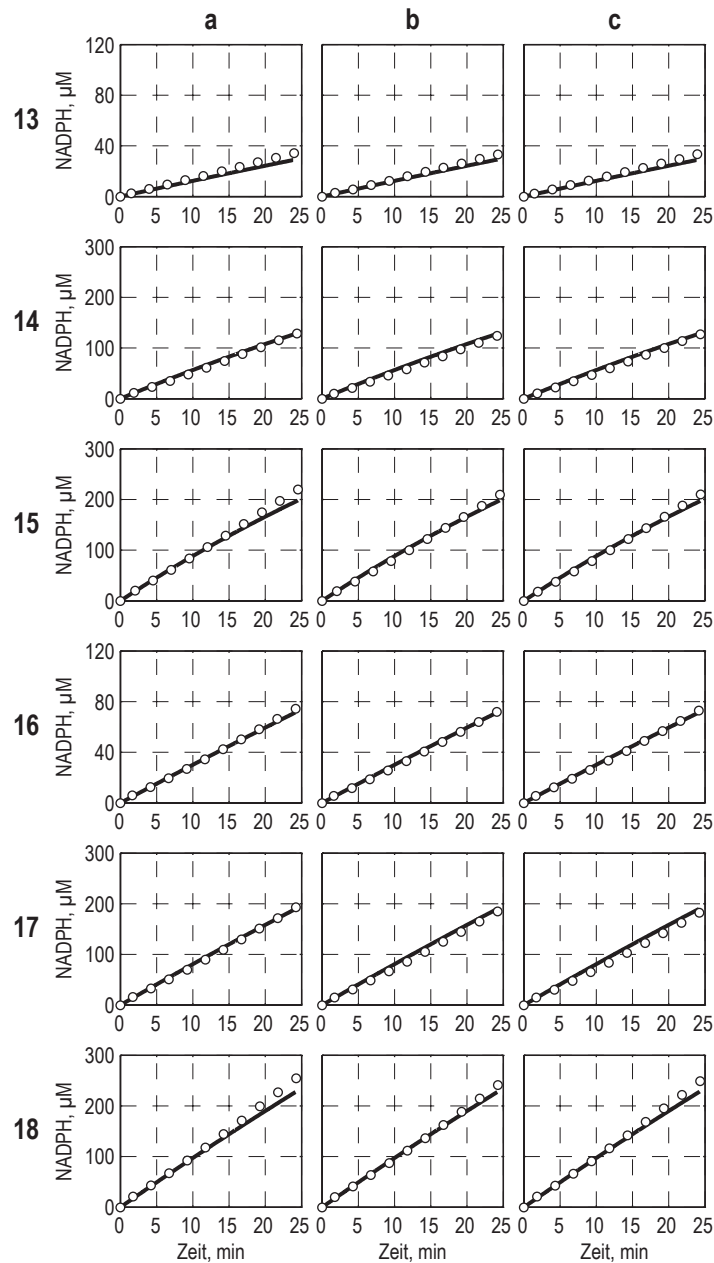


Abbildung C.6: Verlaufskurven der GDH mit α -D-Glucose als Substrat und NADP als Kofaktor. Gezeigt sind die Ansätze 13 bis 18, die Triplikate sind mit a, b und c bezeichnet. Die experimentellen Daten sind durch weiße Kreise dargestellt während die gemäß Gleichung 8.4 angepassten Reaktionsverläufe als durchgezogene Linien abgebildet sind. Die NADPH-Konzentrationen wurden photometrisch durch Extinktionsmessung bei 340 nm ermittelt. Die Reaktionen fanden im 250 μ L-Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 statt. Die detaillierten Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 4.5.7 aufgeführt.

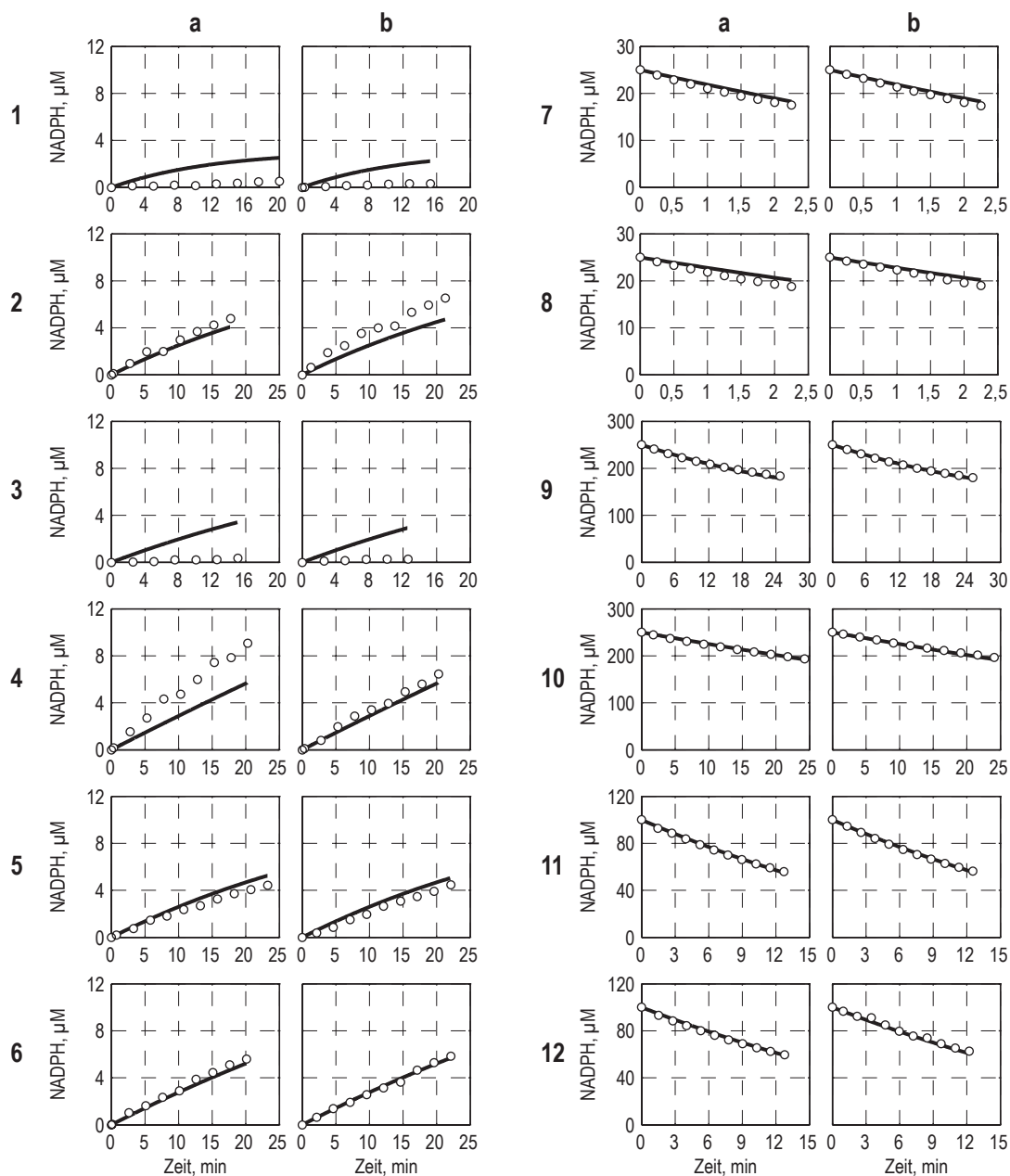
C.3 Verlaufskurven der 7 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7 β -HSDH)

Abbildung C.7: Verlaufskurven der 7 β -HSDH mit DHCA und 3,12-Diketo-UDCA als Substrat-Produkt-Paar sowie NADP und NADPH als Kofaktoren. Gezeigt sind die Ansätze 1 bis 12, die Duplikate sind mit a und b bezeichnet. Die experimentellen Daten sind durch weiße Kreise dargestellt während die gemäß Gleichung 8.7 angepassten Reaktionsverläufe als durchgezogene Linien abgebildet sind. Die NADPH-Konzentrationen wurden photometrisch durch Extinktionsmessung bei 340 nm ermittelt. Die Reaktionen fanden im 250 μL -Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 statt. Die detaillierten Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 4.5.7 aufgeführt.

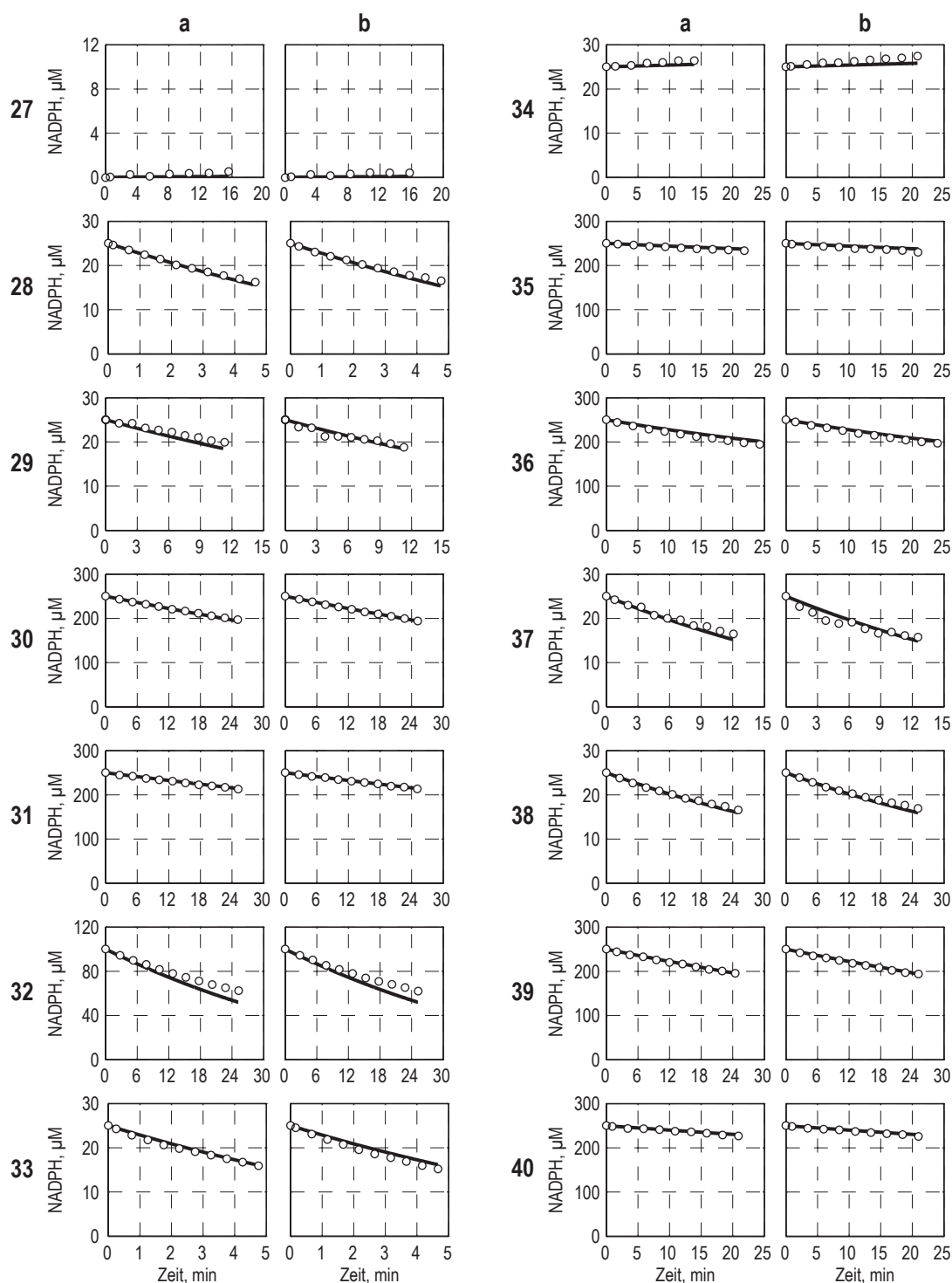


Abbildung C.9: Verlaufskurven der 7β -HSDH mit DHCA und 3,12-Diketo-UDCA als Substrat-Produkt-Paar sowie NADP und NADPH als Kofaktoren. Gezeigt sind die Ansätze 27 bis 40, die Duplikate sind mit a und b bezeichnet. Die experimentellen Daten sind durch weiße Kreise dargestellt während die gemäß Gleichung 8.7 angepassten Reaktionsverläufe als durchgezogene Linien abgebildet sind. Die NADPH-Konzentrationen wurden photometrisch durch Extinktionsmessung bei 340 nm ermittelt. Die Reaktionen fanden im 250 μ L-Maßstab bei 30 °C und pH 7,0 statt. Die detaillierten Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 4.5.7 aufgeführt.

C.4 Verlaufskurven der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 α -HSDH)

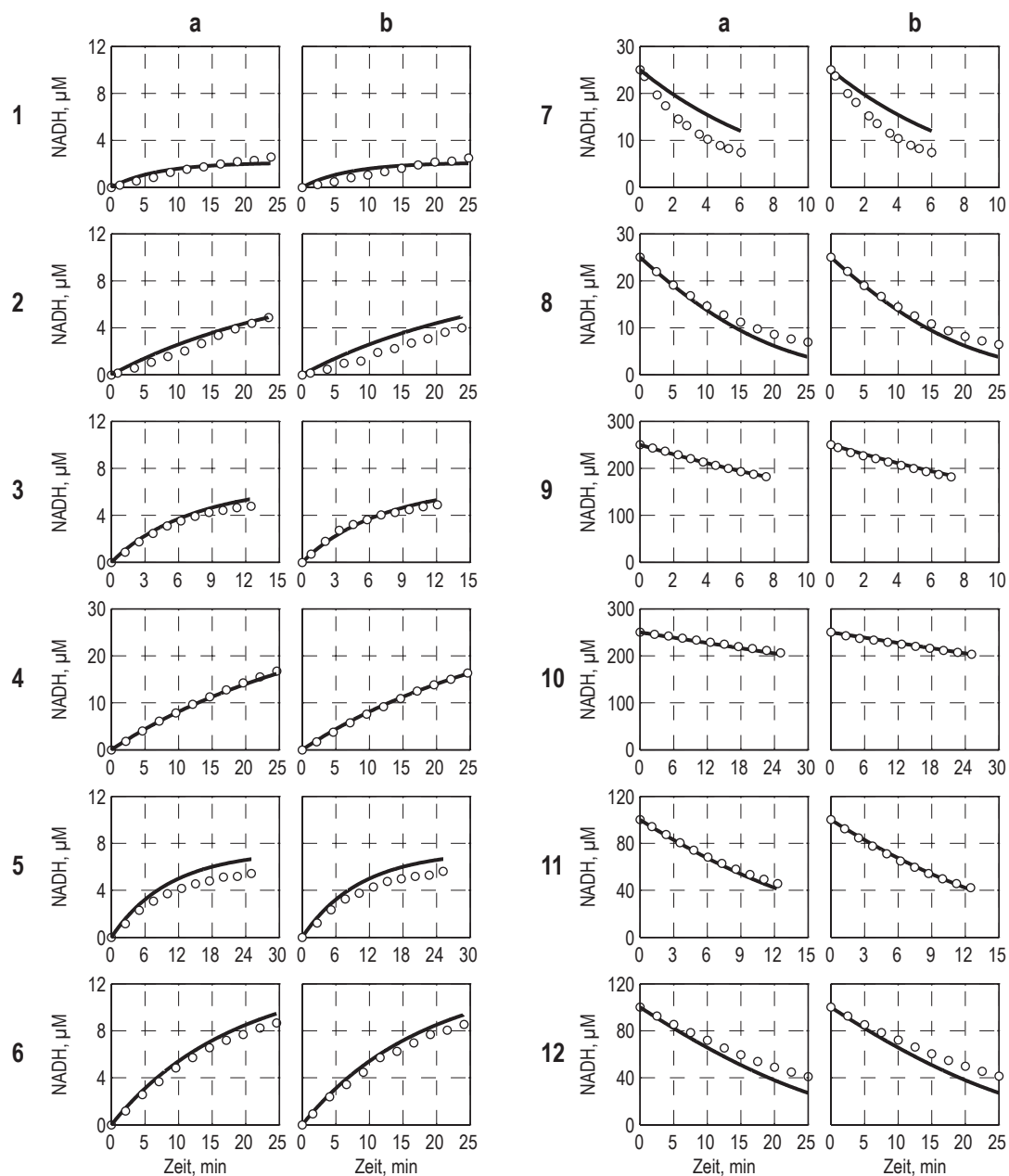


Abbildung C.10: Verlaufskurven der 3 α -HSDH mit DHCA und 7,12-Diketo-UDCA als Substrat-Produkt-Paar sowie NAD und NADH als Kofaktoren. Gezeigt sind die Ansätze 1 bis 12, die Duplikate sind mit a und b bezeichnet. Die experimentellen Daten sind durch weiße Kreise dargestellt während die gemäß Gleichung 8.17 angepassten Reaktionsverläufe als durchgezogene Linien abgebildet sind. Die NADH-Konzentrationen wurden photometrisch durch Extinktionsmessung bei 340 nm ermittelt. Die Reaktionen fanden im 250 μL -Maßstab bei 30 $^{\circ}\text{C}$ und pH 7,0 statt. Die detaillierten Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 4.5.7 aufgeführt.

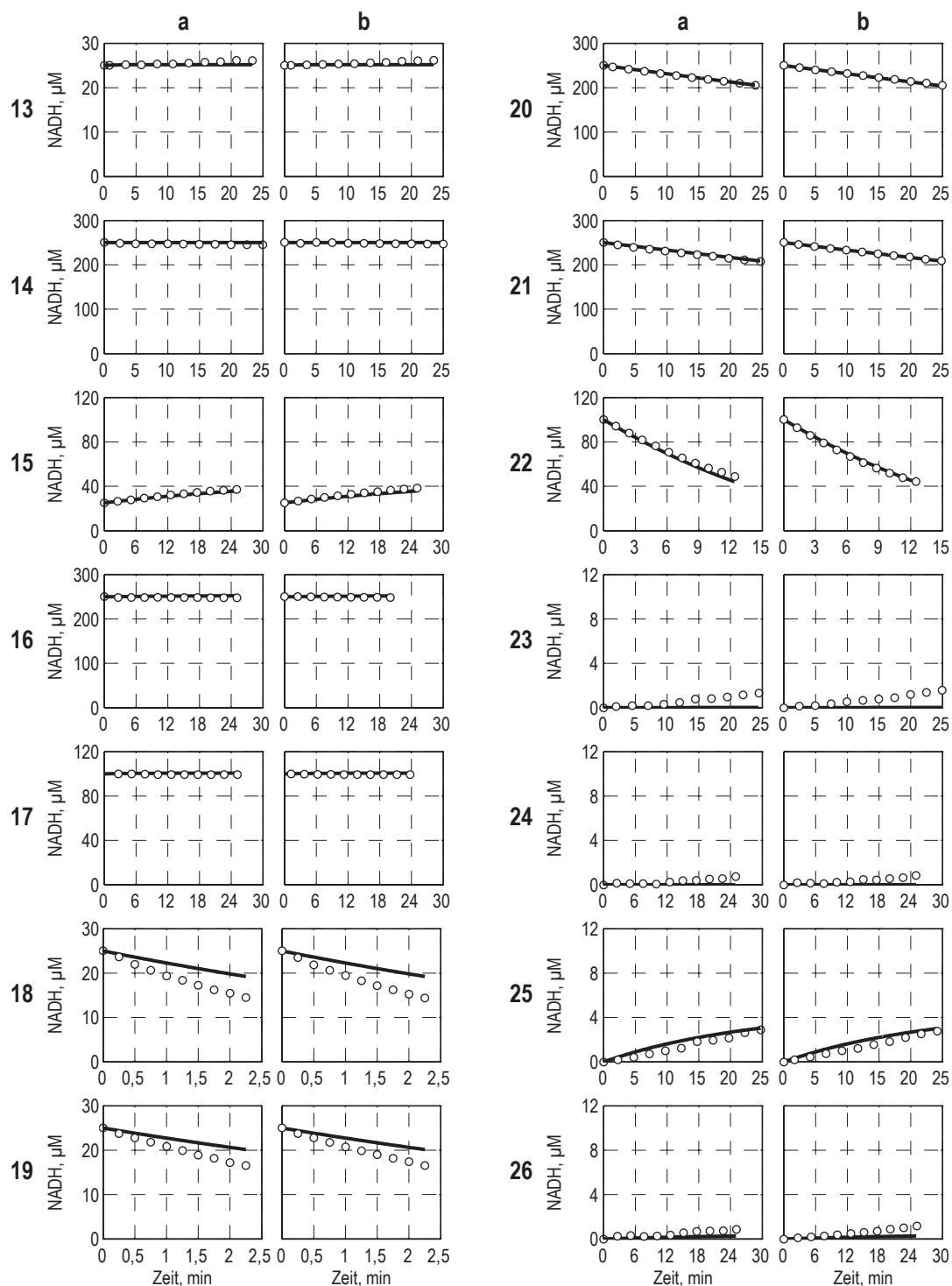


Abbildung C.11: Verlaufskurven der 3α -HSDH mit DHCA und 7,12-Diketo-UDCA als Substrat-Produkt-Paar sowie NAD und NADH als Kofaktoren. Gezeigt sind die Ansätze 13 bis 26, die Duplikate sind mit a und b bezeichnet. Die experimentellen Daten sind durch weiße Kreise dargestellt während die gemäß Gleichung 8.17 angepassten Reaktionsverläufe als durchgezogene Linien abgebildet sind. Die NADH-Konzentrationen wurden photometrisch durch Extinktionsmessung bei 340 nm ermittelt. Die Reaktionen fanden im 250 μL -Maßstab bei 30 $^{\circ}\text{C}$ und pH 7,0 statt. Die detaillierten Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 4.5.7 aufgeführt.

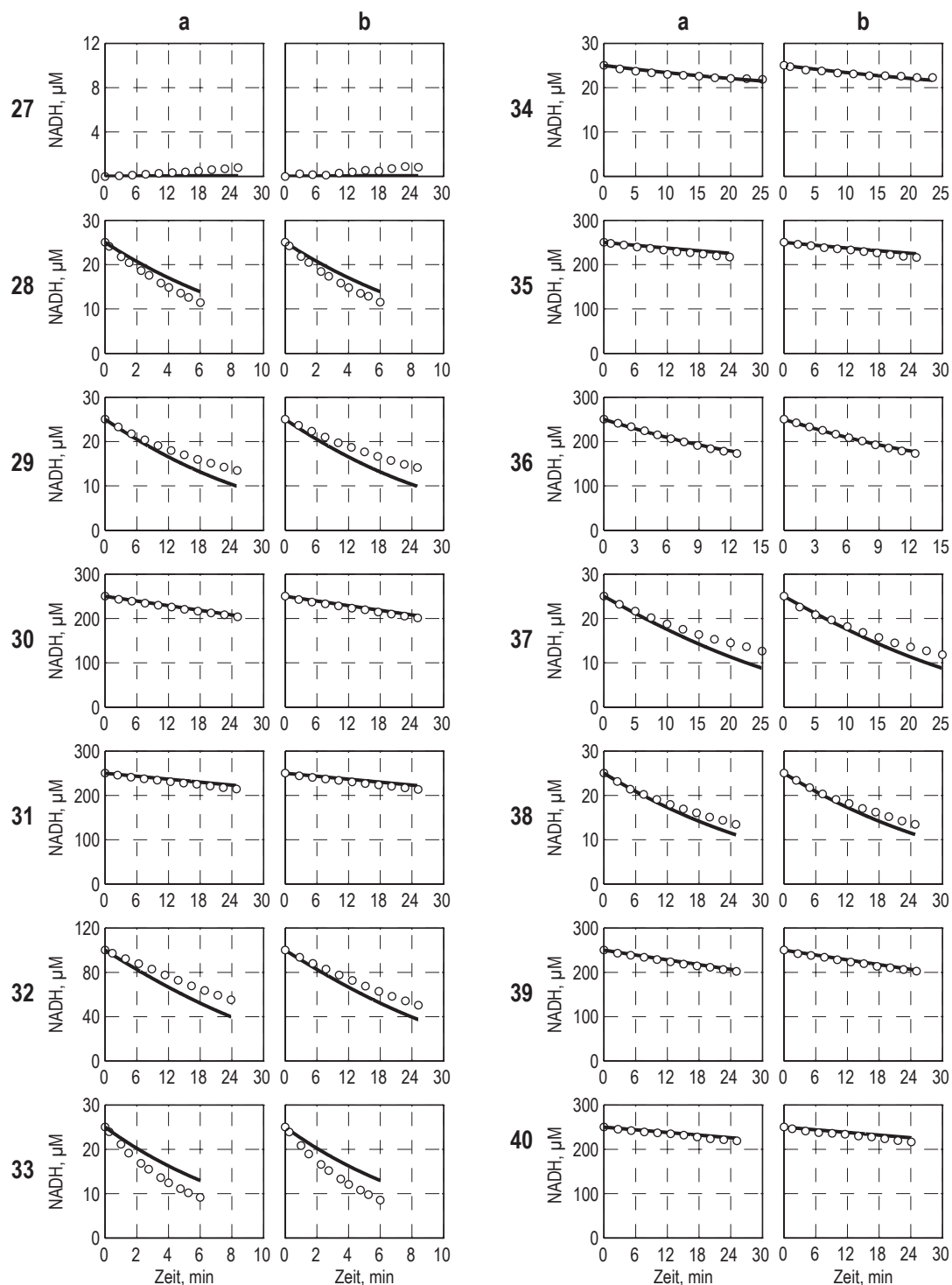


Abbildung C.12: Verlaufskurven der 3α -HSDH mit DHCA und 7,12-Diketo-UDCA als Substrat-Produkt-Paar sowie NAD und NADH als Kofaktoren. Gezeigt sind die Ansätze 27 bis 40, die Duplikate sind mit a und b bezeichnet. Die experimentellen Daten sind durch weiße Kreise dargestellt während die gemäß Gleichung 8.17 angepassten Reaktionsverläufe als durchgezogene Linien abgebildet sind. Die NADH-Konzentrationen wurden photometrisch durch Extinktionsmessung bei 340 nm ermittelt. Die Reaktionen fanden im 250 μ L-Maßstab bei 30 $^{\circ}$ C und pH 7,0 statt. Die detaillierten Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 4.5.7 aufgeführt.

D Sonstiges

D.1 IUPAC-Nomenklatur für Nukleinsäuren

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
A	A	S	G / C
T	T	W	A / T
G	G	H	A / C / T
C	C	B	G / T / C
R	G / A	V	G / C / A
Y	T / C	D	G / T / A
M	A / C	N	G / T / A / C
K	G / T		

D.2 IUPAC-Nomenklatur für Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code	Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A	Methionin	Met	M
Cystein	Cys	C	Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D	Prolin	Pro	P
Glutaminsäure	Glu	E	Glutamin	Gln	Q
Phenylalanin	Phe	F	Arginin	Arg	R
Glycin	Gly	G	Serin	Ser	S
Histidin	His	H	Threonin	Thr	T
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V
Lysin	Lys	K	Tryptophan	Trp	W
Leucin	Leu	L	Tyrosin	Tyr	Y