

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

# **Asymmetrische Synthesen mit phototrophen Mikroorganismen**

**Jan Michael Havel**

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. Hartmut Spliethoff  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz  
2. Univ.-Prof. Dr. rer.nat. habil. Siegfried Scherer

Die Dissertation wurde am 12.10.2006 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 12.12.2006  
angenommen.



## **Vorwort**

Diese Dissertation umfasst die Ergebnisse meiner Forschung der letzten vier Jahre auf dem Gebiet der phototropen Organismen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Weuster-Botz. Die hervorragende Ausstattung des Lehrstuhls und die Unterstützung durch die technischen Mitarbeiter waren für den erfolgreichen Abschluss meiner Arbeit ausschlaggebend. Das interdisziplinäre Umfeld und das gute Arbeitsklima lieferten die besten Voraussetzungen.

Diese Arbeit ist unter Mitwirkung von unterschiedlichen Personen entstanden und ich möchte mich auf diesem Wege bei allen herzlich Bedanken:

Bei Herrn Professor Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz, der mir die Möglichkeit gab, an seinem erstklassigem Lehrstuhl zu promovieren und mich die gesamte Zeit stets ausgezeichnet unterstützte. Sein Führungsstil schuf eine angenehme und persönliche Atmosphäre in der es eine Freude war zu arbeiten.

Beim Co-Referenten Herrn Professor Dr. rer. nat. Siegfried Scherer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, FML Weihenstephan) für die beratende Unterstützung in der Anfangsphase meiner Arbeit sowie dem Vorsitzenden Herrn Professor Dr.-Ing. Hartmut Spliethoff für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Bei Frau Dr. rer. nat. Monika Ehling-Schulz (Lehrstuhl für Mikrobiologie, FML Weihenstephan) für den sehr hilfreichen sowie freundlichen Informationsaustausch und für die zur Verfügung gestellten Stämme *Anabaena variabilis* und *Nostoc muscorum*.

Bei Herrn Dr.-Ing. Ezequiel Franco-Lara (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, TUM) für die sehr angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit bei der Modellierung sowie der Medienoptimierung.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Martin Haslbeck (Lehrstuhl für Biotechnologie, TUM) für Bereitstellung von Rat und Laborgeräten sowie für die Durchführung des Proteinfingerprints.

Bei Herrn Florian Steinbacher (Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, Weihenstephan) für die Leihgabe der Quantumsensoren.

Bei Herrn Dr.-Ing. Holger Pfründer (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, TUM) für die Bereitstellung der Daten von *Saccharomyces cerevisiae* und *Lactobacillus kefir*.

Bei meinen Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für die Unterstützungen fachlicher und persönlicher Art, die einem das Leben einfacher und schöner machten.

Bei allen meinen Studenten für die tatkräftige Mitarbeit an meinem Projekt.

Bei Kathrin, Andrea und Franco für das genaue Korrekturlesen meiner Dissertation.

Bei allen Freunden und Verwandten die in harten Zeiten zu mir standen.

Und bei Andrea, für die größte aller Unterstützungen.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1 Biologische Grundlagen von Cyanobakterien</b> .....	<b>5</b>
3.1.1 Zellaufbau .....	6
3.1.2 Der phototrophe Metabolismus .....	7
3.1.3 Der Metabolismus im Dunkeln .....	8
3.1.4 Industrielle Massenproduktion .....	11
3.1.5 Wachstum von Cyanobakterien .....	13
3.1.6 Modellierung des Wachstums phototropher Mikroorganismen .....	20
<b>3.2 Asymmetrische Synthesen</b> .....	<b>23</b>
3.2.1 Ganzzellbiokatalyse .....	24
3.2.2 Prozessgrößen bei der Ganzzellbiokatalyse .....	24
3.2.3 Herstellung chiraler Alkohole mittels Oxidoreduktasen .....	26
3.2.4 Biotransformation schlecht wasserlöslicher und toxischer Edukte .....	29
3.2.5 Einfluss der Membranintegrität auf Ganzzellbiokatalysen .....	30
<b>3.3 Oxidoreduktase-aktive Multienzymkomplexe</b> .....	<b>31</b>
3.3.1 Elektronentransportkette der Photosynthese .....	31
3.3.2 Fettsäure-Synthetasen .....	32
3.3.3 Polyketid-Synthetasen und nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen .....	34
<b>3.4 Proteinidentifikation</b> .....	<b>35</b>
3.4.1 Proteinreinigung .....	35
3.4.2 Der „reverse genetics“ Ansatz .....	36

<b>4 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1 Material</b> .....	<b>37</b>
<b>4.2 Allgemeine Labormethoden</b> .....	<b>37</b>
4.2.1 pH-Messung.....	37
4.2.2 Herstellung von Pufferlösungen .....	37
4.2.3 Photometrische Glukoseanalytik.....	37
4.2.4 Photometrische Acetatanalytik.....	38
4.2.5 Bestimmung der optischen Dichte.....	38
4.2.6 Bestimmung der Biotrockenmasse.....	38
4.2.7 Lichtspektrum und Intensitätsmessungen .....	39
4.2.8 Ultrazentrifugation .....	39
4.2.9 Dialyse .....	39
4.2.10 Diaphoraseaktivität.....	40
4.2.11 In-vitro-Ketonreduktion.....	40
<b>4.3 Cyanobakterienstämme und Stammhaltung</b> .....	<b>41</b>
4.3.1 <i>Synechococcus</i> PCC7942 .....	41
4.3.2 <i>Anabaena variabilis</i> .....	41
4.3.3 <i>Nostoc muscorum</i> .....	41
4.3.4 Dauerkulturformen zur Stammhaltung .....	42
4.3.5 Industrielle phototrophe Organismen .....	42
<b>4.4 <i>E. coli</i> Stämme und Stammhaltung</b> .....	<b>43</b>
4.4.1 <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	43
4.4.2 <i>E. coli</i> JM109 (DE3) .....	43
4.4.3 <i>E. coli</i> XL Gold .....	43
4.4.4 Stammhaltung.....	43
4.4.5 Kultivierung in Schüttelkolben .....	44
<b>4.5 Kultivierung von Cyanobakterien</b> .....	<b>44</b>
4.5.1 Kultivierung in gerührten Kolben .....	44
4.5.2 Kultivierung in 250 mL Blasensäulen .....	45
4.5.3 Kultivierung im 20 L Rührkesselreaktor.....	46
4.5.4 Kultivierung im 1 mL Reaktor.....	47

---

<b>4.6 Wachstumskinetische Untersuchungen in Blasensäulen .....</b>	<b>48</b>
4.6.1 Kultivierungsbedingungen .....	48
4.6.2 Modellentwicklung der Absorption .....	49
4.6.3 Modellentwicklung der Kinetik .....	50
4.6.4 Simulationswerkzeuge .....	51
<b>4.7 Wachstumskinetische Untersuchungen im Rührkesselreaktor .....</b>	<b>52</b>
4.7.1 Kultivierungsbedingungen .....	52
4.7.2 Modellentwicklung der Absorption .....	52
4.7.3 Lichtmessungen im Reaktor .....	53
4.7.4 Modellentwicklung der Kinetik .....	53
4.7.5 Parameterbestimmung .....	54
4.7.6 Modellgestützte Kultivierung .....	54
<b>4.8 Physiologische Messungen .....</b>	<b>55</b>
4.8.1 Photometrische Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate .....	55
4.8.2 Photometrische Bestimmung der Membranintegrität .....	55
4.8.3 Teilungsfähigkeit .....	56
<b>4.9 Medienoptimierung .....</b>	<b>56</b>
4.9.1 Kultivierung .....	57
4.9.2 Biotransformation in der Medienoptimierung .....	57
4.9.3 Optimierungsparameter VEGA .....	58
4.9.4 Optimierungsparameter SPEA .....	59
<b>4.10 Durchführung der Biotransformation .....</b>	<b>59</b>
4.10.1 Biotransformation im gasdichten Analysesystem .....	59
4.10.2 Biotransformation in 100 mL gasdichten Reaktoren .....	60
4.10.3 Kinetische Untersuchung der Ganzzellbiotransformation .....	60
4.10.4 Biotransformationen mit ionischen Flüssigkeiten in 2 mL Reaktoren .....	61
<b>4.11 Gaschromatographische Analytik von Edukten und Produkten .....</b>	<b>62</b>
4.11.1 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie .....	62
4.11.2 Chirale GC Analytik von PFAP und PFE .....	63
4.11.3 Achirale GC Analytik von PFAP und PFE .....	63
4.11.4 Chirale GC Analytik von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE .....	64

4.11.5 Chirale GC Analytik von EBA und HPPE .....	64
4.11.6 Chirale GC Analytik von 4-Cl-ACE und CHBE .....	64
<b>4.12 SDS-PAGE.....</b>	<b>64</b>
4.12.1 Coomassie Färbung.....	65
4.12.2 Silberfärbung.....	65
<b>4.13 Zellaufschluss.....</b>	<b>66</b>
4.13.1 French Press.....	66
4.13.2 Schwingmühle.....	66
4.13.3 Ultraschall .....	67
<b>4.14 Präparative FPLC.....</b>	<b>67</b>
4.14.1 Ionenaustauschchromatographie .....	67
4.14.2 Gelfiltration .....	68
<b>4.15 Klonierung der FNR.....</b>	<b>68</b>
<b>4.16 Proteinfingerprint .....</b>	<b>69</b>
4.16.1 Probenvorbereitung.....	69
4.16.2 Trennparameter der SDS-PAGE.....	70
4.16.3 Coomassie-Mischfärbung .....	70
<b>4.17 In-silico-Sequenzanalyse .....</b>	<b>71</b>
<b>5 PROZESSENTWICKLUNG ZUR HERSTELLUNG VON SYNECHOCOCCUS</b>	
<b>PCC7942.....</b>	<b>72</b>
<b>5.1 Untersuchungen zu den primären Anzuchtbedingungen .....</b>	<b>72</b>
5.1.1 Parameterstudie zur Kultivierung von <i>Synechococcus</i> PCC7942.....	72
5.1.2 Reaktivierungsverfahren von Festkulturzellen .....	74
5.1.3 Anzucht in gerührten Kolben.....	76
5.1.4 Diskussion.....	77
<b>5.2 Reaktionstechnische Untersuchungen zur Anzucht in Blasensäulen.....</b>	<b>78</b>
5.2.1 Geeignete Lichtversorgung .....	78
5.2.2 Wachstumskinetische Untersuchungen in 250 mL Blasensäulen .....	79
5.2.3 Entwicklung eines Absorptionsmodells .....	81

5.2.4 Modellentwicklung für 250 mL Blasensäulen .....	82
5.2.5 Diskussion.....	84
<b>5.3 Reaktionstechnische Untersuchungen zur Anzucht in Rührkesselreaktoren</b> .....	<b>85</b>
5.3.1 Beleuchtungsstudie im 20 L Rührkesselreaktor .....	86
5.3.2 Entwicklung eines Absorptionsmodells .....	87
5.3.3 Wachstumskinetische Untersuchungen im Rührkesselreaktor .....	89
5.3.4 Modellgestützte Kultivierung im 20L-Rührkesselreaktor .....	91
5.3.5 Qualität von Zellen in Rührkesselreaktoren als Biokatalysator .....	94
5.3.6 Vergleichende Kultivierungsstudie verschiedener Cyanobakterienstämme .	95
5.3.7 Diskussion.....	95
<b>5.4 Medienoptimierung.....</b>	<b>98</b>
5.4.1 Parameterstudie zu Medienkomponenten.....	99
5.4.2 Medienoptimierung mit genetischen Algorithmen .....	100
5.4.3 Validierung ausgesuchter Medien .....	102
5.4.4 Diskussion.....	103
<b>5.5 Optimiertes Anzuchtverfahren zur Kultivierung von <i>Synechococcus</i></b> <b>PCC7942.....</b>	<b>104</b>
<b>6 ASYMMETRISCHE SYNTHESE VON (S)-1-PENTAFLUOR(PHENYL)-ETHANOL</b> .....	<b>106</b>
<b>6.1 <i>In-vitro</i> Biotransformation mit Zellhomogenat.....</b>	<b>106</b>
6.1.1 Kofaktorregenerierung mit Glukose als Kosubstrat.....	106
6.1.2 Optimierung der in-vitro-Biotransformation .....	107
6.1.3 Diskussion.....	108
<b>6.2 Einfluss von Umweltbedingungen auf die Ganzzellbiokatalyse.....</b>	<b>109</b>
6.2.1 Löslichkeitsverhalten.....	109
6.2.2 Licht .....	109
6.2.3 Glukose.....	110
6.2.4 Temperatur .....	112
6.2.5 pH .....	112
6.2.6 Diskussion.....	113

<b>6.3 Metabolische Untersuchungen der Biotransformation mit ganzen Zellen</b>	<b>116</b>
6.3.1 Nachweis einer fermentativen Biotransformation.....	116
6.3.2 Vergleichende Studie zur Fermentation in unterschiedlichen Cyanobakterienstämmen .....	118
6.3.3 Diskussion.....	120
<b>6.4 Ganzzellbiotransformation in 2-Phasensystemen.....</b>	<b>122</b>
6.4.1 Lebensfähigkeit ganzer Zellen mit organischen Lösungsmitteln .....	122
6.4.2 Lebensfähigkeit ganzer Zellen mit ionischen Flüssigkeiten.....	122
6.4.3 Umsetzungen in ionischen Flüssigkeiten .....	123
6.4.4 Diskussion.....	124
<b>7 ASYMMETRISCHE SYNTHESSEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN CYANOBAKTERIEN.....</b>	<b>126</b>
<b>7.1 Produkte .....</b>	<b>126</b>
7.1.1 Synthese von (S)-1-Pentafluor(phenyl)-ethanol .....	126
7.1.2 Synthese von Ethyl-S-4-chlor-3-hydroxybutyrat.....	127
7.1.3 Synthese von (+)-Ethyl-3-hydroxy-3-phenylpropionat .....	128
7.1.4 Synthese von (S)-1-(4-Chlorphenyl)-ethanol.....	129
7.1.5 Diskussion.....	130
<b>7.2 Einsatz kommerzieller phototropher Mikroorganismen.....</b>	<b>132</b>
7.2.1 Untersuchungen mit der Mikroalge <i>Chlorella vulgaris</i> .....	132
7.2.2 Untersuchungen mit <i>Nostoc spp.</i> .....	132
7.2.3 Lagerstabilität gefriergetrockneter Zellen. ....	132
7.2.4 Diskussion.....	133
<b>8 IDENTIFIKATION DER OXIDOREDUKTASE IN SYNECHOCOCCUS PCC7942 .....</b>	<b>134</b>
<b>8.1 Untersuchungen im Zelllysat und Primärreinigung.....</b>	<b>134</b>
8.1.1 Lokalisation der nativen Oxidoreduktase .....	134
8.1.2 Freisetzung der Oxidoreduktase .....	135
8.1.3 Primärreinigung.....	136
8.1.4 Diskussion.....	137

<b>8.2 Die Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase.....</b>	<b>138</b>
8.2.1 Reinigung.....	138
8.2.2 Klonierung.....	139
8.2.3 Expression.....	140
8.2.4 Diskussion.....	140
<b>8.3 Identifikation der nativen Oxidoreduktase .....</b>	<b>140</b>
8.3.1 Zellaufschluss und Vorklärung des Homogenats.....	140
8.3.2 Präparative FPLC.....	141
8.3.3 Proteinfingerprint.....	142
8.3.4 Diskussion.....	142
<b>8.4 <i>In-silico</i> Analyse .....</b>	<b>144</b>
8.4.1 Proteininstabilität .....	145
8.4.2 Proteinfaltung.....	145
8.4.3 Enzymkinetische Daten homologer Enzyme.....	146
8.4.4 Diskussion.....	147
<b>9 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>148</b>
<b>10 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>152</b>
<b>11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>170</b>
<b>12 ANHANG .....</b>	<b>176</b>
<b>12.1 Geräte, Chemikalien, Puffer, Kultivierungsmedien.....</b>	<b>176</b>
12.1.1 Allgemeine Laborgeräte .....	176
12.1.2 SDS-Page .....	179
12.1.3 Parallelisiertes Kultivierungssystem für 100 mL Reaktoren .....	181
12.1.4 Paralleles Blasensäulenreaktorsystem .....	183
12.1.5 20 L-Rührkesselreaktor.....	184
12.1.6 1 mL Reaktorsystem .....	185
12.1.7 Chemikalien .....	185
12.1.8 Kultivierungsmedien.....	189
12.1.9 Puffer .....	190

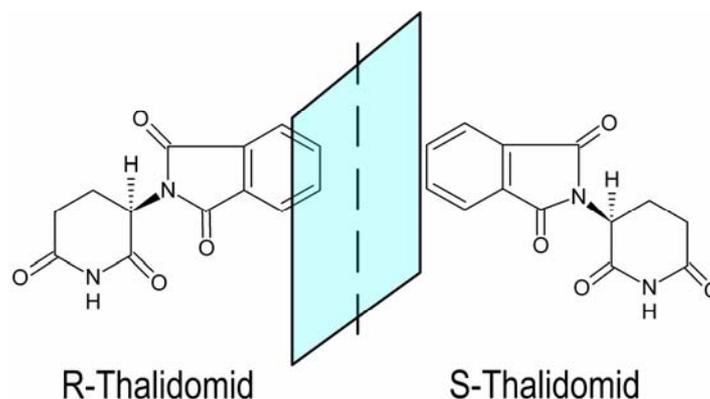
<b>12.2 Molekularbiologie .....</b>	<b>191</b>
12.2.1 Isolation genomischer DNA.....	191
12.2.2 PCR .....	191
12.2.3 Restriktion .....	192
12.2.4 Ligation .....	193
12.2.5 Transformation.....	193
12.2.6 Expression in E. coli.....	193
12.2.7 Agarosegelelektrophorese .....	193
12.2.8 Plasmidisolaton .....	194
<b>12.3 Enzymatische Tests .....</b>	<b>194</b>
12.3.1 Glukose-Kit .....	194
12.3.2 Acetat-Kit .....	195
12.3.3 Anthronreaktion.....	196
<b>12.4 Ergebnisse der Medienoptimierung.....</b>	<b>197</b>
<b>12.5 Ergebnisse der metabolischen Untersuchungen .....</b>	<b>200</b>
12.5.1 Teilungsfähigkeit von <i>Synechococcus</i> PCC7942 bei Biotransformationen .....	200
12.5.2 Teilungsfähigkeit von <i>Nostoc muscorum</i> bei Biotransformationen .....	200
12.5.3 Teilungsfähigkeit von <i>Anabaena variabilis</i> bei Biotransformationen .....	201
12.5.4 Morphologie von Cyanobakterien nach Biotransformationen.....	201
12.5.5 Morphologie von Flüssigkulturen mit Cyanobakterien.....	202
<b>12.6. Ergebnisse der Proteinreinigung .....</b>	<b>203</b>
12.6.1 Molekulargewichtsbestimmung mit Gelfiltration .....	203
12.6.2 Ammoniumsulfatfällung.....	203

## 1 Einleitung

Weltweit nehmen Resistenzen von pathogenen Organismen gegenüber Antibiotika zu und die Menschheit steht an der Schwelle den Kampf gegen diese Bakterien zu verlieren. Die deshalb neu benötigten Wirkstoffe werden durch die Modifikation bereits bestehender Medikamente bereitgestellt (Nicolau *et al.*, 1999). Die Pharmaindustrie zeigt einen jährlich wachsenden Bedarf von 7-8 % an neuen organischen Molekülen als Bausteine für das Medikamentendesign (Breuer *et al.*, 2004). Daher wird eine immer weiter gefächerte Palette von Wirkstoffen mit spezifisch inhibitorischen Wirkungen zur Entwicklung von pharmakologischen Stoffen und Agrochemikalien erforscht. Etwa 80 % der Wirkstoffe in der Produktpipeline der Pharmafirmen sind chiral und werden über asymmetrische Synthesen hergestellt (Breuer *et al.*, 2004). Besonders wichtig sind dabei chirale Alkohole, Hydroxysäuren und deren Ester (Eckstein, 2004).

Bei asymmetrischen Synthesen entstehen stets Moleküle mit spiegelbildlichen Strukturen, die als Enantiomere bezeichnet werden. Sie zeigen ein gleiches physikalisches Verhalten und reagieren mit achiralen Substanzen in nicht unterscheidbarer Weise.

Biochemisch kann ihre Wirkung jedoch deutlich unterschiedlich sein. Beispielsweise sind im Pflanzenschutz von den Phenoxyprop-Herbiziden nur die (R)-Enantiomere wirksam. Einen besonders dramatischen Effekt zeigte das Medikament Contergan<sup>®</sup>, das mit dem Wirkstoff Thalidomid 1958 im Handel war (Abbildung 1.1). Während das (R)-Enantiomer aufgrund seiner beruhigenden Wirkung auf den Organismus Schwangeren verabreicht wurde, verursachte das zugleich eingenommene (S)-Enantiomer eine teratogene Wirkung, die bei Neugeborenen Missbildungen der Gliedmaßen hervorrief (Blaschke, 1979).



**Abbildung 1.1:** Beide Enantiomere des Contergan<sup>®</sup>-Wirkstoffes

Seit diesem Vorfall wurden die Auflagen für die Pharmaindustrie verschärft. Als Konsequenz wird die Unbedenklichkeit beider Enantiomere oder eine reine chirale Substanz als Produkt

## 2 Einleitung

---

vorausgesetzt. Dies wird durch Richtlinien von Kontrollbehörden wie beispielsweise der FDA (*Food-and-Drug-Administration, USA*) gewährleistet.

Die Hauptprobleme der asymmetrischen Synthese mittels nasschemischer Verfahren sind häufig aggressive Reaktionsbedingungen, toxische Katalysatoren und die meist geringe Selektivität der Reaktion für das gewünschte Enantiomer. Folglich muss das gewünschte Produkt über teure Aufarbeitungsprozesse angereichert werden.

Eine Alternative bieten biologische Verfahren zur asymmetrischen Synthese über enzymatische Katalysen, die meist enantiomerenreine Produkte bilden. Die einfache Herstellung und Entsorgung von Biokatalysatoren ist ein großer Vorteil der Verfahren der so genannten weißen Biotechnologie, die von der grünen Biotechnologie der Pflanzen und der roten Biotechnologie mit Gewebekulturen abzugrenzen ist.

Einer Studie von Frost und Sullivan zur Folge wird erwartet, dass die Biokatalyse zur Herstellung von Produkten von 10 % im Jahr 2002 bis ins Jahr 2009 auf 22 % steigen könnte (Widmer, 2003). Derzeit werden etwa 130 Biokatalysen industriell genutzt. Biotechnologische Verfahren werden von der Industrie auf einen Marktanteil von 50 Mrd. US\$ im Bereich der Feinchemikalien geschätzt und sollen auf einen Anteil von bis zu 200 Mrd. US\$ in den nächsten 10-20 Jahren steigen (Becker *et al.*, 2005).

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Enantiomerenreine Moleküle als Bausteine für Wirkstoffe können durch den Einsatz von Enzymen oder Biotransformationen mit ganzen Zellen mit hohen Reaktionsgeschwindigkeiten unter milden Reaktionsbedingungen hergestellt werden. Dabei werden nicht selten chirale Substanzen gebildet, die chemischen Synthesen nicht zugänglich sind. In zunehmendem Maße werden Wildtypen und gentechnisch veränderte Mikroorganismen mit Oxidoreduktasen zur Produktion von z.B. chiralen Alkoholen aus prochiralen Ketonen eingesetzt.

Die breite Mehrheit von Mikroorganismen ist aufgrund ihrer mangelnden Spezifität für nicht natürliche Substanzen sowie ihrer geringen Aktivität biotechnologisch nicht verwertbar. Es besteht daher ein großer Bedarf an geeigneten Organismen mit der Fähigkeit zur asymmetrischen Reduktion von Ketonen mit hoher Stereoselektivität, um die vorhandenen Synthesemöglichkeiten zu erweitern.

Eine viel versprechende weitgehend noch unerschlossene Organismengruppe für asymmetrische Synthesen sind Cyanobakterien. In den letzten drei Jahrzehnten wurden nur wenige Untersuchungen zu asymmetrischen Synthesen mit Cyanobakterien publiziert (Jüttner und Hans, 1986; Noma und Asakawa, 1992; Nakamura *et al.*, 2000; Shimoda *et al.*, 2004). Darunter befinden sich hoch stereoselektive Ketonreduktionen mit dem Cyanobakterium *Synechococcus* PCC7924 mit halogenierten aromatischen Alkoholen als Produkt, z.B. S-Pentafluor(phenyl)-ethanol (Nakamura *et al.*, 2000). Alle berichteten Reaktionen waren Photobiokatalysen, bei denen die verbrauchten Reduktionsäquivalente für die asymmetrische Synthese mittels Photosynthese regeneriert wurden. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung einer industriellen Nutzung phototropher Mikroorganismen zur asymmetrischen Synthese chiraler Alkohole und die Erforschung alternativer Kofaktorregenerationswege zur Photosynthese.

Um einen Prozess mit Photobiokatalysen industriell umzusetzen, sind kompliziert aufgebaute Photobioreaktoren notwendig. Derartige Reaktoren sind in der chemischen Industrie nicht üblich. Aufgrund des schlechten Lichteintrags in dichte Kulturen ist eine Prozessführung mit Photobiokatalysen im Vergleich zu Prozessen mit heterotrophen Biokatalysatoren problematisch. Daher ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Identifikation des für die Ketonreduktion verantwortlichen Enzyms aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* PCC7942, um dieses einer Nutzung in gentechnisch veränderten Produktionsorganismen zugänglich zu machen.

Die Herstellung von Cyanobakterien als Ganzzellbiokatalysatoren ist aufgrund geringer Wachstumsraten der phototrophen Mikroorganismen ein zeitintensiver Prozess. Ein Problem

#### 4 Problemstellung und Zielsetzung

---

ist, dass großflächige Reaktoren für eine gute Lichtausbeute im Labormaßstab schlecht einsetzbar sind und für kleinere Reaktoren wie beleuchtete Rührkesselreaktoren keine adäquaten Kultivierungsverfahren zur Verfügung stehen. Hieraus folgt die Entwicklung eines optimierten Kultivierungsprozesses zur Herstellung des Cyanobakteriums *Synechococcus* PCC7942 in einem extern beleuchteten 20L-Rührkesselreaktor als weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.

Zur Lösung dieser Fragestellungen waren folgende Schritte notwendig:

- Entwicklung eines effizienten und reproduzierbaren Prozesses zur technischen Herstellung von *Synechococcus* PCC7942
- Reaktionstechnische Untersuchungen zur Synthese von S-Pentafluor(phenyl)-ethanol mit *Synechococcus* PCC7942
- Reaktionstechnische Untersuchung zu asymmetrischen Synthesen mit weiteren Cyanobakterien und Mikroalgen
- Isolierung und Identifikation der verantwortlichen Oxidoreduktase in *Synechococcus* PCC7942

### 3 Theoretische Grundlagen

Im folgenden Kapitel werden die biologischen Grundlagen und die daraus resultierenden Möglichkeiten der Massenproduktion von phototrophen Mikroorganismen erläutert. In diesem Zusammenhang wird die Verwendung ganzer Zellen für Biokatalysen in Bezug auf den Stand der Technik beschrieben.

Abschließend erfolgt eine Darstellung der technischen Nutzung von Enzymen aus phototrophen Mikroorganismen und möglicher Verfahren zu deren Identifikation.

#### 3.1 Biologische Grundlagen von Cyanobakterien

Cyanobakterien (Cyanophyta), oft auch als Blaualgen bezeichnet, gehören zu einer großen Gruppe phototropher Prokaryonten, die durch aerobes, oxigenes und phototrophes Wachstum charakterisiert sind. Nur wenige Arten sind fähig photoheterotroph oder heterotroph zu wachsen (Schlegel, 1992; Pulz und Gross, 2004).

Ihre Photosynthesepigmente Chlorophyll a, Phycocyanine und Phycoerythrine verleihen den Zellen die typische blau-grüne Färbung (Nultsch, 1996; Pulz und Gross, 2004). Da die Cyanobakterien vor allem aufgrund des Photosyntheseapparates einige physiologische Gemeinsamkeiten mit Pflanzen besitzen, wurden sie früher fälschlicherweise den Algen zugeordnet. Folglich ist die Systematik dieser Mikroorganismen einem ständigen Wandel unterworfen (Pulz und Gross, 2004).

Cyanobakterien sind weitgehend unerforscht. Bislang sind 2000 Arten in 150 Gattungen aufgeteilt (Pulz und Gross, 2004). Heute bilden sie die größte Untergruppe der gram-negativen Bakterien (Rippka *et al.*, 1979), mit deren Zellwandbeschaffenheit, Ribosomen und Zellstruktur sie weitgehend übereinstimmen (Schlegel, 1992; Nultsch, 1996).

Die anerkannteste Systematik unterteilt die Cyanobakterien in vier Gruppen. Während einzellige Cyanobakterien, wie z.B. *Synechococcus* PCC7942, die sich nur durch binäre Teilung oder Knospung vermehren, der Gruppe der *Chroococcales* zugehören, bestehen drei weitere Gruppen aus heterozystischen Cyanobakterien, die aufgrund ihrer fadenförmigen Trichome und unterschiedlich differenzierten Zellen unterschieden werden (Rippka *et al.*, 1979; Pulz und Gross, 2004). Heterozystische Cyanobakterien sind in der Lage atmosphärischen Stickstoff zu assimilieren und gehören zu Pionierorganismen an extremen und nährstoffarmen Standorten. Unter ihnen befinden sich extremophile Arten, die bei pH 4 in heißen Quellen mit 70°C (Schlegel, 1992) oder in Alkaliseen wachsen.

Ein Grund für die Dominanz der Cyanobakterien über andere Algen ist ihre extrem schnelle Nährstoffaufnahme. Phosphat wird als Polyphosphatgranula, Stickstoff in Form von

Cyanophycin (Polymer aus Aspartat) und Kohlenstoff in Form von Glykogengranula als Energiespeicher gelagert (Schlegel, 1992; Pulz und Gross, 2004).

### **3.1.1 Zellaufbau**

Trotz der Zuordnung der Cyanobakterien zu den gram-negativen Bakterien ist ihre Peptidoglykanschicht wesentlich dicker und daher anfärbbar. Ein weiterer Unterschied besteht in der Zusammensetzung der Lipopolysaccharide der äußeren Membran (Nultsch, 1996).

#### **Zellmembran**

Die Zellmembran ist für die Kohlenstoffassimilation von unterschiedlich affinen Transportern für Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Hydrogenkarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) durchsetzt. Das System aus Transportern wird als *carbon concentration mechanism* (CCM) zusammengefasst und sorgt passiv oder aktiv für hohe lokale Konzentrationen an Kohlenstoff in kleinen polyedrischen Vesikeln, den Carboxysomen (Nultsch, 1996). Ein zentrales Enzym im Kohlenstoff-Metabolismus ist die Carboanhydrase, die meist in den Carboxysomen für eine Versorgung der Dunkelreaktion mit  $\text{CO}_2$  aus  $\text{HCO}_3^-$  sorgt (Ogawa und Kaplan, 2003). Isoenzyme der Carboanhydrase wandeln  $\text{CO}_2$  beim Eintritt in die Zelle in  $\text{HCO}_3^-$  um und verhindern einen Verlust von Kohlenstoff über die Zellmembran.

#### **Thylakoidmembran**

Die Thylakoide sind Invaginationen der Cytoplasmamembran und liegen als Membranstapel vor. Während Chlorophyll a und Carotinoide in der Membran integriert sind, befinden sich auf ihrer Oberfläche große Multiproteinkomplexe von 5000 - 20000 kDa, die Lichtsammelfallen (Wehrmeyer, 1983; Nultsch, 1996). Aufgrund des hohen Biliproteingehaltes (Chromoproteine mit kovalent gebundenen offenkettigen Tetrapyrrolen) werden diese Komplexe als Phycobilisomen bezeichnet und unterscheiden sich deutlich von den Lichtsammelkomplexen höherer Pflanzen. Sie bestehen in der Regel zu 75 % aus Phycocyanin (blau), 12 % Allophycocyanin, Phycoerythrin (rot) sowie einigen farblosen Polypeptiden und liegen hexamer gebündelt vor (Schlegel, 1992).

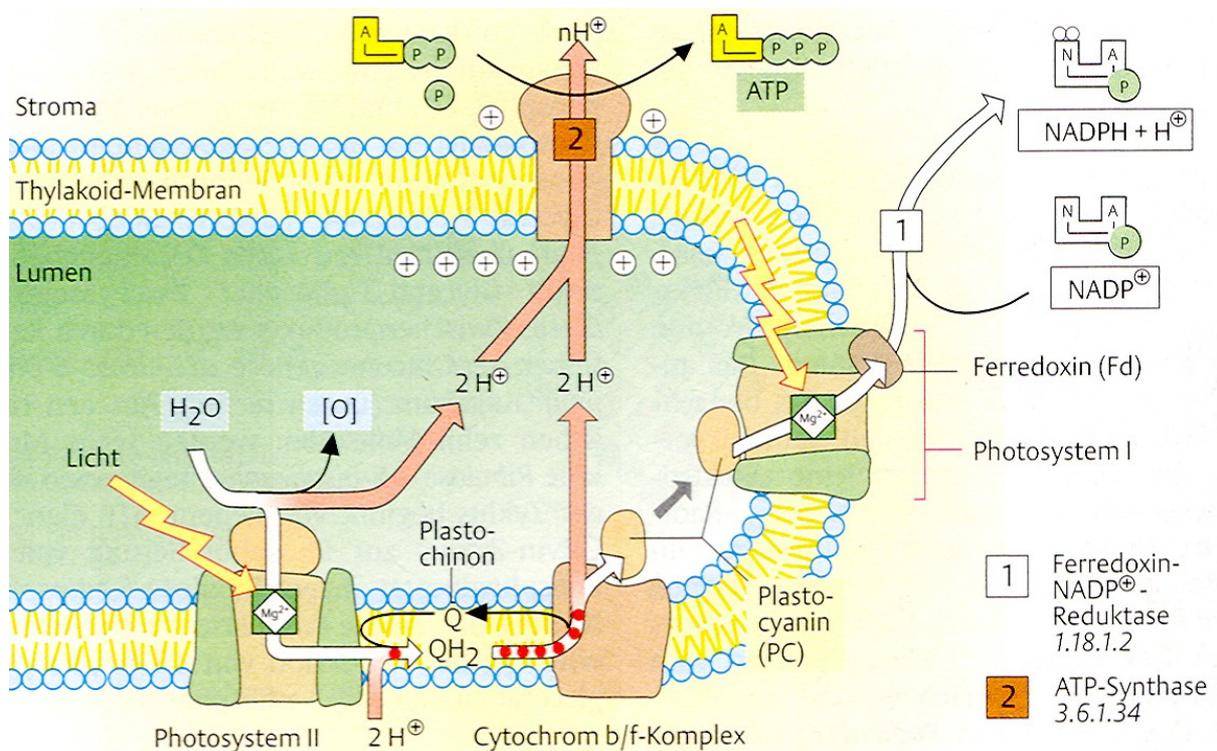
Die Phycobilisomen können bis zu 50 % der Gesamtproteinmenge einer Zelle ausmachen und stammabhängig je nach Lichtfarbe und Lichtintensität in ihrer Pigmentzusammensetzung umgestaltet werden. Dies wird als chromatische Adaption bezeichnet (Schlegel, 1992). Die kleinste Einheit dieser hoch symmetrischen Gebilde besteht aus ringförmigen Trimeren (Mörschel *et al.*, 1980), die über eine Phycobilisomen-linker (CpcD)-Domäne mit der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (FNR) verbunden sind

(Nakajima *et al.*, 2002). Neben ihrer Funktion in der Photosynthese dienen die Biliproteine als Phosphat- und Stickstoffspeicher (Allen und Smith 1969; Eley 1971; Lau *et al.*, 1977).

### 3.1.2 Der phototrophe Metabolismus

Unter Photosynthese wird die Umwandlung von Lichtenergie in biochemisch verwertbare Energie und Reduktionskraft in den Zellen phototropher Organismen sowie die damit betriebene Synthese von Zellbestandteilen verstanden. Die photosynthetische Phosphorylierung und die photosynthetische Pyridinnucleotidreduktion sind Elementarprozesse der Photosynthese (Schlegel, 1992).

Wie bei höheren Pflanzen findet die aerobe oxigene Photosynthese in Cyanobakterien an den Photosynthesezentren (PS) I und II der Thylakoidmembran statt (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1:** Vereinfachtes Reaktionsschema der biochemischen Prozesse an der Thylakoidmembran (Koolman und Röhm, 2003).

Über die peripher angeordneten Phycobilisomen wird die Energie von Lichtquanten der Wellenlängen 550-650 nm durch Resonanz- bzw. Excitonenübertragung auf die beiden chlorophyllhaltigen Photosynthesezentren übertragen, wobei in erster Linie PS II mit Energie versorgt wird. Das Absorptionsmaximum von Chlorophyll a liegt bei einer Wellenlänge von 680 bis 685 nm und beliefert nur das PS I mit Energie. Der Elektronentransport zwischen den Photosystemen erfolgt über den Plastochinonpool, der als reduktiver Speicher für die vom Chlorophyll freigesetzten Elektronen fungiert (Schlegel, 1992).

## 8 Theoretische Grundlagen

---

PS I und PS II arbeiten zusammen als treibende Kräfte des Elektronentransports von Wassermolekülen auf oxidiertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP<sup>+</sup>) (Nultsch, 1996). PS I dagegen versorgt alleine den zyklischen Elektronentransport mit Energie.

Die Photolyse des Wassers und die Reduktion von NADP<sup>+</sup> binden einen Teil der absorbierten Lichtenergie. Ein anderer Teil der Energie wird zum Aufbau eines elektrochemischen Protonen-Gradienten über der Thylakoidmembran genutzt. Der Protonengradient führt zur Regenerierung von Adenosintriphosphat (ATP) durch einen Fluss von Protonen aus dem Thylakoidinnenraum über die ATP-Synthase. Dieser Prozess wird als Photophosphorylierung bezeichnet (Nultsch, 1996).

### ***Photorespiration und Photobleaching***

Unter bestimmten Reaktionsbedingungen, z.B. hohem Sauerstoffpartialdruck oder geringem CO<sub>2</sub>-Partialdruck, kann es zu Verlustzyklen (*futile cycles*) wie Photorespiration kommen. Photorespiration ist ein Stoffwechselweg, bei dem unter Sauerstoffaufnahme eine CO<sub>2</sub>-Abgabe beobachtet wird und der bis zu 50 % der reduktiven Kraft der Photosynthese ableiten kann. Er soll die Photosynthesezentren vor Überlastung schützen (Nultsch, 1996; Richter, 1998). Verantwortlich für diesen Effekt ist die Oxigenaseaktivität der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase (Rubisco). Sie oxidiert Ribulose-1,5-Bisphosphat mit molekularem Sauerstoff zu 3-Phosphoglycerinsäure und Phosphoglycolsäure. Photorespiration tritt vor allem bei hohen Temperaturen auf (Pulz, 2001).

Zu hohe Lichtintensitäten führen außerdem zum photochemischen Ausbleichen der akzessorischen Pigmente und zur Zerstörung der Komponenten des wasserspaltenden Komplexes. Dieser Prozess wird als *photo bleaching* bezeichnet (Suh und Lee, 2001).

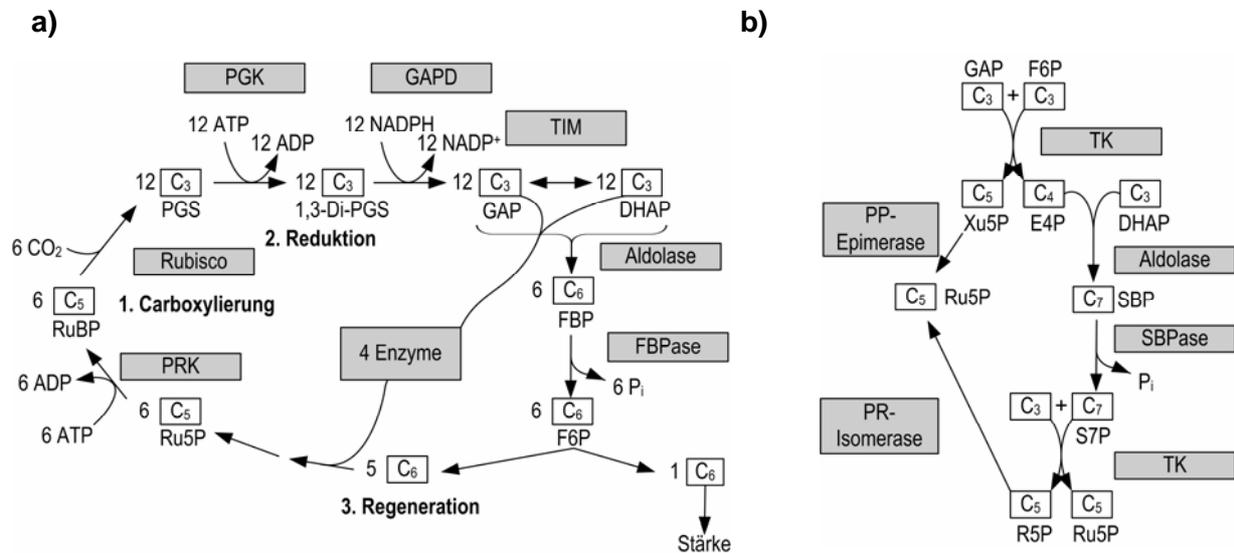
### **3.1.3 Der Metabolismus im Dunkeln**

Ein lichtunabhängiger Teil der Photosynthese wird als Calvin-Zyklus bezeichnet. Er dient der Assimilation von CO<sub>2</sub> zur Bildung von Hexosen. Im Calvin-Zyklus werden sechs CO<sub>2</sub>-Moleküle mit ATP als Energiequelle und NADPH als Reduktionsmittel zu Glukose umgesetzt (Abbildung 3.2).

Ein Schlüsselenzym dieser Reaktion ist die Rubisco. Sie katalysiert die Reaktion des C<sub>5</sub>-Körpers Ribulose-1,5-Bisphosphat mit CO<sub>2</sub>, um zwei C<sub>3</sub>-Körper 3-Phosphoglycerat zu bilden. Unter Verbrauch von NADPH und ATP wird schließlich Fruktose-6-Phosphat gebildet. Die Rubisco hat eine geringe Affinität zu CO<sub>2</sub> und verursacht bei steigendem Sauerstoffpartialdruck durch ihre Oxigenaseaktivität die Photorespiration. Die Affinität ist so gering, dass bei einem atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Partialdruck keine Reaktion abläuft (Raven, 2003). Deshalb befindet sich das Enzym in den Carboxysomen, in denen es durch die

benachbarte Carboanhydrase mit einem hohen  $\text{CO}_2$ -Partialdruck versorgt wird, um das Reaktionsgefälle in Richtung des 3-Phosphoglycerats zu verschieben (Badger, 2003).

Während der Photosynthese inaktiviert reduziertes Ferredoxin die 6-Phosphofruktokinase und unterdrückt damit die Glykolyse (Michal, 1999).



**Abbildung 3.2:** Die wichtigsten Reaktionen im Calvin-Zyklus: Carboxylierung, Regenerierung und Reduktion; nach Häder (1999). **a)** Ablauf des Zyklus. **b)** Regenerierungsreaktion.

### Metabolismen zum Hexosenabbau

Um auch bei Dunkelheit lebensfähig zu bleiben, haben Cyanobakterien unterschiedliche Abbauewege für Glukose entwickelt. Photoheterotrophe Cyanobakterien können eine limitierte Anzahl organischer Verbindungen aufnehmen und assimilieren. Hierzu wird jedoch Licht als Energiequelle benötigt. Nur einige sehr wenige Arten sind in der Lage chemoorganotroph im Dunkeln zu wachsen (Stal und Moezelaar, 1997). Dabei wird vor allem Glukose, Fruktose oder Saccharose genutzt. In den meisten Fällen wurde chemoorganotrophes Wachstum nur unter aeroben Bedingungen beobachtet. Anaerobes chemoorganotrophes Wachstum wurde für z.B. *Nostoc sp.* (Hoare *et al.*, 1971) beschrieben. Mit wenigen Ausnahmen ist das chemoorganotrophe Wachstum von Cyanobakterien auf externen Substraten deutlich langsamer als unter photoautotrophen Bedingungen. Dies liegt an der limitierten Substrataufnahme (Stal und Moezelaar, 1997).

Das durch die Photosynthese gebildete Glykogen kann über Phosphorylasen zu Glukose-Phosphat abgebaut und dem Pentosephosphatweg, der Glykolyse und der Respiration zugeführt werden (Michal, 1999). Da der Zitronensäurezyklus in Cyanobakterien aufgrund

einer fehlenden  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase unterbrochen ist (Pearce und Carr, 1969; Stal, 1992), muss die Oxidation von Glukose über einen alternativen Weg erfolgen.

### **Respiration**

Respiration ist ein membrangebundener Prozess, der zu einer ATP-Synthese führt. Alle untersuchten Cyanobakterien sind zur Respiration fähig. In diesem Zusammenhang ist Sauerstoff bislang als einziger terminaler Elektronenakzeptor bekannt (Schmetterer, 1994).

Die aus dem Glykogen gewonnene Glukose wird über den oxidativen Pentosephosphatweg abgebaut. Durch die Respiration mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor wird metabolische Energie gewonnen (Matthijs und Lubberding, 1988). Dabei kommt der FNR als respiratorische NADPH-Dehydrogenase im Elektronentransport eine zentrale Rolle zu (Scherer *et al.*, 1988; Schrautemeier *et al.*, 1985).

Cyanobakterien können als einzige Zellen Photosynthese und Respiration im gleichen Zellkompartiment betreiben. Ursache hierfür ist die gemeinsame Elektronentransportkette der Photosynthese und Respiration. Sie verwenden einen gemeinsamen Chinonpool (Trebst und Harth, 1970; Leach und Carr, 1970). Daher inhibieren sich z.B. in *Synechococcus* PCC6301 die Elektronentransportketten der Photosynthese und Respiration gegenseitig (Peschek und Schmetterer, 1982). Deshalb müssen Respiration und Photosynthese gegeneinander geregelt werden, um einen unnötigen Energieverlust durch Verlustzyklen zu vermeiden (Schmetterer, 1994).

### **Fermentation**

Cyanobakterien können auch in anaeroben Regionen wie hypersalinen Seen, Rhizosphären und Sedimenten angetroffen werden. In allen bislang untersuchten Arten, die im Dunkeln ohne Sauerstoff vorkommen, konnte eine fermentative Energiebereitstellung beobachtet werden (Stal und Moezelaar, 1997).

Diese Fermentationen umfassen homo- und heterofermentative Milchsäuregärung, gemischte Säuregärung und Homoessigsäuregärung. Fermentationsprodukte sind CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, Formiat, Acetat, Lactat und Ethanol. Die Expression der fermentativen Enzyme erfolgt konstitutiv (Oren und Shilo, 1979; Moezelaar und Stal, 1994; Moezelaar *et al.*, 1996).

Die meisten Arten verwenden Glykogen aus der Photosynthese für die Energiegewinnung im Dunkeln (Smith, 1982). Die chemoorganotrophen Kapazitäten sind sehr limitiert und scheinen vor allem auf symbiotische Cyanobakterien beschränkt zu sein. Deshalb gilt die Mehrzahl der Cyanobakterien als obligat photoautotroph (Smith, 1982).

Die bislang erforschten Cyanobakterien nutzen die Glykolyse zum fermentativen Abbau von Glukoseresten. Ein Schlüsselenzym ist die 6-Phosphofruktokinase. Sie wurde in *Anabaena*

*variabilis*, *Anacystis nidulans*, *Nostoc muscorum* und *Synechococcus* PCC6301 mit sehr unterschiedlichen Aktivitäten nachgewiesen (Pelroy *et al.*, 1972; Fewson *et al.*, 1962; Pearce und Carr, 1969; Bishop, 1979).

Die Fermentation bei Cyanobakterien setzt nicht strikt anaerobe Bedingungen voraus. Ein verringerter Sauerstoffpartialdruck ist bereits ausreichend (Heyer *et al.*, 1989; Margheri und Alotta, 1993).

Die Bereitstellung von Energie über fermentative Wege ist jedoch so gering, dass sie in Verbindung mit der Photosynthese und Respiration kaum eine Rolle spielt (Stal und Moezelaar, 1997). Im Vergleich zu Aufnahmeraten von *Enterococcus faecalis* für Glukose von  $80\text{--}550 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{Zellprotein}}^{-1}$  erfolgt der Abbau von Glykogen über fermentative Wege bei Cyanobakterien mit geringen Raten von  $0,2 \text{ bis } 1,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{Zellprotein}}^{-1}$  (Stal und Moezelaar, 1997). Die Fermentation bei Cyanobakterien dient offensichtlich nur deren Energieerhaltung (Margheri und Alotta, 1993). Die These wird durch die geringen Aktivitäten der Schlüsselenzyme untermauert (Heyer *et al.*, 1989; Stal und Moezelaar, 1994; Stal und Moezelaar, 1997; Moezelaar *et al.*, 1996). Die ATP-Produktion während einer Fermentation mit Glykogen als Kohlenstoffquelle bewegt sich zwischen  $0,8\text{--}8,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{Zellprotein}}^{-1}$ . Der Vorteil eines anaeroben konstitutiven Metabolismus ist die Fähigkeit, sehr schnell auf veränderliche Umweltbedingungen zu reagieren (Stal und Moezelaar, 1994).

### **3.1.4 Industrielle Massenproduktion**

Bei der Kultivierung phototropher Organismen wird grundsätzlich zwischen offenen und geschlossenen Systemen unterschieden. Zu den offenen Systemen zählen natürliche Gewässer wie Seen oder Teiche und künstliche Becken oder Kanalanlagen (Pulz, 2001).

Bis heute werden offene Systeme aus Kostengründen bevorzugt für die Massenproduktion von Mikroorganismen verwendet (Suh und Lee, 2001). In der Herstellung wertvoller Produkte für die Pharma- oder Kosmetikindustrie finden geschlossene Photobioreaktoren immer häufiger Anwendung, da fast alle biotechnologisch interessanten Prozessvariablen kontrollier- und steuerbar sind (Chen, 1996; Luo, *et al.*, 2003). Die Vorteile der geschlossenen Photobioreaktoren im Vergleich zu offenen Systemen sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Das Hauptproblem bei jeder Kultivierung in Photobioreaktoren besteht in der Einstellung der Haupteinflusskomponenten Licht und Turbulenz (Kirk, 1994; Pulz und Scheibenbogen, 1998; Tredici, 1999; Ogonna und Tanaka, 2000; Luo *et al.*, 2002).

## 12 Theoretische Grundlagen

Entscheidend für die Effizienz einer Reaktoranlage ist eine hohe Produktausbeute. Sie wird über die volumetrische Produktivität, die so genannte Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) definiert. Im Satzverfahren ohne Berücksichtigung von Rüstzeiten gilt:

Gleichung 3.1: 
$$RZA_x = \frac{m_x}{t \cdot V_R}$$

Mit  $RZA_x$  Raum-Zeit-Ausbeute,  $g_{BTM} L^{-1} h^{-1}$   
 $m_x$  gebildete Biomasse,  $g_{BTM}$   
 $t$  Kultivierungszeit, h  
 $V_R$  Reaktionsvolumen, L

**Tabelle 3.1:** Vor- und Nachteile von offenen und geschlossenen Photobioreaktoren (Pulz, 2001).

Parameter	Offene Systeme	Geschlossenen Systeme
Kontaminationsrisiko	Extrem hoch	Niedrig
Platzbedarf	Hoch	Niedrig
Wasserverlust	Extrem hoch	Kaum
CO <sub>2</sub> -Verlust	Hoch	Kaum
Prozesskontrolle	Nicht gegeben	Gegeben
Standardisierung	Nicht möglich	Möglich
Wetterabhängigkeit	Hoch	Keine
Kultivierbare Spezies	Extremophile Arten	Fast alle
Reproduzierbarkeit	Schlecht, da von Umweltbedingungen abhängig	Innerhalb von gewissen Toleranzen möglich
Zeitraumen bis zur netto Produktivität	Ca. 6-8 Wochen	Ca. 2-4 Wochen
Biomassekonzentration während der Produktion	0,1-0,2 $g_{BTM} L^{-1}$	2-8 $g_{BTM} L^{-1}$

### Reaktortypen

Industriell eingesetzte offene-Systeme besitzen typische Wassertiefen von 0,15-0,20 m und erreichen flächenbezogene Produktivitäten von bis zu  $0,42-1,04 g_{BTM} m^2 h^{-1}$ . Diese Reaktorsysteme besitzen eine Vielzahl von Nachteilen (siehe Tabelle 3.1) und sind daher meist auf die Kultivierung von extremophilen Organismen beschränkt (Cheng, 1996). Der Vorteil der Verwendung extremophiler Cyanobakterien liegt darin, dass Konkurrenten bei

einem stark alkalischen pH nicht mehr wachsen können, z.B. *Spirulina* oder *Oscillatoria* (Gimmler und Degenhardt, 2001).

Aufgrund des zunehmenden Interesses an Mikroalgen seitens der Pharmaindustrie werden derzeit unterschiedlichste Bauweisen von geschlossenen Photobioreaktoren untersucht. Die Industrie arbeitet meist mit Platten- und Rohrreaktoren (Tredici und Materassi, 1992; Tsoglin und Gabel, 2000). Einer der weltweit größten Photobioreaktoren wurde 2003 in der Nähe von Wolfsburg in Deutschland gebaut. Mit einer Gesamtrohrlänge von 500.000 m und einem Gesamtvolumen von 700 m<sup>3</sup> produziert dieser Rohrreaktor pro Jahr 130-150 t Biotrockenmasse an *Chlorella vulgaris* (Pulz, 2001).

Neben im Freiland betriebenen Reaktoren arbeiten Reaktoren mit künstlich erzeugtem Licht. Ihr Vorteil besteht in einer kompakteren Bauweise, einem niedrigeren Anschaffungspreis und einer einfacheren Handhabung der Kultivierung von Monokulturen (Sánchez Miron *et al.*, 2002). Die Reaktoren unterscheiden sich in Material, Design (Rohrreaktor, Plattenreaktor, Kesselreaktor, etc.), Art der Lichtquelle (extern oder intern) und Durchmischung. Allen geschlossenen Photobioreaktoren ohne kontinuierliche Begasung ist das ungelöste Problem der Sauerstoffabfuhr gemeinsam (Cheng, 1996; Pulz, 2001).

### 3.1.5 Wachstum von Cyanobakterien

Die wichtigsten Faktoren für die industrielle Umsetzung von Bioprozessen sind die Fähigkeit zur Maßstabsvergrößerung eines Reaktors und die Verfügbarkeit von adäquaten Wachstumsmodellen zur reproduzierbaren Kultivierung der Mikroorganismen. Letzteres ist für die Wirtschaftlichkeit einer Produktion maßgebend.

Für das beschreiben des Wachstums von Mikroorganismen stehen unterschiedliche Betrachtungsweisen von Zellpopulationen zur Verfügung.

Eine reelle Zellpopulation setzt sich aus Zellen in unterschiedlichen metabolischen Stadien zusammen. Prinzipiell kann die gesamte Population der Zellen entweder als Durchschnittszelle oder als verschiedene Sub-Populationen von Zellen in differenzierten metabolischen Zuständen betrachtet werden (Abbildung 3.3).

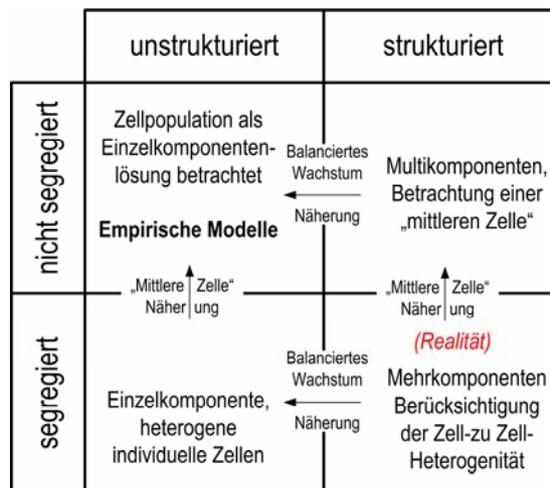


**Abbildung 3.3:** Beispiele für eine vereinfachte Darstellung von Zellpopulationen.

Die segregierte Betrachtungsweise differenziert Individuen einer Zellpopulation mit unterschiedlichen Zuständen (Frederickson *et al.*, 1970). Bei einer nicht segregierten Betrachtungsweise wird keine Unterscheidung von Individuen vorgenommen, sondern eine mittlere Einheitszelle definiert, die durch einen Durchschnittszustand charakterisiert und gleichmäßig im Reaktionsvolumen verteilt ist.

Eine weitere Betrachtungsweise bezieht sich auf die Komponenten der Zellen und ihre Unterscheidbarkeit. Werden unterschiedliche Komponenten des metabolischen Netzwerkes einer Zelle unterschieden, wird dies als strukturiert bezeichnet (Abbildung 3.4). Bei einer unstrukturierten Betrachtungsweise werden Zellen nur durch ihre Zellmassekonzentration  $c_X$  charakterisiert.

Formalkinetische Modelle sind nicht segregiert und nicht strukturiert. Ihre Anwendung ist nur zulässig, wenn in den Zellen Fließgleichgewichtszustände (balanciertes Wachstum) vorliegen, bei denen alle Aktivitäten der Zellsynthese so koordiniert sind, dass die mittlere Zellzusammensetzung nicht von der Entwicklung der Population beeinflusst wird.



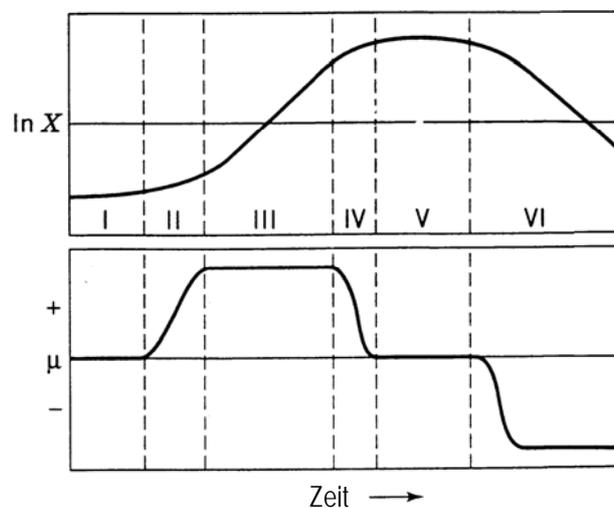
**Abbildung 3.4:** Verschiedene Perspektiven der populationskinetischen Darstellung. In horizontaler Richtung wird der Begriff Biomasse, in vertikaler Richtung der Begriff Population erörtert (Bailey, 1998).

Schlüsselvariablen für die mathematische Beschreibung zellulärer Prozesse auf Reaktorebene sind Hauptelementbilanzen (Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff), die mindestens zu 90% geschlossen werden können.

Cyanobakterien benötigen für ihr Wachstum Licht, anorganische Kohlenstoffquellen, elementaren Stickstoff bzw. Stickstoffsalze und anorganische Salze. Die Nährmedien für Cyanobakterien setzen sich daher aus definierten Salzen ohne Komplexanteile (Hefeextrakt,

Pepton etc.) zusammen. Ein konkurrierendes Wachstum heterotropher Organismen ist in derartigen Nährmedien weitgehend ausgeschlossen.

Das Wachstum von Cyanobakterien im Satzverfahren unterscheidet sich prinzipiell nicht von demjenigen heterotropher Organismen unter nicht limitierten Bedingungen (Abbildung 3.5). Die Anpassungsphase definiert sich durch die metabolischen Anpassungsprozesse der Zellen an neue Kulturbedingungen. Während der Übergangsphase I, auch Beschleunigungsphase genannt, nimmt die Wachstumsrate der Zellen kontinuierlich zu. Wird eine konstante Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  erreicht, beginnt die exponentielle Phase. Diese Phase ist bei phototrophen Mikroorganismen sehr kurz und geht schnell in ein lineares Wachstum über.



**Abbildung 3.5:** Wachstumsphasen von Cyanobakterien (Tredici, 1999). Wachstumsphasen einer typischen Kultivierung von Mikroorganismen im Satzverfahren mit der Biomasse  $X$  und der Wachstumsrate  $\mu$ . I: Anpassungsphase, II: Übergangsphase I, III: exponentielle Phase, IV: Übergangsphase II, V: stationäre Phase, VI: Absterbephase.

Die Wachstumsrate ist wie folgt definiert:

Gleichung 3.2: 
$$\mu \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt}$$

Mit	$\mu$	Wachstumsrate, $\text{h}^{-1}$
	$c_X$	Biomassekonzentration, $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$
	$t$	Kultivierungszeit, h

## 16 Theoretische Grundlagen

---

Die Vermehrung von Zellen wird durch Sprossung und Querteilung bestimmt. Bei einer Vermehrung der Zellen durch Querteilung besteht ein direkter Zusammenhang zur charakteristischen Verdopplungszeit  $t_d$ .

Gleichung 3.3: 
$$c_X = c_{X0} \cdot 2^z$$

Mit  $c_{X0}$  Ausgangsbiomassekonzentration,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$   
 $z$  Anzahl der Zellteilungen

Unter der Voraussetzung die Größe der Zellen sei unveränderlich, kann der Zusammenhang mit der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\text{max}}$  für die exponentielle Phase durch Integration von Gleichung 3.2 wie folgt beschrieben werden:

Gleichung 3.4: 
$$\mu \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt}$$
$$\mu_{\text{max}} \int_0^{t_d} dt = \int_{c_{X0}}^{2c_{X0}} \frac{1}{c_X} dc_X$$
$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{max}}}$$

Mit  $\mu_{\text{max}}$  Maximale Wachstumsrate ohne Limitierung,  $\text{h}^{-1}$   
 $t_d$  Verdopplungszeit, h

Formalkinetisch wird die Wachstumsrate  $\mu$  für die exponentielle Phase oft in Abhängigkeit einer limitierenden Substanz S beschrieben (Monod, 1942):

Gleichung 3.5: 
$$\mu = \mu_{\text{max}} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S}$$

Mit  $\mu_{\text{max}}$  Maximale Wachstumsrate ohne Limitierung,  $\text{h}^{-1}$   
 $c_S$  Konzentration der limitierenden Komponente,  $\text{g L}^{-1}$   
 $K_S$  Sättigungskonstante der limitierenden Komponente,  $\text{g L}^{-1}$

Hohe Substratkonzentrationen können das Wachstum durch Substratüberschussinhibierung herabsetzen (Andrews, 1968):

Gleichung 3.6: 
$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S + \frac{c_S^2}{K_I}}$$

Mit  $K_I$  Inhibierungskonstante, g L<sup>-1</sup>

In diesem Zusammenhang wird eine größtmögliche Wachstumsrate  $\mu_{opt}$  bei einer optimalen Substratkonzentration  $c_{S,opt}$  erreicht:

Gleichung 3.7: 
$$\frac{d\mu}{dc_S} = 0; \quad c_{S,opt} = \sqrt{K_S \cdot K_I}$$

Mit steigender Biomassekonzentration wird das Wachstum der Zellen durch abgereicherte Nährstoffe (Substratlimitierung) und inhibierende Stoffwechselprodukte limitiert und geht in die Übergangsphase II über. Wachstum mit inhibierenden Stoffwechselprodukten (Inhibitor) kann wie folgt beschrieben werden:

Gleichung 3.8: 
$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \cdot \left(1 - \frac{c_I}{c_{I,max}}\right)^n$$

Mit  $c_I$  Konzentration des Inhibitors, g L<sup>-1</sup>

$c_{I,max}$  maximale Inhibitorkonzentration bei der das Wachstum vollständig zum Erliegen kommt, g L<sup>-1</sup>

Analog der Wachstumsrate wird die spezifische Substrataufnahmerate  $q_S$  definiert:

Gleichung 3.9: 
$$q_S = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_S}{dt}$$

Mit  $q_S$  Substrataufnahmerate, g g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

Die zu jedem Zeitpunkt betriebene Energiebereitstellung zur Aufrechterhaltung elementarer und überlebensnotwendiger Reaktionen der Zellen wird als Erhaltungsstoffwechsel bezeichnet. Der Erhaltungsstoffwechsel kann als einfachster Ansatz über die Verwertung eines Substrates zum Aufbau von Biomasse und der spezifischen Substrataufnahmerate beschrieben werden (Gleichung 3.10).

Gleichung 3.10:  $q_{S,m} = m_S$  (= konstant)

Mit  $q_{S,m}$  Konst. Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel,  $g \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$   
 $m_S$  Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel,  $g \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Unter Berücksichtigung eines konstanten Erhaltungsstoffwechsels muss der formalkinetische Ansatz für die Wachstumsrate nach Gleichung 3.11 erweitert werden.

Gleichung 3.11:  $\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} - m_S \cdot Y_{XS,\mu}$  mit  $Y_{XS,\mu} \equiv \frac{dc_X}{dc_S}$

Mit  $Y_{XS,\mu}$  Ertragskoeffizient Biomasse aus Substrat,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{ g}^{-1}$

Der limitierten Wachstumsphase folgen eine stationäre Phase und schließlich eine Phase, in der die Zellen absterben.

### Satzverfahren

Im Satzverfahren werden Organismen in einem definierten sowie unveränderlichen Volumen kultiviert. Dem vorgelegten Nährmedium werden einzig Titrationsmittel und Gase zur Kultivierung zugeführt. Bei Annahme eines idealen Rührkesselreaktors (isotherme und isobare Bedingungen) entspricht im Satzbetrieb die Änderung der Gesamtmenge an Biomasse der Nettorate neu gebildeter Biomasse nach Gleichung 3.12.

Gleichung 3.12:  $\frac{d(V_R \cdot c_X)}{dt} = V_R \cdot \mu \cdot c_X$

Da in einem Satzbetrieb das Volumen des Mediums konstant bleibt, folgt:

Gleichung 3.13:  $\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X$

Mit  $c_X = c_{X,0}$  bei  $t_0 = t_{\text{Ende der lag-Phase}}$

Bei  $\mu = \mu_{\max}$  =konstant ergibt die Integration der Gleichung 3.13:

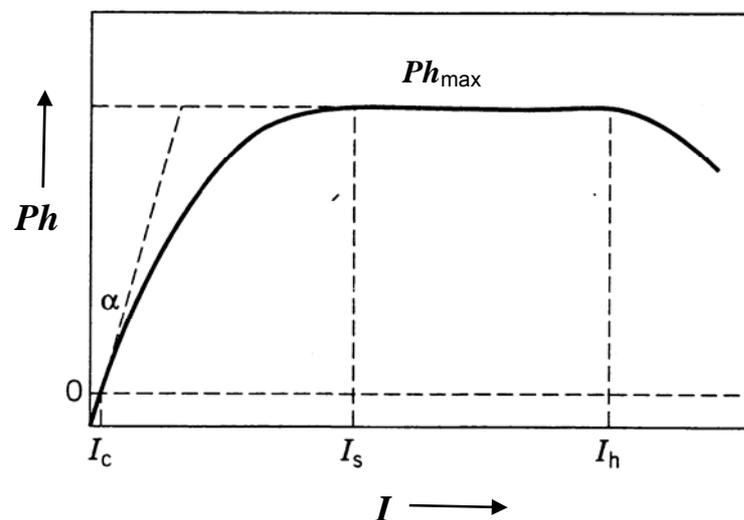
Gleichung 3.14:  $\ln \frac{c_X(t)}{c_{X,0}} = \mu \cdot (t - t_0)$  bzw.  $c_X(t) = c_{X,0} \cdot e^{\mu \cdot (t - t_0)}$

Mit  $c_X(t)$  Biomassekonzentration zum Zeitpunkt  $t$ ,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$

$c_{X,0}$  Biomassekonzentration zum Zeitpunkt  $t_0$ ,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$

Anders als bei heterotrophen Organismen ist das Wachstum phototropher Mikroorganismen von der verfügbaren Lichtenergie abhängig (Abbildung 3.6). Die Rate der Photosynthese ist jedoch nicht proportional zu der Absorption der akzessorischen Pigmente, da Photonen schneller absorbiert werden als der Photosyntheseapparat sie verarbeiten kann.

Wird die Photosyntheserate ( $Ph$ ) als Funktion der eingestrahlichten Lichtintensität ( $I$ ) aufgetragen, ergibt sich eine Lichtreaktionskurve (so genannte  $Ph$ - $I$ -Kurve). Am Lichtkompensationspunkt ( $I_c$ ) trägt die Photosyntheserate den respiratorischen Energieverbrauch der Zellen. Über diesen Punkt hinaus wird die Netto-Photosynthese gemessen. Die Steigung der Kurve ( $\alpha$  oder maximale Quantenausbeute), repräsentiert die Photosyntheserate per Lichtintensitätseinheit und beschreibt mit welcher Effizienz ein Organismus schwaches Licht nutzt.



**Abbildung 3.6:** Lichtreaktionskurve der Photosynthese. Mit  $I_c$ : Lichtkompensationspunkt,  $I_s$ : Sättigende Lichtintensität,  $I_h$ : Inhibierende Lichtintensität,  $Ph_{max}$ : Maximale Photosyntheserate,  $\alpha$ : Maximale Quantenausbeute (Tredici, 1999).

Der Bereich, in dem  $Ph$  einen maximalen Wert ( $Ph_{max}$ ) erreicht und unabhängig von  $I$  konstant bleibt, wird als lichtgesättigter Bereich bezeichnet. Er ist charakterisiert durch die Überschreitung einer Sättigungsintensität ( $I_s$ ), bis eine Absenkung von  $Ph$  in Folge einer inhibierenden Lichtintensität ( $I_h$ ) einsetzt. Ab einer bestimmten Lichtintensitätsgrenze wird das Proteinsystem im PS II geschädigt und es kommt zur Lichtinhibition (Barber und Anderson, 1992; Tredici, 1999). Zellen besitzen die Fähigkeit, solche Schäden zu reparieren oder sich durch die Anzahl an Photosynthesesystemen an die gegebenen Lichtbedingungen anzupassen. Diese Prozesse verlaufen jedoch langsamer als die Prozesse der Lichtlimitierung bzw. – inhibition (Rubio *et al.*, 2003).

Bei geringen Lichtintensitäten ist  $Ph$  durch die Lichtreaktionen der Photosynthese limitiert, während bei sättigenden Lichtkonzentrationen die Dunkelreaktionen begrenzend wirkt (Tredici, 1999; Luo *et al.*, 2003). Es ist folglich notwendig, Photobioreaktoren mit einer Lichtenergie zu bestrahlen, die eine stammabhängige Sättigungsgrenze weder über- noch unterschreiten sollte (Pulz, 2001).

Wie Abbildung 3.6 zeigt, besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der Photosyntheserate und der eingebrachten Lichtintensität. Unterhalb  $I_s$  führen wachstumsbedingte dynamische Verschattungen der Zellen zur Limitierung der Lichtversorgung.

### 3.1.6 Modellierung des Wachstums phototropher Mikroorganismen

Für phototrophe Mikroorganismen ist Licht das limitierende Substrat. Wachstumsmodelle sind auf die korrekte Beschreibung der Lichtverhältnisse im Reaktor angewiesen, da Licht die einzige Energiequelle für photoautotrophes Wachstum ist.

#### Lichtabsorptionsmodelle

Viele Forschergruppen haben mathematische Modelle zur Vorhersage der Lichtverteilung in Photobioreaktoren entwickelt (Cornet *et al.*, 1995; Acién Fernández *et al.*, 1997; Suh und Lee, 2001; Suh und Lee, 2003). Zwei geeignete Modelle zur Darstellung der Lichtverhältnisse in einem Photobioreaktor sind das Lambert-Beer'sche Gesetz und das Absorptionsmodell nach Reynolds und Pacala (1993) (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2: Absorptionsmodelle**

Lambert-Beer'sche Gesetz:		
Gleichung 3.15:	$I = I_0 \cdot e^{-(\varepsilon \cdot c_X \cdot L)}$	
Reynolds und Pacala:		
Gleichung 3.16:	$I = \frac{I_0}{1 + \varepsilon \cdot c_X \cdot L}$	Reynolds und Pacala, 1993
mit:	$I$	Lichtintensität bei Austritt aus dem Medium, $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
	$I_0$	Lichtintensität bei Eintritt in das Medium, $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
	$L$	Lichtweg im Medium, cm
	$c_X$	Biomassekonzentration
		(bzw. Konz. absorbierender Stoff), $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$
	$\varepsilon$	Absorptionskoeffizient, $\text{L cm}^{-1}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$

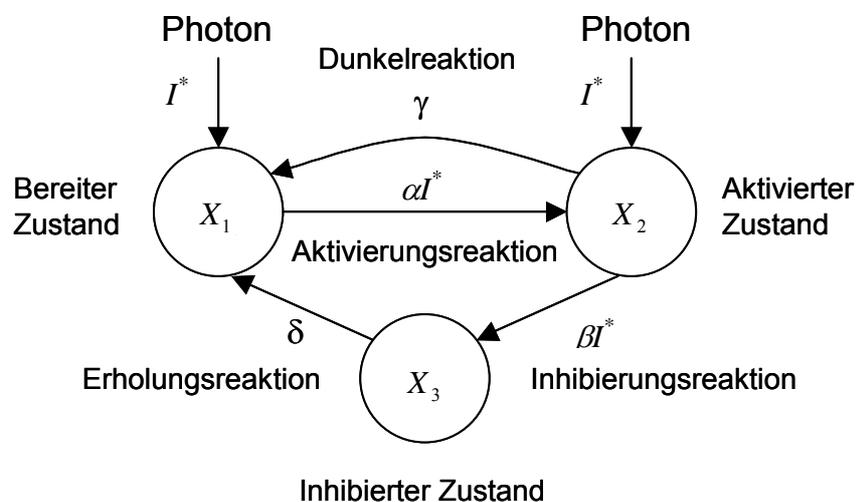
### Kinetische Modelle für phototrophe Mikroorganismen

Zur Beschreibung des Wachstums von phototrophen Mikroorganismen stehen unterschiedliche nicht segregierte und unstrukturierte empirische Modelle zur Verfügung (Tabelle 3.3).

**Tabelle 3.3:** Empirische Wachstumsmodelle für phototrophe Mikroorganismen (aus Molina Grima *et al.*, 1999)

$\mu = \frac{\alpha \mu_{\max} I}{\mu_{\max} + \alpha I}$	Tamiya <i>et al.</i> (1953)
$\mu = \mu_{\max} \left( 1 - e^{-\frac{I}{I_{\max}}} \right)$	Van Oorscot (1955)
$\mu = \frac{\mu_{\max} I}{I_{\max}} e^{\left( 1 - \frac{I}{I_{\max}} \right)}$	Steele (1977)
$\mu = \frac{\mu_{\max} I}{\left( K_i^m + I^m \right)^{\frac{1}{m}}}$	Bannister (1979)
$\mu = \frac{\mu_{\max} I}{K_s + I + \frac{I^2}{K_i}}$	Aiba (1992)

Ein Beispiel für ein nicht segregiertes, strukturiertes Modell zur Beschreibung des Wachstums phototropher Organismen ist das Modell nach Eiler und Peeters (1988) (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7:** Wachstumsmodell (nach Eilers und Peeters, 1988)

Der zentrale Begriff des vorgestellten Modells ist die Photosynthesefabrik. Sie ist ein Sammelbegriff für alle Lichtaufnahmesysteme, Reaktionszentren und die mit ihnen verbundenen biochemischen Apparate.

Trifft auf eine Photosynthesefabrik im Zustand  $X_1$  ein Photon, so wird sie über die Aktivierungsreaktion in einen aktivierten Zustand  $X_2$  versetzt. Die Rückführung vom aktivierten in den ruhenden Zustand beschreibt die Dunkelreaktion. Absorbiert eine Photosynthesefabrik im aktivierten Zustand  $X_2$  ein Photon, geht sie über die Inhibierungsreaktion in den inhibierten Zustand  $X_3$  über. Die Umwandlung vom inhibierten in den ruhenden Zustand beschreibt die Erholungsreaktion.

Zum Zeitpunkt  $t = 0$  befinden sich alle Photosynthesefabriken in einem ruhenden Zustand, der mit dem Index 1 gekennzeichnet wird.

$$\text{Gleichung 3.17:} \quad t = 0: X_1 = 1, X_2 = 0, X_3 = 0$$

$X_i$  ( $i \in 1,2,3$ ) bezeichnet den Anteil der Photosynthesefabriken im jeweiligen Zustand. Die Summe aller Zustände beträgt zu jedem Zeitpunkt 1.

$$\text{Gleichung 3.18:} \quad X_1 + X_2 + X_3 = 1$$

Für jeden Zustand  $X_i$  wird eine differentielle Bilanz aufgestellt.

$$\text{Gleichung 3.19:} \quad \frac{dX_1}{dt} = -\alpha I^* X_1 + \gamma X_2 + \delta X_3$$

$$\text{Gleichung 3.20:} \quad \frac{dX_2}{dt} = \alpha I^* X_1 - \gamma X_2 - \beta I^* X_2$$

$$\text{Gleichung 3.21:} \quad \frac{dX_3}{dt} = \beta I^* X_2 - \delta X_3$$

Mit  $\gamma, \delta$  Geschwindigkeitskonstanten,  $\text{h}^{-1}$   
 $\alpha I^*, \beta I^*$  Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit der integralen Lichtintensität  $I^*$ ,  $\text{h}^{-1}$   
 $X$  Zustand, -

Gleichung 3.22 beschreibt die Produktionsrate der Biomasse.

Gleichung 3.22:  $\mu = k\gamma X_2 - m.$

Mit	k	Geschwindigkeitskonstante, -
	$\gamma$	Geschwindigkeitskonstante, $h^{-1}$
	m	Erhaltungsstoffwechsel, $h^{-1}$

Das Wachstum wird in diesem Modell mit Hilfe der Gleichung für die Dunkelreaktion beschrieben.

### 3.2 Asymmetrische Synthesen

Der Begriff der asymmetrischen Synthese geht auf Emil Fischer (1894) zurück. Die asymmetrische Synthese beschreibt einen Sonderfall der stereoselektiven Synthese. Er liegt vor, sobald während einer Reaktion mindestens ein Chiralitätselement erzeugt wird und die resultierenden Stereoisomere in ungleichen Mengen entstehen. In dieser Arbeit wird die asymmetrische Synthese im Zusammenhang mit der Herstellung chiraler Alkohole verwendet.

Die Erzeugung chiraler Alkohole ist durch eine Reduktion prochiraler Ketone möglich. Dabei können chemische und enzymatische Katalysen unterschieden werden.

Zur asymmetrischen Reduktion von Ketonen mittels chemischer Katalyse stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Zu ihnen zählen die Boran-basierende Katalyse, Reaktionen von Ketonen mit Hydriden, die direkte Hydrogenierung mit Wasserstoff und die Transferhydrogenierung. Übergangsmetallkomplexe katalysieren die beiden letztgenannten Reaktionen (Corey und Helal, 1998; Wills und Hannedouche, 2002). Sie laufen zumeist unter aggressiven Bedingungen unter unzureichender Stereoselektivität ab.

Enantioselektive Synthesen über enzymatische Katalysen sind Umwandlungen von Wertstoffen unter Einsatz von Enzymen als Biokatalysatoren. Zu ihnen gehören kinetische Racematspaltungen, enzymatische Desymmetrisierungen und Redoxreaktionen mit Oxidoreduktasen. Die hohe Regio- und Stereoselektivität der Enzyme beruht auf einer definierten Anordnung des Substrates im aktiven Zentrum.

Bei enzymatischen Redoxreaktionen werden häufig Kofaktoren wie oxidiertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid ( $NAD^+$ ),  $NADP^+$  oder Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Reduktions- bzw. Oxidationsmittel eingesetzt. Die Verwendung aufgereinigter Enzyme und notwendiger Kofaktoren limitiert derartige Prozesse aufgrund des erheblichen Kostenfaktors auf Produkte mit großer Wertschöpfung (Eckstein *et al.*, 2003).

### **3.2.1 Ganzzellbiokatalyse**

Anstelle von aufgereinigten, isolierten Enzymen können auch ganze Zellen zur asymmetrischen Ketonreduktion verwendet werden (Nakamura *et al.*, 2003). So genannte Biotransformationen bzw. Ganzzellbiokatalysen umfassen alle mikrobiellen Stoffumwandlungen durch biochemische Mechanismen. Sie werden in zunehmendem Maße bei der Herstellung spezieller Feinchemikalien mit hoher chiraler Reinheit als Bausteine für die Pharma-, Agro- und Nahrungsmittelindustrie eingesetzt (Faber, 1997; Liese *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2001; Patel, 2002; Straathof *et al.*, 2002; Eckstein, 2004). Hierbei kommen neben den Wildtypen auch rekombinante Ganzzellbiokatalysesysteme zur Anwendung (Kataoka *et al.*, 2003). Die einfache Herstellung des Biokatalysators und der kostengünstige Einsatz der Ganzzellbiotransformation sind bedeutende Vorteile gegenüber chemischen Verfahren. Die eingesetzten Zellen können entweder abgetötet, ruhend oder wachsend appliziert werden.

In die Zelle aufgenommene Edukte werden enzymatisch unter physiologischen Bedingungen umgesetzt. Durch die zelleigene Kofaktorregenerierung entfallen die Aufwendungen für Kofaktoren (Eckstein *et al.*, 2003). Diese Regeationsreaktionen sind auf die Energiebereitstellung durch den Kohlenstoffmetabolismus der Zelle angewiesen. Hierzu dient häufig Glukose als Ausgangssubstrat.

Bei hohen Zellkonzentrationen muss Glukose in großen Mengen zugeführt werden, so dass häufig Gärprodukte entstehen. Diese können wiederum toxisch auf den Biokatalysator wirken und die Raum-Zeit-Ausbeute verschlechtern. Probleme bereiten oftmals organismeneigene Enzyme, die das unerwünschte Enantiomer bilden. Des Weiteren kann es zur unerwünschten Verstoffwechslung von Produkten kommen (Bucciarelli *et al.*, 1983; Nakamura *et al.*, 2000).

### **3.2.2 Prozessgrößen bei der Ganzzellbiokatalyse**

Die Beschreibung und Quantifizierung von Ganzzellbiokatalysen erfolgt anhand folgender Größen.

Eine der wichtigsten Größen bei asymmetrischen Synthesen ist der prozentuale Enantiomerenüberschuss (% ee, *enantiomeric excess*) des chiralen Produktes. Ein Enantiomerenüberschuss von 100 % bedeutet, dass die Reaktion ausschließlich ein Enantiomer der beiden möglichen liefert. Eine Reaktion mit einem Enantiomerenüberschuss von 0 % führt zum Racemat des Produkts. Der Enantiomerenüberschuss ist ausschlaggebend, für den Aufwand der bei der Aufarbeitung eines reinen Produkts entsteht. Da hier die höchsten Kosten bei der Produktion einer Feinchemikalie entstehen, sind

Prozesse mit weniger als 96 % ee meist ökonomisch unrentabel, wenn alternative Wege zur Synthese gegeben sind.

Gleichung 3.23: 
$$ee = \frac{n_{(S)} - n_{(R)}}{n_{(S)} + n_{(R)}} \cdot 100\% \text{ für } n_{(S)} > n_{(R)}$$

Mit  $n_{(S)}$  Menge des S-Enantiomers, mol  
 $n_{(R)}$  Menge des R-Enantiomers, mol

Die Effizienz einer chemischen Umsetzung wird durch die stöchiometrische Ausbeute (*chemical yield*) bzw. Einsatzausbeute einer Reaktion bestimmt. Sie definiert sich im Satzverfahren über die gebildete Menge an Produkt per eingesetzte Menge an Edukt (Gleichung 3.24) ohne Berücksichtigung von nicht umgesetzten Edukt und Verlusten durch Trennverfahren (Römpp, 2006).

Gleichung 3.24: 
$$\text{stöchiometrische Ausbeute}_P = \frac{n_P - n_{P0}}{n_{E0}} \cdot \left| \frac{f_E}{f_P} \right| \cdot 100\%$$

Mit  $n_{Pt}$  Menge des Produkts zum Zeitpunkt t, mol  
 $n_{P0}$  Menge des Produkts zum Zeitpunkt t=0, mol  
 $n_{E0}$  Menge des Edukts zum Zeitpunkt t=0, mol  
 $f_E$  Stöchiometrischer Faktor des Edukts, -  
 $f_P$  Stöchiometrischer Faktor des Produkts, -

Gleichung 3.25: 
$$\text{Umsatz} = \frac{n_{E0} - n_{Et}}{n_{E0}} \cdot 100\%$$

Mit  $n_{E,t}$  Menge des Edukts zum Zeitpunkt t, mol

Die Produktbildungskapazität (*PBK*) ist ein Maß für die Güte des eingesetzten Biokatalysators. Sie ist definiert über den Quotienten der Menge an gebildetem Produkt per eingesetzte Menge an Biokatalysator:

Gleichung 3.26: 
$$PBK = \frac{n_P - n_{P0}}{c_{X0}}$$

Mit  $PBK$  Produktbildungskapazität, mol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>

Die kinetische Beschreibung der Produktbildung dient der Quantifizierung einer Biotransformation. Anfangsgeschwindigkeiten beschreiben die Produktbildungsgeschwindigkeiten bei Eduktüberschuss zu Beginn der Reaktion im Satzverfahren. Sie vernachlässigt dabei Phänomene wie Produktinhibierung (Bisswanger, 2000) oder Rückreaktion.

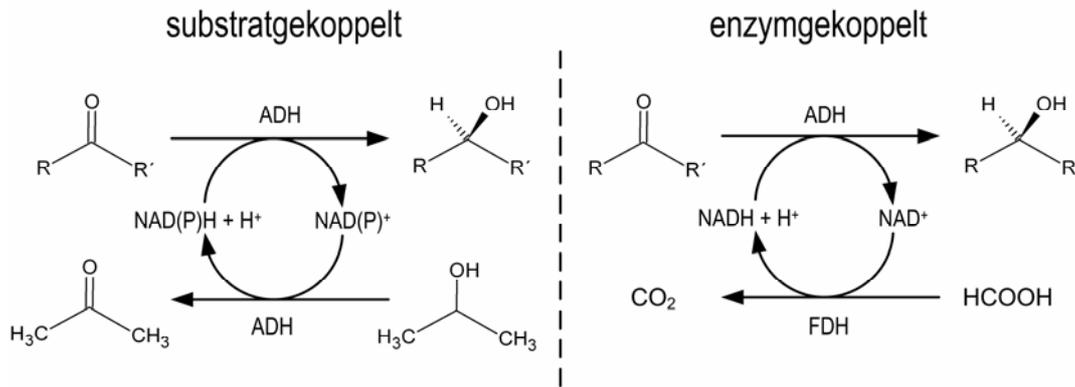
### **3.2.3 Herstellung chiraler Alkohole mittels Oxidoreduktasen**

Die Herstellung chiraler Alkohole ist mit Enzymen über asymmetrische Ketonreduktion möglich. Die Enzyme können immobilisiert oder frei löslich im Reaktionsmedium vorliegen. Dabei werden Oxidoreduktasen (EC 1), wie beispielsweise Alkoholdehydrogenasen (ADH) aus Wildtypstämmen oder heterolog exprimierte Isoenzyme (Hummel *et al.*, 2003) verwendet.

Diese ADHs benötigen die Kofaktoren NAD<sup>+</sup> (EC 1.1.1.1) oder NADP<sup>+</sup> (EC 1.1.1.2) und sind folglich von einer Regenerierungsreaktion abhängig. Um die Kosten einer enzymatischen Katalyse niedrig zu halten wird die notwendige Überführung des oxidierten Kofaktors von der ADH selbst mittels Oxidation eines anderen Kosubstrats (substratgekoppelter Ansatz), z.B. Alkohol, oder von einem zweiten oxidierenden Enzym durchgeführt (enzymgekoppelter Ansatz) (Seelbach *et al.*, 1996). Um teure Kofaktoren zu sparen, werden derartige Reaktionen durch genetische Manipulation in einer Zelle vereinigt.

In der Ganzzellbiokatalyse kommen hierzu Monoxygenasen (Appel *et al.*, 2001; Urlacher *et al.*, 2002, Mauerer *et al.*, 2003), Hydrogenasen, z.B. aus *Pyrococcus furiosus* (Greiner *et al.*, 2003; Mertens *et al.*, 2003) und Dehydrogenasen, z.B. Formiat-Dehydrogenase aus *Candida boidinii*, zum Einsatz (Slusarczyk *et al.*, 2000; Yasohara *et al.*, 2001; Suye *et al.*, 2002; Gröger *et al.*, 2003) (Abbildung 3.8).

In der Industrie werden bereits *Neurospora crassa* und *Zygosaccharomyces rouxii* als Ganzzellbiokatalysatoren (Liese *et al.*, 2000) und Enzyme aus z.B. *Lactobacillus brevis* verwendet, um chirale Alkohole im 10-100 kg Maßstab herzustellen (Wohlberg *et al.*, 2000; Eckstein *et al.*, 2004). Viel versprechende Mikroorganismen mit Oxidoreduktase-Aktivität sind Wildtypen und gentechnisch veränderte Organismen der Stämme *Lactobacillus kefir*, *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* (Hummel, 1990; Kometani *et al.*, 1996; Haberland *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2003; Engelking *et al.*, 2004; Amidjojo und Weuster-Botz, 2005; Engelking *et al.*, 2006).



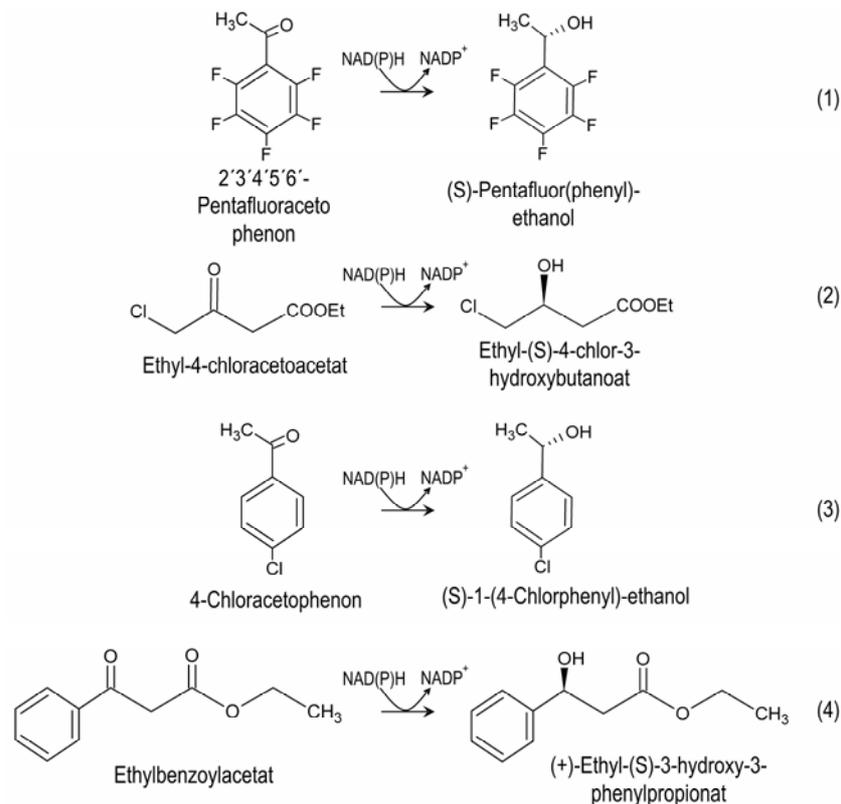
**Abbildung 3.8:** Kofaktorregenerierung über substrat- und enzymgekoppelte Verfahren.  
**ADH:** Alkoholdehydrogenase; **FDH:** Formiat-Dehydrogenase

Mit diesen Organismen konnten bereits neben vielen anderen Substanzen erfolgreich Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat (S-CHBE) (**2**), ein chirales Intermediat bei der Synthese von Atorvastatin (Pereira *et al.*, 1998) und (+)-Ethyl-(S)-hydroxy-3-phenylpropionat (HPPE) (**4**), ein Intermediat bei der Synthese von Fluoxetin (Chênevert *et al.*, 1992) mit hohen Enantiomerenüberschüssen hergestellt werden (Abbildung 3.9).

Weitere Substanzen von Interesse sind der Carboanhydraseinhibitor 2'-3'-4'-5'-6'-Pentafluoracetophenon (PFAP) (**1**) und dessen korrespondierender chiraler Alkohol (S)-Pentafluor(phenyl)-ethanol (S-PFE) (Dojon und Jain, 1999) sowie der chirale Baustein S-1-(4-Chlorphenyl)-ethanol (S-4-CI-PE) (**3**).

Neben den Ketonen und chiralen Alkoholen können in einem Ganzzellansatz auch die Edukte und Produkte der Regenerierungsreaktion toxisch auf die Zellen wirken. Daher werden stetig neue Mikroorganismen und Enzyme auf ihre katalytischen Fähigkeiten und ihre Stabilität gegenüber Reaktionsbedingungen untersucht.

Eine Alternative zu heterotrophen Biokatalysatoren bieten photobiokatalytische Ketonreduktionen mit phototrophen Organismen. Die fundamental unterschiedlichen Stoffwechselwege (Carr und Whitton, 1973) phototropher und heterotropher Organismen ermöglichen die Nutzung alternativer Biotransformationswege. Die Gefahr einer weiteren Metabolisierung von Produkten ist in Folge des engen Substratspektrums phototropher Mikroorganismen gering (Jüttner und Hans, 1986).



**Abbildung 3.9:** Asymmetrische Reduktion von Oxidoreduktasen mit NADPH als Kofaktor

In den letzten drei Jahrzehnten wurden nur wenige Untersuchungen zu asymmetrischen Synthesen mit phototrophen Mikroorganismen publiziert (Jüttner und Hans, 1986; Noma und Asakawa, 1992; Nakamura *et al.*, 2003; Barton *et al.*, 2004; Shimoda *et al.*, 2004). Die Forschung fokussierte sich auf Photobiokatalysen von Prokaryonten wie Cyanobakterien unterschiedlicher Stämme, z.B. *Synechococcus* und *Anabaena* (Jüttner und Hans, 1986) und auf eukaryotische Zellen wie *Euglena* und *Chlorella* (Noma und Asakawa, 1992; Hook *et al.*, 1999). Dabei wurden aliphatische und aromatische Aldehyde, Ketone, unterschiedlich substituierte Acetophenone, Enone und Carvole reduziert.

Für das photoautotrophe Cyanobakterium *Synechococcus* PCC7942 sind Reduktionen von Acetophenonderivaten mit einem Enantiomerenüberschuss von  $\geq 98\%$  mit Ausbeuten von 90% im Satzverfahren bekannt (Nakamura *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang wurde von einer lichtabhängigen Stereoselektivität der Reaktion berichtet. Die Ausprägung dieses Phänomens war jedoch stoffabhängig und folgte keiner Gesetzmäßigkeit (Nakamura und Yamanaka, 2002a; Nakamura und Yamanaka, 2002b). Eine Nutzung von Photobiokatalysen im Produktionsmaßstab wäre demnach nur in einem Photobioreaktor möglich.

Photoautotrophe Organismen sind in der Lage, die reduktive Kraft der Photosynthese zur Regenerierung von Kofaktoren zu nutzen (Nakamura *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2002b).

Mit dem Kosubstrat Licht kann bezüglich der Kofaktorregenerierung ein Wirkungsgrad von 4-5 % erzielt werden, solange eine sättigende Lichtintensität im Reaktionsansatz vorliegt (Tredici, 1999).

### **3.2.4 Biotransformation schlecht wasserlöslicher und toxischer Edukte**

Die toxischen Effekte von Substraten und Produkten bedingen ab einer kritischen extrazellulären Konzentration häufig eine Inaktivierung des Biokatalysators. In derartigen Fällen müssen die Konzentrationen der Stoffe im Reaktionsmedium niedrig gehalten werden.

Viele Edukte und Produkte sind oftmals nur in geringem Maße in einer wässrigen Phase löslich und bilden eine zweite Phase oder akkumulieren in den Zellen. Ohne eine Stabilisierung instabiler Edukte und Produkte kommt es häufig zu unerwünschten Zerfallsprodukten. Die Ausbeute und Reinheit des Produkts einer Biotransformation ist von den in Kapitel 3.2.2 genannten Faktoren abhängig und kann durch Ein- oder Mehrphasensysteme über unterschiedliche Solvatisierungsverfahren verbessert werden.

#### **Einphasensysteme**

Schlecht wasserlösliche Substanzen können über Löslichkeitsvermittler solvatisiert werden. Während wasserlösliche Alkohole, organische Lösungsmittel, Tenside oder Detergenzien die Konzentration von Edukten und Produkten in der wässrigen Phase erhöhen (Lourraine *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 2002a; Eckstein *et al.*, 2004), vermindern sie die Toxizität und die Instabilität der Substanz nicht. Ferner wirken viele der Löslichkeitsvermittler toxisch auf die Zellen.

Nichttoxische Löslichkeitsvermittler mit einem hohen Komplexierungsvermögen für Reaktanden sind Cyclodextrine (Singh *et al.*, 2002) sowie Mono- und Disaccharide, die sich selbständig ähnlich der Cyclodextrin-Struktur koordinieren (Bertau und Jörg, 2004). Ihr biologischer Abbau durch Enzyme von Organismen, z.B. Amylasen, limitiert jedoch ihren Einsatz.

#### **2-Phasensysteme**

Schlecht wasserlösliche oder toxische Stoffe können mittels einer zweiten hydrophoben Lösungsmittelphase in eine wässrige Phase eingebracht werden. Über das Verteilungsgleichgewicht des Edukts in den beiden Phasen kann die Konzentration in der wässrigen Phase unterhalb der Toxizitätsgrenze eingestellt werden (Eckstein *et al.*, 2004). Dabei löst sich immer auch ein Teil des Lösungsmittels in der wässrigen Phase. Bei einer unzureichenden Stoffaustauschfläche kann diese durch Dispersion in feine Tröpfchen erhöht werden.

Neben dem Hauptproblem der toxischen Wirkung von hydrophoben Lösungsmitteln auf Membranen und ihre Proteine (León *et al.*, 1998) muss in einem 2-Phasensystem der Verteilungskoeffizient für das Edukt sowie das Produkt günstig sein (Halling, 1994; Heinemann *et al.*, 2003). Bei phototrophen Mikroorganismen steigt mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels die Toxizität (León *et al.*, 2001). Sie kann durch den Einsatz eines besonders hydrophoben Lösungsmittels, das in wässriger Phase kaum löslich ist, herabgesetzt werden.

Trotzdem sind an der Austauschfläche inaktivierende Interaktionen zwischen dem Lösungsmittel und den Zellwänden möglich. Sie werden als Phasentoxizität bezeichnet (Bar, 1986; Matsumoto *et al.*, 2001).

Um die Phasentoxizität zu vermeiden, muss eine örtliche Trennung zwischen Zellen und Lösungsmittelphase durch Zellrückhaltung stattfinden, beispielsweise durch eine Membran oder Verkapselung (Westgate *et al.*, 1998; León *et al.*, 2001; Eckstein, 2004). Gute Erfolge wurden mit Hydrogelen aus Calciumalginat erzielt (Bar, 1986; León *et al.*, 2001).

Alternativ können ionische Flüssigkeiten verwendet werden (Cull *et al.*, 2000; Howarth *et al.*, 2001; Kragl *et al.*, 2002; Rantwijk *et al.*, 2003; Pfruender *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich um hydrolysestabile Salze, die bei Raumtemperatur flüssige Schmelzen bilden und nur minimal wasserlöslich sind. Ihre Vorteile bestehen in einem geringen Dampfdruck und einer guten Lösungsmittleigenschaft. Ausgewählte ionische Flüssigkeiten weisen eine geringe Toxizität für Zellen auf und wurden schon erfolgreich in Ganzzellbiokatalysen eingesetzt (Pfruender *et al.*, 2004).

Dennoch ist es erforderlich, geeignete Organismen mit einer hohen Enzymaktivität zu selektieren, die eine hohe Toleranz gegenüber dem gewünschten Stoff- und Reaktionssystem aufweisen (Matsumoto *et al.*, 2001; Hahn und Botzenhart, 2004; Sardesai und Bhosle, 2004).

### **3.2.5 Einfluss der Membranintegrität auf Ganzzellbiokatalysen**

Die semipermeable Lipiddoppelschicht einer Zellmembran besteht aus Phospholipiden mit hydrophilen Köpfen. In diesem flüssigen Gebilde aus Lipiden verankert liegen integrale (intrinsische) und extern aufliegende (extrinsische) Membranproteine.

Aufgrund der Semipermeabilität der Zellmembran können ungeladene, hydrophobe (Benzene) und kleine polare Moleküle ( $H_2O$ ) gut in die Zelle gelangen, während polare sowie große Moleküle (z.B. Ketone) und Ionen zurückgehalten werden.

Wie in den Kapiteln 3.1.2 und 3.1.3 dargelegt, sind besonders bei phototrophen Mikroorganismen energetisch wichtige Reaktionen membrangebunden. Die Perforation der Membran zerstört die Homöostasis der Zellen. Eine Schädigung der Membranintegrität hätte zudem den Zusammenbruch der Konzentrationsgradienten von Protonen und  $\text{CO}_2$  zur Folge. Eine Energiegewinnung wäre weder über Photosynthese noch Respiration möglich. Die Fixierung von  $\text{CO}_2$  würde ebenfalls unterbleiben und die Oxigenaseaktivität der Rubisco zusätzlich Energie verbrauchen. Eine Folge wäre die Verknappung der Energieträger und Kofaktoren in der Zelle sowie Denaturierungseffekte an Proteinen durch eine veränderte Ionenstärke und einen veränderten pH.

Zu einer Beschädigung der Zellmembran kann es beispielsweise durch Lösungsmittel und Scherkräfte kommen. Bei Lösungsmitteln beruht die molekulare Toxizität auf der Zerstörung der semipermeablen Barrierefunktion der Zellmembran und der Inaktivierung sowie Denaturierung von Membranproteinen (Léon *et al.*, 1998; Léon *et al.*, 2001). Experimentell kann der negative Einfluss von Scherkräften und Lösungsmitteln über Membranintegritätstests quantifiziert werden.

### **3.3 Oxidoreduktase-aktive Multienzymkomplexe**

Sind mehrere Enzyme, die verschiedene aufeinander folgende Schritte einer Reaktionskette katalysieren, zu einer strukturellen und funktionellen Einheit zusammengefasst, liegt ein Multienzymkomplex vor.

#### **3.3.1 Elektronentransportkette der Photosynthese**

Die Elektronentransportkette für die Photosynthese ist ein Multienzymkomplex, der die Thylakoidmembran durchspannt. Sie besteht aus mehreren Enzymen, die Elektronen auf Chinone übertragen. Chinone sind organische Moleküle, die sich lateral in der Membran bewegen können und Elektronen bzw. Protonen transportieren.

Im ersten Schritt der Photosynthese versorgen die Reaktionszentren den primären Akzeptor mit absorbierter Strahlungsenergie (Abbildung 3.1). Sie kann in Form von Elektronen an der Lumenseite der Thylakoidmembran auf den primären Elektronendonator  $\text{P700}^+$  des PS I übertragen werden. Dieser hat zuvor seine Elektronen mit Hilfe eines Eisen-Schwefel-Proteins an das wasserlösliche Ferredoxin (Fd) an der Stromaseite der Thylakoidmembran abgegeben. Als nächsten Schritt überträgt Fd die Elektronen auf die membranassoziierte FNR, die  $\text{NADP}^+$  zu NADPH reduziert (Brettel, 1996).

Die FNR ist zugleich die respiratorische NADPH-Dehydrogenase im Elektronentransport und katalysiert folgende Reduktionen von NADPH (Forti, 1971; Shin 1971; Schautemeier *et al.*, 1985; Scherer *et al.*, 1988; Matthijs und Lubberding, 1988):

- NADPH auf Ferricyanid oder Indophenol (Diaphoraseaktivität)
- Transhydrogenaseaktivität (NADPH auf  $\text{NAD}^+$  oder NADPH auf Thio-NADP<sup>+</sup>)
- NADPH auf Cytochrom f
- NADPH auf b-Typ-Cytochrom
- NADPH auf Cytochrom c (Ferredoxin-abhängig)
- NADPH auf Plastocyanin
- NADPH auf Hydrochinon

Gereinigte FNR aus *Anabaena* zeigt mehrere Isoformen (Sancho *et al.*, 1988; Scherer *et al.*, 1988), darunter eine membrangebundene und eine lösliche. Es wird vermutet, dass die lösliche Form als Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase und die membrangebundene Form als NADPH-Chinon-Oxidoreduktase fungiert (Carrillio und Vallejos, 1983; Gómez-Lojero *et al.*, 2003).

Aus *Synechococcus elongatus* konnten bereits drei Formen der FNR gereinigt werden. Die 45 kDa Form ist an eine Domäne gebunden, die Sequenzähnlichkeit zum CpcD-Phycobilisomen-Linker-Polypeptid aufweist. Zusätzlich existiert eine 34 kDa Form, die aus einem 78 kDa Komplex mit Phycocyanin hervorgeht. Die Assoziation mit Phycocyanin über die CpcD-ähnliche Domäne verleiht der FNR von *Synechococcus elongatus* eine beträchtliche Stabilität.

Dissoziiert Phycocyanin von diesem Komplex ab, führt dies zur spezifischen proteolytischen Spaltung zwischen der CpcD-ähnlichen Domäne und der FAD-Bindedomäne und damit zur 34 kDa Form (Nakajima *et al.*, 2002).

### **3.3.2 Fettsäure-Synthetasen**

Die Fettsäuresynthese ist als essentieller Prozess für lebende Zellen mit einem hohen Energieaufwand verbunden. Sie dient dem Aufbau von Membranen und steuert über den Grad an ungesättigten Fettsäuren deren Fluidität. Die notwendigen Enzyme für die Fettsäuresynthese befinden sich in einem stringent regulierten, großen multidomänen Enzymkomplex, der Fettsäure-Synthetase. Während in Insekten, Säugetieren, Hefen und Mycobakterien die meisten Fettsäuren durch die Fettsäure-Synthetase Typ I (FAS I) hergestellt werden, besitzen Bakterien und Pflanzen zur *de-novo* Fettsäuresynthese eine Fettsäure-Synthetase Typ II (FAS II) (Schujman und de Menoza, 2005, Klein *et al.*, 1992).

Die FAS II setzt sich aus einer Serie von dissoziierbaren monofunktionalen Proteinen zusammen, die jeweils eine spezifische Reaktion katalysieren (Lu *et al.*, 2004; Stapleton und Jaworski, 1984).

Sämtliche Bakterien erzeugen Fettsäuren in sich wiederholenden Reaktionszyklen, bestehend aus Kondensation, Reduktion, Dehydrierung und Reduktion von Kohlenstoffbindungen (Abbildung 3.10).

Zwischen den einzelnen Reaktionen vermittelt das Acyl-Carrier-Protein (ACP), an das Fettsäuren kovalent gebunden sind. Das Schlüsselintermediat der Kettenverlängerung ist Malonyl-CoA, das durch die Acetyl-CoA-Carboxylase gebildet wird. Ist die gewünschte Kettenlänge erreicht, wird diese zum Substrat der Acyltransferase. Letztere transferiert die Fettsäure in die Membranphospholipide (Schujman und de Menoza, 2005).

Im Cyanobakterium *Anabaena variabilis* konnten  $\beta$ -Ketoacyl-Intermediate der Fettsäuresynthese detektiert werden. Dies lässt auf eine dissoziierte FAS II analog den Pflanzen schließen. Für Reduktionsreaktionen in der Fettsäuresynthese wird in diesem Organismus als einziger Kofaktor NADPH benötigt (Stapleton und Jaworski, 1984).

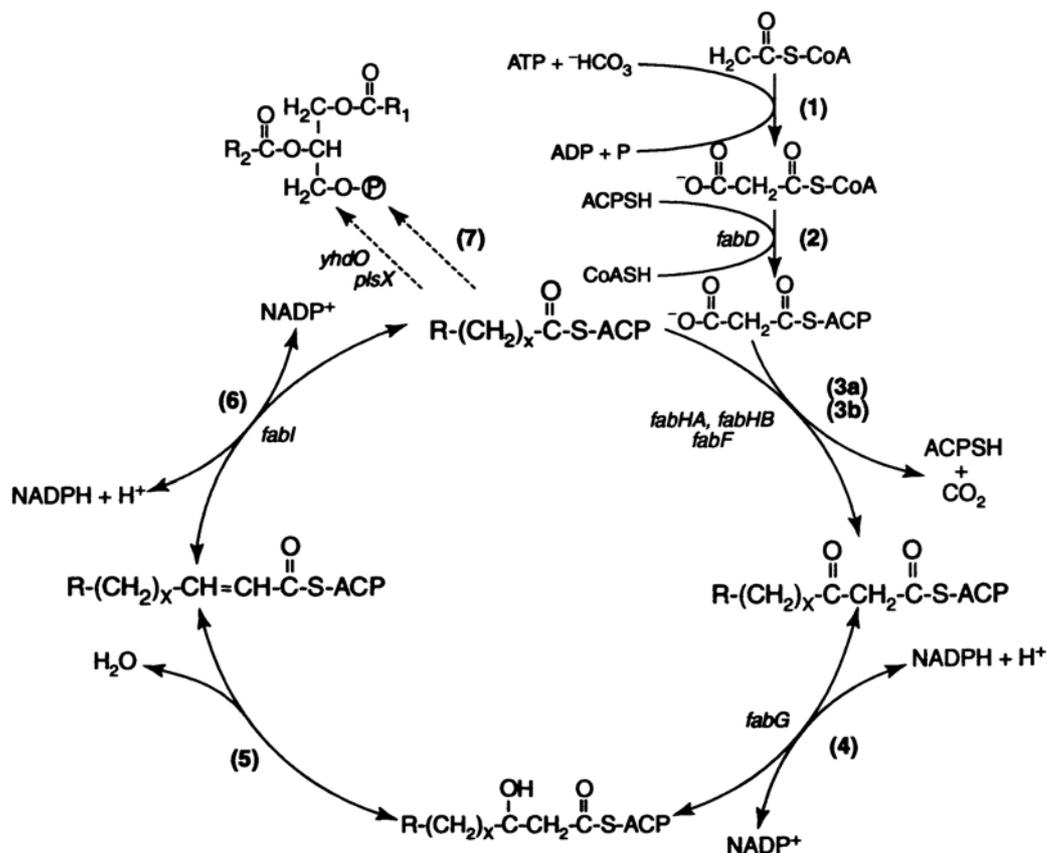


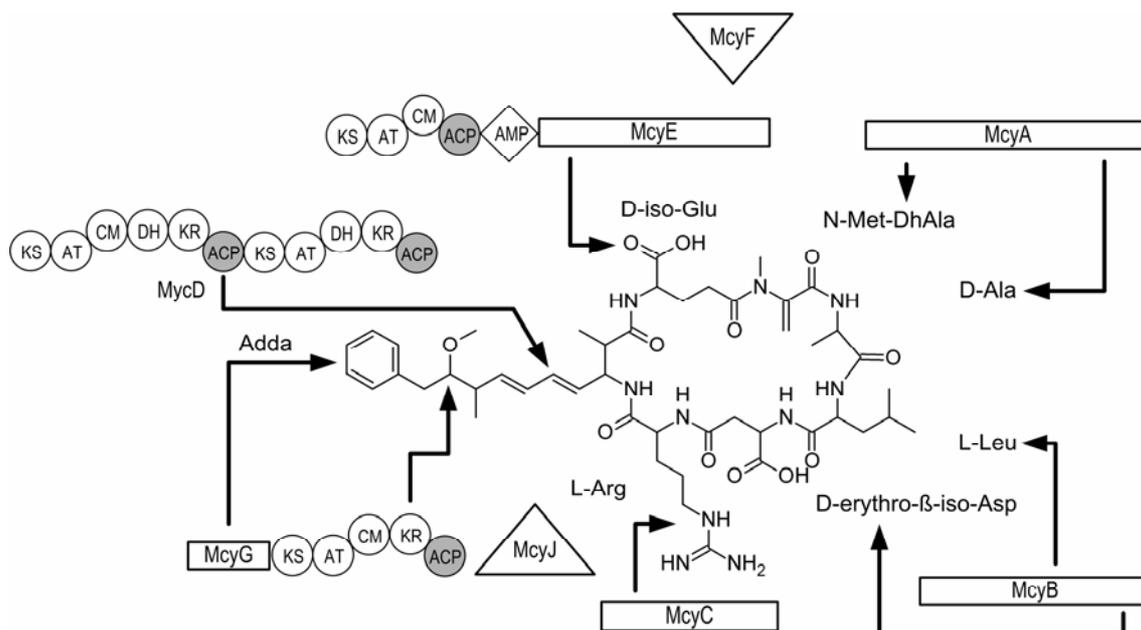
Abbildung 3.10: Bakterielle Fettsäuresynthese (Schujman und de Mendoza, 2005)

### 3.3.3 Polyketid-Synthetasen und nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen

Zyklische oder verzweigte zyklische Strukturen und Zusammensetzungen unüblich modifizierter Aminosäuren in kleinen Peptiden indizieren eine nicht-ribosomale Synthese. Viele der im letzten Jahrzehnt entdeckten pharmazeutisch wirksamen Substanzen, wie Toxine, Protease-Inhibitoren (Kodani *et al.*, 1998), Krebstherapeutika (Panda *et al.*, 1998) sowie Antimykotika (Singh *et al.*, 1999) aus Cyanobakterien zeigen Peptid- bzw. Polyketidcharakter und weisen teilweise Fettsäureseitenketten auf.

Polyketide werden als Naturstoffe im Wesentlichen von Bakterien und Pilzen produziert. Ihre Biosynthese verläuft über Poly- $\beta$ -ketone. Zu den Polyketiden gehören unter anderem Flavonoide, Stilbene, Tetracycline und Makrolide mit unterschiedlichem, zum Teil sehr komplexem Aufbau.

Mycrocystin war eines der ersten cyanobakteriellen Peptide, dem eine nicht-ribosomale Herkunft nachgewiesen wurde (Abbildung 3.11) (Dittmann *et al.*, 1997).



**Abbildung 3.11:** Beispiel einer Mycrocystin bildenden Polyketid-Synthetase. Die Pfeile markieren Angriffspunkte der reagierenden Untereinheiten (nach Dittmann *et al.*, 2001).

Der Mechanismus der Enzyme, bekannt als nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen (NRPS), wurde bei der Erforschung der Synthese von Wirkstoffen wie Vancomycin und Cyclosporin aufgeklärt. NRPS sind große Enzymkomplexe von 100-1700 kDa mit modularer Struktur (Marahiel *et al.*, 1997), bei der jedes Modul für die Aktivierung, Thiolierung, Modifizierung und Kondensation eines spezifischen Aminosäuresubstrates verantwortlich ist (Kleinkauf und von Dören, 1996). Analog der Fettsäure-Synthetase sind unterschiedlichste Redoxenzyme

bei der Herstellung von nicht-ribosomalen Peptiden beteiligt. Dabei bilden einfache aromatische Moleküle, wie z.B. Phenylacetat, das Ausgangssubstrat der Synthese.

Modulare Polyketid-Synthetasen (PKS) sind wie NRPS multifunktionale Megasyntetasen mit sich wiederholenden funktionalen Einheiten. Aromatische Polyketide werden jedoch in so genannten Typ II PKS nichtmodular synthetisiert. Die Kondensation von Methyl-Malonyl- oder Malonyl-CoA-ACP durch die Ketosynthetase ist die Startreaktion der PKS.

In Polyketid-Synthetasen für das Anabaenopeptid arbeiten teilweise auch Enzyme, die mit Enzymen der Fettsäure-Synthetase Homologien aufweisen. So zeigt ein *open reading frame* für *apdF* eine Sequenzhomologie mit der 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase (FabG) auf (Dittmann *et al.*, 2001).

### **3.4 Proteinidentifikation**

Zur Bestimmung der Funktion eines Proteins stehen prinzipiell zwei Wege zur Verfügung. Der direkte Weg ist die Isolation des gewünschten Enzyms durch eine Proteinreinigung. Der indirekte Weg erfolgt unter Verwendung molekularbiologischer Methoden und setzt spezifisches genetisches Wissen voraus.

#### **3.4.1 Proteinreinigung**

Die Reinigung eines Proteins ist essentiell für die Untersuchung seiner physikalischen und biologischen Eigenschaften. Normalerweise umfasst die Aufreinigung eines Proteins einen oder mehrere chromatographische Schritte (Bes *et al.*, 2002). Dabei reichen kleinste analytische Mengen zur Identifikation aus. Zwar muss jede Proteinreinigung als Einzelfall betrachtet werden, doch haben sich typische Vorgehensweisen für die ersten Reinigungsschritte etabliert.

Proteine können aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften wie Größe, Molekulargewicht, Ladung, Affinität zu bestimmten Gruppen, Hydrophobizität und Löslichkeit getrennt werden. Typischerweise werden diese Attribute in der Säulenchromatographie durch spezifische Sorptions- und Desorptionseigenschaften des Enzyms an Säulenmaterialien für die daraus resultierende Retention genutzt.

Das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten wird meist zur Vorklärung von Proteinlösungen vor der chromatographischen Auftrennung verwendet. Methodisch erfolgen insoweit der Einsatz wasserlöslicher Lösungsmittel, die das Protein aufgrund hydrophober Wechselwirkungen ausfällen und die Verwendung von Salzen, die einen Entzug der lösenden Hydrathülle bewirken.

Zu Beginn einer chromatographischen Proteinreinigung sind für die erste Bindung (*primary capture*) und Aufkonzentrierung von Enzymen Interaktionen mit der Oberfläche eines Proteins geeignet. Die Trennung über Ladung und Hydrophobizität mittels Ionentauschern sowie hydrophoben Säulen sind klassische Verfahrensweisen zur Bindung von Proteinen. Diese lässt sich gut über die Puffereigenschaft und die Ionenstärke des Flussmittels steuern. Die Trennung über Affinitätsmatrizes und Gelfiltration sind Methoden, die nach einer Vorreinigung der Proteinlösung verwendet werden. Während an einer Affinitätsmatrix spezifische Interaktionen zur Bindung des gewünschten Proteins führen, dient die Gelfiltration der Aufteilung von Proteinen aufgrund ihrer Größe. Dabei werden Proteine in Gelmatrizes mit definierten Porendurchmessern in Folge ihres unterschiedlichen Diffusionsverhaltens in die Poren retardiert.

### **3.4.2 Der „reverse genetics“ Ansatz**

Die Identifikation der Funktion eines Proteins kann auf direktem Wege über die Expression erfolgen. In diesem Zusammenhang wird häufig der Ansatz der Reversen Genetik (*reverse genetics*: umgekehrte Genetik) verwendet. Reverse Genetik ist die Bezeichnung für molekularbiologische Verfahren, die der normalen genetischen Analyse (Proteinisolation, Proteinsequenzierung, Klonierung) entgegenlaufen. Statt von einem Phänotyp auf einen Genotyp zu schließen, wird ein unbekanntes Gen bzw. ein Gen unbekannter Funktion durch Mutagenese, Sequenzvergleiche und hinsichtlich seiner Auswirkung auf den Wirtsorganismus bei heterologer Expression untersucht. So können neu erworbene Fähigkeiten des Wirtsorganismus direkt auf das exprimierte Fremdgen zurückgeführt werden. Voraussetzung für eine effiziente Nutzung dieser Methode ist die Verfügbarkeit der Sequenzdaten des betreffenden Gens.

## **4 Material und Methoden**

Im Folgenden sind Materialien und Methoden beschrieben, die bei dieser Arbeit ihre Verwendung fanden.

### **4.1 Material**

Die eingesetzten Laborgeräte und Chemikalien sind in Kapitel 12.1 zusammengefasst und beschrieben.

### **4.2 Allgemeine Labormethoden**

Nachfolgend werden verwendete und für ein biotechnologisches Labor typische Methoden dargestellt.

#### ***4.2.1 pH-Messung***

Die pH-Messung von wässrigen Lösungen erfolgte mittels des Messgeräts CG 843. Das Gerät wurde durch eine Zweipunktkalibrierung der pH-Elektrode zwischen pH 4,00 und 7,00 für den sauren bzw. zwischen pH 7,00 und 9,21 für den alkalischen Messbereich eingestellt.

#### ***4.2.2 Herstellung von Pufferlösungen***

Der pH von Phosphatpuffern wurde durch die gegenseitige Titration der betreffenden Pufferkomponenten mit der gewünschten Molarität erzeugt.

Für alle anderen Puffer wurden die jeweils benötigten Mengen an Puffersubstanz in 90 % des Zielvolumens in vollentionisiertem Wasser (VE-H<sub>2</sub>O) aufgelöst, mit 10 %iger HCl oder 1 M NaOH auf den gewünschten pH eingestellt und anschließend das Restvolumen aufgefüllt.

#### ***4.2.3 Photometrische Glukoseanalytik***

Ein zweistufiger Enzymtest wurde zur Bestimmung der Glukosekonzentration im Kulturmedium verwendet. Hierbei wird Glukose unter Verbrauch von ATP und Reduktion von NADP<sup>+</sup> mittels der Enzyme Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in D-Glukonat-6-Phosphat überführt. Die gebildete Menge an NADPH wurde bei einer Absorptionswellenlänge von 340 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer erfasst. Die genaue Vorgehensweise ist in Anhang 12.3.1 geschildert.

#### 4.2.4 Photometrische Acetatanalytik

Die Acetatkonzentration im Kulturmedium wurde anhand eines dreistufigen Enzymtest bestimmt. Bei der Nachweisreaktion wird L-Malat unter Reduktion von  $\text{NAD}^+$  in Oxalacetat überführt. Das hierbei gebildete reduzierte Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) wurde bei einer Absorptionswellenlänge von 340 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die genaue Vorgehensweise ist Anhang 12.3.2 zu entnehmen.

#### 4.2.5 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte von Zellsuspensionen wurde mit einem Einstrahlphotometer bei einer Wellenlänge von 730 nm bestimmt (Harano *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 1997; Albertano, 1991). Bei dieser Wellenlänge beeinflussen die akzessorischen Pigmente die Messung weitgehend nicht. Die experimentell ermittelten stammabhängigen Korrelationsfaktoren zur Berechnung der Biotrockenmasse aus der optischen Dichte sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt. Kulturdichten von *E. coli* wurden bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen. Ein Korrelationsfaktor wurde für diese Arbeit nicht erhoben.

Die Biotrockenmasse wurde aus den Werten der optischen Dichte nach Gleichung 4.1 berechnet.

Gleichung 4.1: 
$$c_x = OD \cdot f_x$$

Mit  $OD$  Optische Dichte bei 730 nm, -  
 $f_x$  Korrelationsfaktor,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$

**Tabelle 4.1** Korrelationsfaktoren zur Berechnung der Biotrockenmasse aus der optischen Dichte bei 730 nm

Mikroorganismus	Korrelationsfaktor $f_x$ , $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$
<i>Synechococcus</i> PCC7942	0,2699
<i>Nostoc muscorum</i>	0,748
<i>Anabaena variabilis</i>	0,7857

#### 4.2.6 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die direkte Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgte gravimetrisch. Zur Sedimentation (10000 g, 4°C, 10 min) der Zellsuspension wurden gewogene und getrocknete (80°C Trockenschrank) 10 mL Pyrex Zentrifugengläser verwendet. Die Zellen wurden sodann einmal mit VE-H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment

zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Konzentration an Biotrockenmasse errechnet sich nach Gleichung 4.2.

Gleichung 4.2: 
$$c_X = \left( \frac{m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}}}{V_P} \right)$$

Mit	$m_{\text{voll}}$	Masse des Probegefäßes mit trockenen Zellen, g
	$m_{\text{leer}}$	Masse des leeren Probegefäßes, g
	$V_P$	Volumen der eingesetzten Zellsuspension, L

#### 4.2.7 Lichtspektrum und Intensitätsmessungen

Die Intensität des Lichtes der photosynthetisch aktiven Lichtstrahlung im Bereich zwischen 400 nm und 700 nm wird mit der physikalischen Größe PAR (*Photosynthetic Active Radiation*) beschrieben. Diese Größe charakterisiert den Wellenlängenbereich, den die Lichtsammelfallen phototropher Organismen effizient nutzen. Sie entspricht 43 % der auf die Erde treffenden Lichtenergie (Tredici, 1999). Dabei werden Lichtquanten entsprechend ihrer Wellenlänge und der damit verbundenen Effizienz in der Photosynthese gewichtet. PAR besitzt die Einheit  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Sie wurde mit einem speziell kalibrierten Quantumsensor LI-190SZ gemessen und über einen Datenlogger LI-189 ausgewertet.

Die Messungen des Lichtspektrums erfolgten mit einem Spektroradiometer LI-1800 in einem Wellenlängenbereich zwischen 300 nm und 800 nm.

#### 4.2.8 Ultrazentrifugation

Um Mikrosomen und Membranfragmente aus dem Zellhomogenat ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$  gelöstes Lyophilisat) zu entfernen, wurden die Proben ultrazentrifugiert ( $100000 \text{ Xg}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 60 min) (Scopes, 1994). Das maximale Füllvolumen des SW 40 Ti Rotors betrug  $6 \times 14 \text{ mL}$ . Der Überstand konnte für chromatographischen Zwecke eingesetzt werden.

#### 4.2.9 Dialyse

Zum Pufferwechsel wurden Dialyseschläuche (Cellutrans<sup>®</sup>, Roth) aus regenerierter Zellulose mit einem molekularen Größenausschluss (MWCO) von 12-14 kDa verwendet.

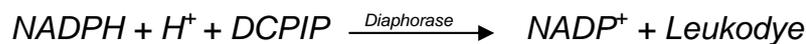
Nach dem Befüllen des Dialyseschlauches wurden beide Öffnungen mit Schlauchklammern verschlossen und in ein Puffervolumen entsprechend dem 500-1000fachen Probevolumen

überführt. Der Pufferaustausch wurde für 6 bis 12 h bei 4°C unter leichtem Rühren auf einem Magnetrührer vorgenommen.

### 4.2.10 Diaphoraseaktivität

Die Diaphoraseaktivität diente dem Nachweis der FNR. Dazu wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm die Bleichung von 2,6-Dichlorphenol-indophenol (DCPIP), einem blauen Farbstoff, verfolgt.

Die zugrunde liegende Reaktion lautet:



In einer Küvette wurde die Absorptionsänderung der Analysenlösung gemäß Tabelle 4.2 in den ersten 30 sec gemessen und anschließend die Aktivität in  $\text{U g}^{-1}$  bestimmt.

**Tabelle 4.2** Zusammensetzung der Analysenlösung für den Nachweises der Diaphoraseaktivität in 1 mL Küvetten

Lösung	Volumen
50 mM Tris-HCl      pH 8,0	600 $\mu\text{L}$
0,19 mM DCPIP	250 $\mu\text{L}$
0,5 mM NADPH	50 $\mu\text{L}$
Enzymprobe	100 $\mu\text{L}$

$\epsilon_{\text{DCPIP}}=21 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Bei Messungen während einer Proteinreinigung wurden nur die Absorptionsänderungen ( $\text{min}^{-1}$ ) zur Quantifizierung herangezogen. Als Hintergrundabgleich diente eine Lösung, deren Anteil an NADPH- und Proteinlösung durch  $\text{VE-H}_2\text{O}$  ersetzt wurde. Bei der Auswertung bezog sich die Aktivität auf 1 mL der jeweiligen Enzymlösung.

### 4.2.11 In-vitro-Ketonreduktion

Zum Nachweis einer Ketonreduktion wurde ein *in-vitro*-Ketonreduktionssystem im 1 mL Maßstab verwendet. In diesem System wurde die Proteinprobe entsprechend Tabelle 4.3 gemischt und gasdicht verschlossen. Über ein Septum im Reaktorkopf wurden 1,4 mM PFAP (0,2  $\mu\text{L}$ ) über eine Hamiltonspritze in die Probe injiziert. Der Reaktionsansatz wurde 24 h bei  $600 \text{ min}^{-1}$  auf einem Multititerplattenschüttler bei 20°C und  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  inkubiert. Die Proteinlösung wurde anschließend analog Kapitel 4.11 extrahiert und analysiert.

**Tabelle 4.3** Zusammensetzung des *in-vitro*-Ketonreduktionssystems

Lösung	Volumen
Proteinprobe	900 $\mu\text{L}$
200 g L <sup>-1</sup> Glukose	50 $\mu\text{L}$
5 mM NADPH	50 $\mu\text{L}$

### 4.3 Cyanobakterienstämme und Stammhaltung

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten phototrophen Organismen sind Süßwasserorganismen und im Folgenden detailliert beschrieben. Alle Organismen wurden standardmäßig in BG-11-Medium kultiviert (Tabelle 12.15).

#### 4.3.1 *Synechococcus PCC7942*

Der Stamm *Synechococcus PCC7942* wurde von der Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria des Institut Pasteur in Paris als Aktivkultur erworben. *Synechococcus* ist ein einzelliges obligat photoautotrophes Cyanobakterium ohne Motilität und gehört den *chroococcales* Cyanobakterien an (Rippka *et al.*, 1979). Entsprechend der taxonomischen Neueinordnung ist der Stamm auch unter den Namen *Anacystis nidulans*, *Synechococcus elongatus* (PCC6301) und *Synechococcus leopoliensis* in der Literatur bekannt. Der Stamm PCC7942 ist eine Mutante des Stammes PCC6301. *Synechococcus PCC7942* erscheint in verdünnter gerührter Kultur in grüner Farbe mit homogen verteilten Zellen (Anhang 12.5.5).

#### 4.3.2 *Anabaena variabilis*

Der Stamm *Anabaena variabilis* wurde vom Lehrstuhl für Mikrobiologie Weihenstephan (FML) als Aktivkultur bezogen. Der Organismus ist ein obligat photoautotrophes heterocystisches Cyanobakterium (Rippka *et al.*, 1979). *Anabaena* erscheint in verdünnter Kultur in einer intensiven dunkelgrünen Farbe mit filamentösen Zellaggregaten (Anhang 12.5.5).

#### 4.3.3 *Nostoc muscorum*

Der Stamm *Nostoc muscorum* wurde vom Lehrstuhl für Mikrobiologie Weihenstephan (FML) als Aktivkultur bezogen. Der Organismus ist ein photoheterotrophes heterocystisches Cyanobakterium (Rippka *et al.*, 1979). *Nostoc muscorum* erscheint in verdünnter Kultur in einer grünbraunen Farbe mit filamentösen Zellaggregaten (Anhang 12.5.5).

### **4.3.4 Dauerkulturformen zur Stammhaltung**

Cyanobakterien werden zur Stammhaltung weitgehend auf Festmedien kultiviert. Dennoch ist es möglich, diese Organismen auch in Cryokulturen aufzubewahren. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Techniken angewandt. Sie sind deshalb nachfolgend im Einzelnen detailliert beschrieben.

#### **Cryokulturen**

Die Cryokulturen wurden nach einem modifizierten Protokoll von Jerry Brand, des botanischen Institutes der University of Texas in Austin, USA, hergestellt (Cyanosite, 2002).

Die *Synechococcus* Kulturen aus 250 mL Blasensäulen wurden nach 48 h, 96 h, 144 h und 240 h in sterilen Zentrifugenbechern geerntet und aufkonzentriert (4950 Xg, 20°C, 30 min). Die Ernte der anderen Stämme erfolgte nach 240 h. Das Zellpellet wurde in sterilem, mit 50 % VE-H<sub>2</sub>O verdünnten BG-11-Medium auf eine OD<sub>730</sub> von 6 verdünnt und in Cryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C dunkel gelagert. Die Reaktivierung der Cryokultur erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln. 1 mL aufgetaute Zellen wurden in 100 mL Schüttelkolben resuspendiert und gemäß Kapitel 4.5.1 kultiviert.

#### **Festmedienkulturen**

Alle Cyanobakterien wurden auf 15 %igen BG-11-Schrägagar kultiviert. Das Festmedium wurde entweder mit einer Impföse oder mit 100 µL Flüssigkultur angeimpft. Die Organismen wuchsen bei Raumtemperatur (RT) und Laborlicht. Nach jeweils 2-3 Monaten mussten die Zellen in frische Schrägagarröhrchen überimpft werden.

Zum Beimpfen einer Flüssigkultur wurden mit einer Impföse Zellen von Festmedium abgenommen, in 100 mL gerührten Kolben übertragen und entsprechend Kapitel 4.5.1 kultiviert.

### **4.3.5 Industrielle phototrophe Organismen**

#### ***Chlorella vulgaris***

*Chlorella vulgaris* wurde vom IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Bergholz-Rehbrücke, als Lyophilisat bezogen. *Chlorella* ist eine im Süßwasser weit verbreitete eukaryotische einzellige Grünalge. Der Organismus wurde in dieser Arbeit nicht kultiviert, sondern als Pulver direkt eingewogen und in Biotransformationen appliziert.

***Nostoc spp.***

*Nostoc spp.* bzw. *Nostoc commune* wurde vom IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Bergholz-Rehbrücke, als getrocknete Flechten bezogen. Der Ursprung dieser Zellen war Oberburma. Dort wurde der Organismus aus Wildbeständen in Akazienwäldern gesammelt. Der Organismus wurde in dieser Arbeit nicht kultiviert, sondern als Pulver direkt eingewogen und in Biotransformationen appliziert.

**4.4 *E. coli* Stämme und Stammhaltung**

Im Folgenden werden gentechnisch veränderte *E. coli* Stämme beschrieben, die zur Klonierung und Expression von Oxidoreduktasen bei den Experimenten eingesetzt wurden.

**4.4.1 *E. coli* BL21 (DE3)**

*E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) wurde in Form einer Glycerinkultur bezogen. Dieser Stamm diente der rekombinanten Expression klonierter Oxidoreduktasen und besaß folgenden Genotyp: B<sup>-</sup> F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte.*

**4.4.2 *E. coli* JM109 (DE3)**

*E. coli* JM109 (DE3) (Promega, Wiskonsin, USA) wurde in Form einer Glycerinkultur erworben. Der Stamm diente der rekombinanten Expression klonierter Oxidoreduktasen und besaß folgenden Genotyp: (*endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), relA1, supE44, λ-*, Δ(*lac- proAB*), [F<sup>'</sup>, *traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>ΔM15*], IDE3).

**4.4.3 *E. coli* XL Gold**

*E. coli* XL Gold ultrakompetente Zellen (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) wurden als gebrauchsfertige Glycerinkulturen bezogen. Diese wurden bei -80°C gelagert. Der Stamm besaß folgenden Genotyp: (Tet<sup>r</sup> Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F<sup>'</sup> *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>*]).

**4.4.4 Stammhaltung**

0,5 mL *E. coli* Zellen aus Glycerinkulturen wurden in 50 mL LB-Medium (Anhang 12.1.8) suspendiert und in 500 mL Schüttelkolben mit Alukappen als Sterilbarriere ohne Schikanen bei 200 min<sup>-1</sup> mit einer Exzentrizität von 5 cm bei 37°C kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 1

wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und mit 30 % sterilem Glycerin versetzt. Die so präparierten Zellen wurden als 1 mL Portionen in sterilen Cryoröhrchen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert.

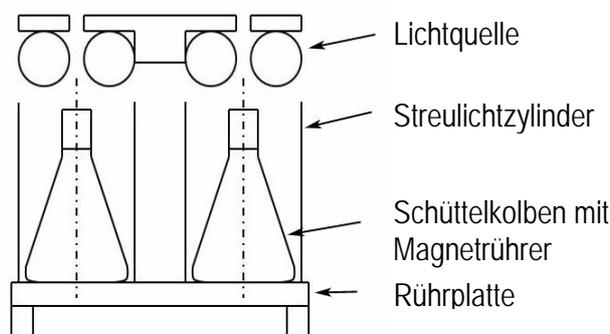
### 4.4.5 Kultivierung in Schüttelkolben

Als Inokulum dienten 0,5 mL einer dichten *E. coli* Anreicherungskultur, die gemäß Kapitel 4.4.4 aus einer Glycerinkultur über Nacht angezogen wurde. Die Zellen wurden in 500 mL Kulturkolben mit Alukappen als Sterilbarriere mit einem Füllvolumen von 50 mL LB-Medium suspendiert. Die Kultivierung erfolgte bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Schüttelinkubator bei  $200\text{ min}^{-1}$  und einer Exzentrizität von 5 cm. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 660 nm überwacht.

## 4.5 Kultivierung von Cyanobakterien

### 4.5.1 Kultivierung in gerührten Kolben

Zur Kultivierung von Cyanobakterien wurden 250 mL gerührten Kolben mit Alukappen als Sterilbarriere verwendet. Die gerührten Kolben waren mit 100 mL sterilem BG-11-Medium (Abbildung 4.1) befüllt.



**Abbildung 4.1:** Kultivierungssystem mit gerührten 250 mL Erlenmeyerkolben

Der Einsatz von Magnetrührfischen bei  $200\text{ min}^{-1}$  bewirkte die Durchmischung des Kulturmediums. Sechs äquivalent beleuchtete Rührplätze, die parallel in einem Kühlinkubator bei  $20^{\circ}\text{C}$  betrieben werden konnten, standen zur Verfügung. Um eine reproduzierbare Ausleuchtung zu gewährleisten, wurden Streulichtzylinder eingesetzt, die unter Verwendung von Lochblenden eine Lichtintensität von bis zu  $102\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ermöglichten (Anhang 12.1.3). Als Inokulum dienten Abstriche mit einer Impföse von Festmedienkulturen des jeweiligen Stammes.

#### 4.5.2 Kultivierung in 250 mL Blasensäulen

Zur Kultivierung von Cyanobakterien im 250 mL Maßstab wurden Blasensäulen (Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz) mit einem Volumen von 400 mL eingesetzt (Abbildung 4.2 und Anhang 12.1.4). Die verwendeten Reaktoren wurden über eine Membran aus PTFE (Porengröße von  $\varnothing=0,2 \mu\text{m}$ ) steril begast. Der feuchtigkeitsgesättigte Gasstrom von  $0\text{--}60 \text{ L h}^{-1}$  wurde an der Gas-Flüssig-Grenze über eine lasergebohrte Edelstahlplatte mit einem Lochdurchmesser von  $60 \mu\text{m}$  in definierte Gasblasen über den ganzen Querschnitt verteilt (Altenbach-Rehm *et al.*, 1999). Die Blasensäule war mittels einer Alukappe als Sterilbarriere zur Außenwelt abgeschlossen und konnte als Ganze bei  $121^\circ\text{C}$  autoklaviert werden. Zwei seitliche Gewindestutzen gestatteten eine sterile Probenentnahme, ohne den Reaktor von seinem Versorgungsmodul abzukoppeln zu müssen. Eine Gasmischstation erlaubte die individuelle Einstellung des  $\text{CO}_2$ -Gehaltes in der Zuluft.

Bis zu 16 Reaktoren konnten in einem modifizierten Profors-Inkubator (Infors HT, Bottmingen-Basel-Basel, Schweiz) mit regulierbarem Gasfluss bei  $25^\circ\text{C}$  betrieben werden. Dabei ermöglichten Streulichtzylinder und Lochblenden reproduzierbare Lichtverhältnisse in den Reaktoren (Abbildung 4.3).

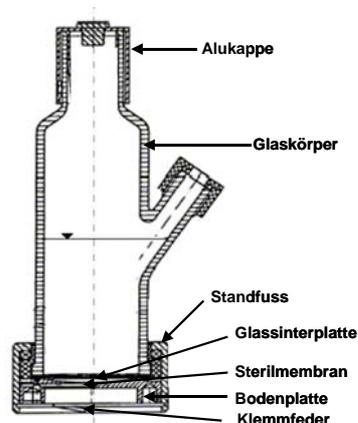


Abbildung 4.2: 250 mL Blasensäule

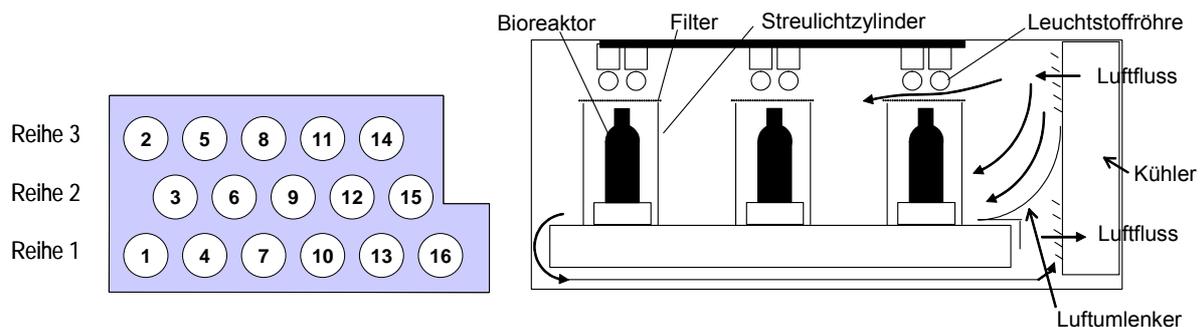
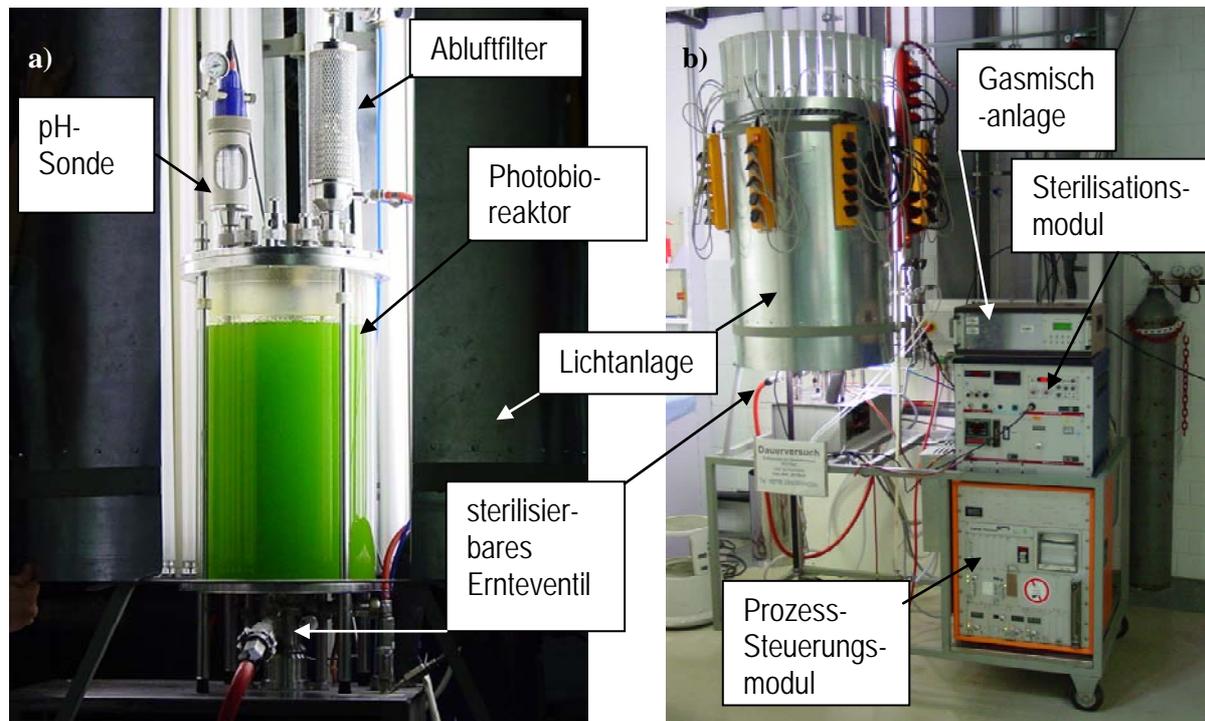


Abbildung 4.3: a) Aufsicht und b) Seitlicher Querschnitt durch das parallel Blasensäulensystem

Als Inokulum dienten  $1,35 \text{ mg}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  Zellen aus gerührten Kolben, die monoseptisch in die Blasensäulen unter einer Sterilwerkbank überführt wurden. Die Kultivierung erfolgte in 250 mL BG-11-Medium in autoklavierten Blasensäulen bei einer Begasungsrate von  $10 \text{ L h}^{-1}$  mit 5 %  $\text{CO}_2$  angereicherter Reinluft bei  $25^\circ\text{C}$ . Die Lichtintensität konnte hierbei zwischen  $18\text{-}106 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  variiert werden und betrug soweit nicht anders angegeben  $93 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Als Lichtquelle dienten drei Paar 30 W Leuchtstoffröhren des Typs SunGlo (Hagen, Holm) und Fluora L77 (Osram, München).

### 4.5.3 Kultivierung im 20 L Rührkesselreaktor

Als Reaktor für Kultivierungen im 20L-Maßstab diente ein 20L-Labor Pilot Fermenter CF 3000 mit einem Glaszylinder Typ G (Chemap AG, Volkertswil, Schweiz) (Anhang 12.1.5 und Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4:** 20 L-Rührkesselreaktor. a) Frontansicht b) Seitenansicht mit Beleuchtungsmantel.

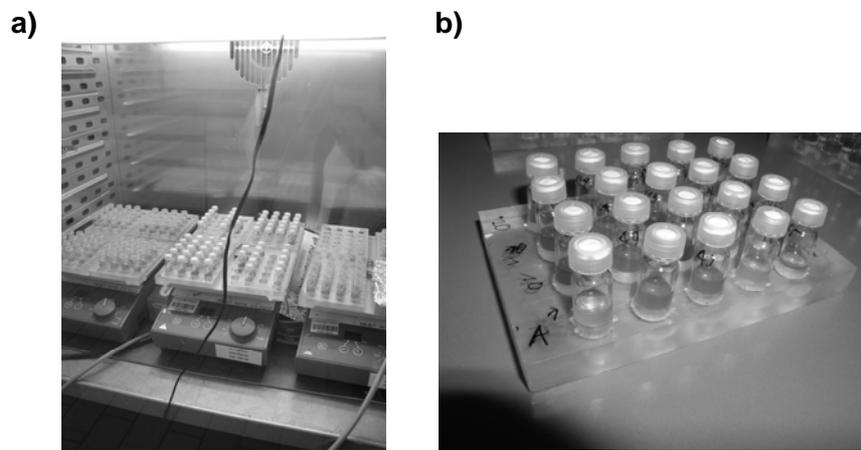
Dieser wurde mit 20 L BG-11-Medium befüllt und über die Heizvorrichtung *in-situ*-sterilisiert. Die dabei verdampfte Wassermenge betrug 0,25 L. Nach Erreichen der Züchtungstemperatur von  $25^\circ\text{C}$  wurde mit einer  $\text{OD}_{730}$  von 0,005 ( $1,35 \text{ mg}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ ) angeimpft. Die Kultivierung im Reaktor erfolgte unter einer Begasungsrate von  $0,5 \text{ L min}^{-1}$  (Borodin *et al.*, 2002) mit Reinluft bei einer Rührerdrehzahl von  $250 \text{ min}^{-1}$ , um eine Sedimentation der Zellen zu verhindern (Ogbonna und Tanaka, 1997). Durch eine Verknüpfung der pH-

Messeinrichtung des Reaktors mit der Regeleinrichtung der Zuluft wurde der pH des Nährmediums über den CO<sub>2</sub>-Gehalt der Zuluft geregelt (Straka *et al.*, 2000).

Der Reaktor war mit einem Beleuchtungsmantel mit 18 Paar 40W-Leuchten des Typs SunGlo (Hagen, Holm) und Fluora L77 (Osram, München) versehen, die eine symmetrische Beleuchtung mit 36-528  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  gewährleistet.

#### 4.5.4 Kultivierung im 1 mL Reaktor

Für die Erforschung des Einflusses von Substanzen auf das Wachstum phototropher Mikroorganismen war eine Vielzahl von parallelen Experimenten erforderlich. Um den experimentellen Aufwand in einem vertretbaren Rahmen zu halten, wurde ein System im Millilitermaßstab entwickelt (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5:** 1 mL Reaktoren im **a)** Mikrotiterplattenschüttler im Kühlbrutschrank und **b)** im Ständer mit 20 Reaktoren

Hierzu wurden die Gummisepten aus Deckeln von Schraubdeckelfläschchen gelocht ( $\varnothing$  4 mm). Die entstandene Öffnung wurde mit einem ausgestanzten Teflon-Sterilfilter ( $\varnothing=8$  mm) mit einem Porendurchmesser von 0,2  $\mu\text{m}$  verschlossen. So war das Fläschchen als Ganzes autoklavierbar (Abbildung 4.5b). Der konstanten Verdunstung wurde durch Flüssigkeitszugabe entgegengewirkt.

Je 20 1 mL Reaktoren passten in einen aus Plexiglas gefertigten Ständer. So wurden bis zu 80 Reaktoren auf einem Mikrotiterplattenschüttler platziert und zugleich von allen Seiten mit Licht versorgt. Zur Kultivierung und Biotransformation befand sich der Mikrotiterplattenschüttler in einem Kühlbrutschrank bei 20°C. Für die Kultivierung wurde der Kühlbrutschrank mit einer Lichtanlage, bestehend aus zwei Paar 18W Leuchtstoffröhren des Typs SunGlo (Hagen, Holm) und Fluora L77 (Osram, München), mit einer Lichtintensität von

$42 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ausgerüstet. Die Zellen wurden bei einer Exzentrizität von 3 mm bei  $600 \text{ min}^{-1}$  kultiviert.

### 4.6 Wachstumskinetische Untersuchungen in Blasensäulen

#### 4.6.1 Kultivierungsbedingungen

*Synechococcus* PCC7942 wurde gemäß Kapitel 4.5.2 in 250 mL Blasensäulen mit Glasfilterplatten (Porendurchmesser  $\varnothing=10\text{-}16\mu\text{m}$ , 3 mm Stärke) zur Dispersion der Blasen kultiviert. Die Reaktoren wurden mit einer Begasungsrate von  $10 \text{ L h}^{-1}$  bei  $20^\circ\text{C}$  für 264 h in einem Profors-Inkubator (Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz) betrieben. Die Lichtintensitäten zwischen  $20\text{-}105 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  wurden mit Lochblenden für jeden Reaktor individuell eingestellt.

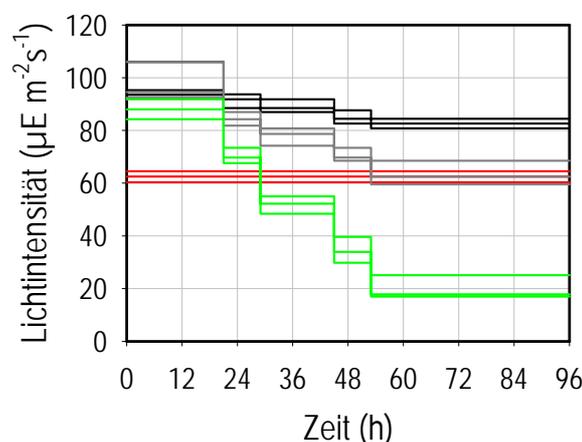
In Abständen von 24 h wurden Proben über einen tottraumarmen 3-Wege-Hahn, der über eine Kanüle (100 mm,  $\varnothing=1\text{mm}$ ) durch ein Septum steril mit der Kulturflüssigkeit verbunden war, kontaminationsfrei entnommen. Über einen zweiten Stutzen wurde durch einen Spritzenfilter (PET,  $\varnothing=0,2 \mu\text{m}$ ) das entnommene Volumen mit Medium und das Verdunstungsvolumen mit VE- $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Die Proben wurden anschließend gemäß Kapitel 4.2.1 und 4.2.5 auf ihren pH und ihre OD vermessen.

#### **Kultivierung mit konstanten Lichtprofilen**

Jeder Reaktor wurde während der gesamten Kultivierungszeit bei einer konstanten Lichtintensität, wie oben beschrieben, betrieben.

#### **Kultivierung mit veränderlichen Lichtprofilen**

Je drei Reaktoren wurden mit einem veränderlichen Lichtprofil gemäß Abbildung 4.6 parallel kultiviert.



**Abbildung 4.6:** Veränderliche Lichtprofile.

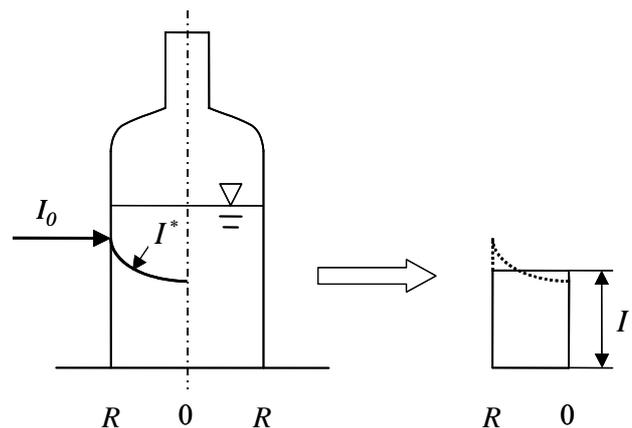
#### 4.6.2 Modellentwicklung der Absorption

Zwei geeignete Modelle für die Beschreibung der Lichtverhältnisse in einem Photobioreaktor sind das Lambert-Beer'sche Gesetz sowie das Absorptionsmodell von Reynolds und Pacala (1993) (Tabelle 3.2). Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt nur, solange der Weg des Lichtes im Medium sowie die Biomassekonzentration gering sind und keine Mehrfachstreuungen vorliegen. Um die Absorption bei höheren Biomassekonzentration beschreiben zu können, wurde der Absorptionsterm des Lambert-Beer'schen Gesetzes modifiziert:

Gleichung 4.3: 
$$I = I_0 \cdot e^{-(\varepsilon \sqrt{c_x} L)}$$

Absorptionsmessungen unterschiedlicher Kulturdichten dienen als Grundlage für die sogleich beschriebene Ermittlung des Absorptionskoeffizienten. Hierzu wurden folgende Annahmen getroffen:

- Die Blasensäulen wurden als ideal angesehen. Die Biomassekonzentration war über den gesamten Querschnitt konstant.
- Die eingestrahelte Lichtintensität  $I_0$  wurde durch das Medium gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz abgeschwächt.
- Der Lichteintrag in das Medium wurde durch die mittlere integrale Lichtintensität  $I^*$  beschrieben (Abbildung 4.7).



**Abbildung 4.7:** Modellannahme zur mittleren integralen Lichtintensität  $I^*$

Die mittlere integrale Lichtintensität  $I^*$  berücksichtigt den Verlauf der Lichtabschwächung durch Integration des Gesetzes von Lambert-Beer vom Mittelpunkt 0 bis zum Radius  $R$  gemäß Gleichung 4.4.

Die Fläche unterhalb der gestrichelten Linie entsprach der Fläche eines Rechteckes mit der Höhe  $I^*$  und der Breite  $R$  (Abbildung 4.7). Die Lichtabschwächung im Medium ließ sich in diesem Zusammenhang mit der Höhe  $I^*$  charakterisieren, da die Breite  $R$  für die Reaktoren konstant war.

Gleichung 4.4: 
$$I^* = \frac{1}{R} \int_0^R I(c_x, r) dr$$

Mit  $I^*$  Mittlere integrale Lichtintensität,  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$   
 $R$  Radius, cm  
 $I$  Lichtintensität an Position  $r$ ,  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$

### **Messungen der Absorption in Blasensäulen**

Die Messanordnung zur Absorptionsuntersuchung in Kulturen von *Synechococcus* PCC7942 zeigt Abbildung 12.4. Mit einem Messzylinder über einem abgeschirmten Quantummeter wurde die Absorption unterschiedlicher Lichtwege in Kulturen gemessen. Bei einer Ausgangslichtintensität von  $44 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  wurden in dem Zylinder die Absorptionen von Kulturen unterschiedlicher optischen Dichten zwischen 0 und 1,49 gemessen. Der Abstand des Füllstandes von der Lichtquelle war bei allen Messungen konstant.

### **4.6.3 Modellentwicklung der Kinetik**

#### **Primäre Datenanalyse**

Als erster Schritt der Modellierung wurden die spezifische Wachstumsrate nach Gleichung 3.2 und die relative Quantenausbeute nach Gleichung 4.5 bei konstanter Beleuchtung analysiert.

Gleichung 4.5: 
$$q_{I_0} \equiv \frac{1}{c_x} \frac{dc_x}{dI_0}$$

Mit  $q_{I_0}$  Relative Quantenausbeute,  $\mu\text{E}^{-1} \text{m}^2\text{s}$

#### **Empirische Modelle**

Modelle, die eine Wachstumsrate  $\mu$  als Funktion der Lichtintensität beschreiben, sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Das Modell nach Aiba berücksichtigt als einziges empirisches Modell eine Lichtlimitierung ( $K_s$ ) und eine Inhibierung ( $K_i$ ) durch das Licht. Durch Einführung eines Dämpfungsterms konnte die Anpassungsphase des Organismus zu Beginn der Kultivierung besser beschrieben werden:

Gleichung 4.6:

$$\mu = \left( \frac{\mu_{\max} I^*}{K_S + I^* + \frac{I^{*2}}{K_i}} \right) \cdot \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right)$$

Mit  $K_S$  Halbsättigungskonstante,  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$   
 $K_i$  Lichtinhibierungskonstante,  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$   
 $\tau$  Dämpfungszahl, h

### **Parameteranpassung**

Neun von insgesamt 24 Experimenten mit konstanten und veränderlichen Lichtprofilen waren die Grundlage für die Parameteranpassung des empirischen Modells nach Aiba und des mechanistischen Modells nach Eilers und Peeters. Die verbleibenden 15 Experimente dienten der Modellvalidierung.

Die Parameteranpassung wurde mittels einer Matlab-Oberfläche, basierend auf einem genetischen Algorithmus, durchgeführt (Tabelle 4.4). Zielfunktion der Optimierung war die Minimierung der Summe der Fehlerquadrate der Abweichungen zwischen Modell und experimentellen Daten.

**Tabelle 4.4** Einstellungsparameter des verwendeten genetischen Algorithmus zur Parameteridentifikation

Binärzeichenkettenlänge	20
Populationsgröße	50
<i>cross-over</i>	Multipoint
<i>cross-over</i> -Wahrscheinlichkeit	0,8
Mutationswahrscheinlichkeit	0,02
Präzision	20
Abbruchskriterium	Generationsanzahl (50)

### **4.6.4 Simulationswerkzeuge**

#### **MATLAB**

MATLAB, abgeleitet von MATrix LABoratory, ist ein Softwarepaket für numerische Mathematik. Unterteilt in ein Basismodul und zahlreiche Erweiterungspakete, so genannte Toolboxes, ermöglicht MATLAB die simulative Lösung auftretender Problemstellungen (Angermann *et al.*, 2003).

### **Simulink**

Simulink ist eine Blockset-Erweiterung von MATLAB zur Modellierung, Simulation und Analyse dynamischer Systeme. Die graphische Bedienoberfläche erlaubt die Darstellung eines Systems in Form eines Signalfussplans bestehend aus verknüpften Funktionsblöcken (Angermann *et al.*, 2003).

## **4.7 Wachstumskinetische Untersuchungen im Rührkesselreaktor**

Im Folgenden werden Annahmen und die daraus resultierende experimentelle Vorgehensweise zur Modellierung einer Kultivierung in einem 20L Rührkesselreaktor beschrieben.

### **4.7.1 Kultivierungsbedingungen**

Zur Parameterbestimmung wurden Zellen gemäß Kapitel 4.5.3 für 96 h bei  $36 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  kultiviert und anschließend die Lichtintensität für 168 h auf einen neuen konstanten Wert von 83, 160, 300 oder  $528 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  eingestellt. Die Biomasse und der physiologische Zustand der Zellen wurden über den ganzen Kultivierungszeitraum aufgezeichnet.

### **4.7.2 Modellentwicklung der Absorption**

Im Gegensatz zur Kultivierung in Blasensäulen hat das Lambert-Beer'sche Gesetz aufgrund hoher Zelldichten und langer Strahlungswege im 20L-Rührkesselreaktor nur eingeschränkte Gültigkeit. Es wurde angenommen, dass mit zunehmender Biomasse die Lichtintensität über den Radius zum Zentrum sinkt. Solange keine Inhibierung des Organismus in Folge zu hoher Lichtintensitäten vorlag, befanden sich im Reaktor Zonen mit niedrigem Wachstum und eine Absterbezone. Wirkte die Lichtintensität inhibierend, so war zusätzlich im Bereich des Außenradius von einer Inhibierungszone auszugehen.

Folgende Annahmen wurden daher getroffen:

- Die Konzentration der Biomasse war über den gesamten Querschnitt konstant. Ein idealer Rührkesselreaktor wurde angenommen.
- Es lag eine ideale Verteilung der Blasen vor, d.h. Streuungseffekte oder Reflexionen der Lichtstrahlen an den Gasblasen wurden vernachlässigt.
- Die Wachstumsrate war ortsabhängig aufgrund der Unterteilung des Reaktors in Zonen mit unterschiedlichen Wachstumsbedingungen. Die Ursache lag in der radialen Abnahme der Lichtintensität.

- In Abhängigkeit von den vorliegenden Lichtverhältnissen wurde eine Summe von lokalen Wachstumsgeschwindigkeiten mit einer mittleren integralen Wachstumsgeschwindigkeit nach Cornet *et al.* (1995) (Gleichung 4.7) angenommen.

Gleichung 4.7: 
$$\mu_{\text{Ave}} = \frac{1}{V} \int_V \mu(I) dV$$

Mit  $\mu_{\text{Ave}}$  Mittlere integrale Wachstumsgeschwindigkeit,  $\text{h}^{-1}$

Für die Simulation wurden das Absorptionsmodell von Lambert-Beer und das Modell von Reynolds und Pacala (1993) (Tabelle 3.2) um ein weiteres modifiziertes Modell nach Reynolds und Pacala (Gleichung 4.8) erweitert.

Gleichung 4.8: 
$$I = \frac{I_0}{1 + k \cdot c_X \cdot r + \exp(-0,002 \cdot I_0)}$$

Mit  $r$  Lichtweg  $r$ , cm  
 $c_X$  Biomassekonzentration,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$   
 $k$  Absorptionskoeffizient,  $\text{L cm}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$

Die erhobenen Absorptionsdaten (Kapitel 4.7.3) wurden zur Anpassung der Absorptionsmodelle herangezogen. Für jeden Messpunkt im Reaktor wurde der zugehörige Absorptionskoeffizient ermittelt und der Mittelwert aus der Summe der Koeffizienten bestimmt. Die zweite Hälfte der Daten validierte die Absorptionsmodelle.

### 4.7.3 Lichtmessungen im Reaktor

Die Absorptionsmessungen wurden submers im 20L-Rührkesselreaktor mit einem Quantumsensor durchgeführt, der horizontal in einer Glasröhre befestigt war (Abbildung 12.6). Der Sensor war nach oben mit einem lichtundurchlässigen Material abgeschirmt. Die Messungen erfolgten mit unterschiedlichen radialen Abständen vom Reaktorzentrum und verschiedenen Zelldichten.

### 4.7.4 Modellentwicklung der Kinetik

Zur Modellierung wurde das Modell von Aiba (1982) verwendet (Tabelle 3.3). Dieses Modell berücksichtigt den Effekt der Lichtinhibierung bei zu hohen Lichtintensitäten sowie eine mögliche Lichtlimitierung.

Für die Berechnung ortsabhängiger Wachstumsraten wurde der Radius des Reaktorzylinders in 10 gleich große Segmente der Länge 0,0125 m aufgeteilt. Mit den experimentellen Daten der eingestrahnten Lichtintensität  $I_0$ , der Biomassekonzentration  $c_x$  und der Zeit  $t$  wurden linear über den Radius des Reaktors die vorherrschenden Lichtintensitäten berechnet. Mit Hilfe einer Zugehörigkeitsfunktion wurde in Abhängigkeit von der eingestrahnten Lichtintensität  $I_0$  das Lichtmodell nach Lambert – Beer, Reynolds – Pacala sowie das modifizierte Modell von Reynolds – Pacala zur Berechnung herangezogen.

Im Kinetik-Block des Simulink-Modells wurden zu jedem Zeitpunkt die Wachstumsraten für die einzelnen Radiussegmente bestimmt und anschließend integral gemittelt. Die Integration der Wachstumsrate ergab die Biomassekonzentration zum Zeitpunkt  $t$ . Durch die Variation der kinetischen Parameter wurden die simulierten Daten den experimentellen Messergebnissen angepasst.

### **4.7.5 Parameterbestimmung**

Zur Parameteridentifikation dienten die Ergebnisse von vier Kultivierungen. Dabei wurden lediglich die experimentellen Daten nach den ersten 96 h mit  $36 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  verwendet. Zur Validierung wurden die Daten einer Kultivierung mit konstantem Lichtprofil über die gesamte Kultivierungsdauer sowie zwei Kultivierungen mit optimiertem Lichtprofil verwendet. Für jedes Lichtprofil wurde das experimentell ermittelte Wachstum mit den Simulationsergebnissen des empirischen Modells von Aiba (1982) verglichen.

### **4.7.6 Modellgestützte Kultivierung**

Für die modellgestützte Kultivierung von *Synechococcus* PCC7942 wurde ein optimiertes Lichtprofil eingesetzt. Die Optimierung des Lichtprofils erfolgte mittels eines genetischen Algorithmus. Als Zielfunktion diente die Maximierung der Biomassekonzentration nach 168 h Kultivierungszeit. Hierzu wurde ein Lichtintensitätsvektor  $IN=[IN_1, \dots, IN_{10}]$ , mit 10 Segmenten von 24 h Dauer definiert. Jeder Parameter  $IN_i$  in diesem Vektor beschreibt eine konstante Lichtintensität für jedes Zeitsegment  $[t_0 \leq t_1, t_1 \leq t_2, \dots, t_9 \leq t_{10}]$ , mit  $t_i$  als Startsegment und  $t_{i+1}$  als Schlusssegment. Der genetische Algorithmus wurde mit 50 Individuen über 50 Generationen mit einer Selektionswahrscheinlichkeit von 0,8, einer *cross-over*-Wahrscheinlichkeit von 0,6 und einer Mutationswahrscheinlichkeit von 0,02 initialisiert.

Die verwendeten Parameter sind in den Tabellen 5.7 zusammengefasst.

## 4.8 Physiologische Messungen

### 4.8.1 Photometrische Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate

Die Anthron-Methode dient der Bestimmung des Gesamtgehalts an Kohlenhydraten, d.h. Mono-, Oligo- und Polysaccharide, in ganzen Zellen (Kapitel 12.3.3) (Lange und Vejdelök, 1987). Die Kohlenhydrate reagieren beim Erhitzen mit Schwefelsäure unter Wasserentzug zu Furfuralderivaten, die mit Anthron bei 620 nm absorbierende, chromogene Kondensationsprodukte bilden (Pons *et al.*, 1981). Die Absorptionen der Proben wurden mit einer 12-Punkt-Eichgerade mit Konzentrationen von 0,01 g L<sup>-1</sup> und 2 g L<sup>-1</sup> Glukose korreliert.

### 4.8.2 Photometrische Bestimmung der Membranintegrität

Der Anteil lebender zu toter Zellen in einer Kultur wurde mit Hilfe des LIVE/DEAD BacLight<sup>®</sup> Lebensfähigkeitstests (Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt. Dieses Analyseverfahren nutzt zwei DNA-markierende Fluoreszenzfarbstoffe, die Bakterien mit intakter und beschädigter Zellmembran verschieden markieren. Propidiumiodid (20 mM in DMSO) kann Bakterienmembranen nicht durchdringen und färbt daher nur Zellen mit beschädigter Zellmembran rot an. Für den Farbstoff SYTO 9<sup>®</sup> (3,34 mM in DMSO) stellt die Bakterienmembran kein Hindernis dar. Er färbt deshalb alle Zellen grün. In Zellen mit defekten Membranen konkurrieren die beiden Farbstoffe um Bindungsplätze.

Für den Nachweis wurde die zu untersuchende Zellsuspension auf eine OD von 0,05 mit BG-11-Medium (Tabelle 12.15) verdünnt und 100 µL der Probe in die Vertiefung einer Flachboden-Mikrotiterplatte gegeben. Je 3 µL der beiden Farbstoffe wurde in 1 mL VE-H<sub>2</sub>O miteinander gemischt. Nach Zugabe von 100 µL Farbstofflösung wurde die Platte für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Anregung bei einer Wellenlänge von 485 nm wurde die Fluoreszenz der Proben bei 520 nm (Verstärkungswert 28) und 620 nm (Verstärkungswert 56) im Fluoreszenzphotometer gemessen. Das Verhältnis der beiden Lichtintensitäten diente als Merkmal für die Membranintegrität. Die Kalibrierung erfolgte mit Mischungen aus 100 %, 60 %, 40 % und 0 % Anteil lebender Zellen und toter Zellen, die in 70 % (v/v) Isopropanol innerhalb einer Stunde abgetötet wurden.

Als lebende Zellen für die Kalibrierung wurden Zellen aus einer Blasensäulen-Kultur verwendet, die nach einer Kultivierungszeit von 96 h bei einer eingestrahnten Lichtintensität von 91,8 µE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> auf eine OD<sub>730</sub> von 0,05 mit BG-11-Medium verdünnt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Diese Zellen wurden bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

### 4.8.3 Teilungsfähigkeit

Die Teilungsfähigkeit von Zellen wurde durch Wachstum einer Zellprobe in 1 mL Reaktoren nachgewiesen. Mit BG-11-Medium (1 mL) befüllte 1 mL Reaktoren wurden mit 20 µL Zellprobe versetzt und für 7 Tage kultiviert.

### 4.9 Medienoptimierung

Das Ziel einer Medienoptimierung ist die Bestimmung von Extrema einer oder mehrerer Zielfunktionen (z.B. Biomasse, Ausbeute, Selektivität, etc.) über die Veränderung einer Medienzusammensetzung. Um bei einer Medienoptimierung den experimentellen Aufwand gering zu halten, werden hierzu fast ausschließlich Satzverfahren eingesetzt.

Der häufig verwendete Ansatz eine Medienkomponente zu variieren, während alle anderen konstant gehalten werden (*one-at-a-time*-Experimente), berücksichtigt keine Interaktionen zwischen den Medienkomponenten. Er ist daher aufgrund des hohen experimentellen Aufwands bei oftmals nur geringer Effizienz abzulehnen. Methoden, die mehrere Medienkomponenten simultan variieren, um mehrere Ziele zu optimieren, sind bei gleichzeitiger Verringerung des experimentellen Aufwands vorzuziehen (Weuster-Botz, 1999).

In dieser Arbeit wurden 13 Medienkomponenten hinsichtlich Biomasse und Umsatz mit Genetischen Algorithmen (GAs) optimiert.

GAs sind stochastische Methoden, die auf der Evolutionsstrategie basieren und seit Rechenberg (1973) und Holland (1975) kontinuierlich in ihrer Effizienz verfeinert wurden. Sie haben sich als äußerst geeignet erwiesen, mehrere miteinander in Konflikt stehender Variablen zu optimieren sowie in sehr großen, komplexen Suchräumen gute Optima zu finden. Besonders bemerkenswert ist ihre Robustheit, die selbst bei komplexen Messungen noch eine Optimierung erlaubt (Zitzler *et al.*, 2004).

Bei auf der Evolutionsstrategie basierenden Suchverfahren werden die Suchvariablen (z.B. Salzkonzentrationen einer Medienzusammensetzung) als Allele in Form eines definierten „*string*“ codiert, der als digitales Chromosom angesehen werden kann.

Prinzipien der Variation wie *cross-over*, Mutation und Selektion verändern die Zusammensetzung des codierten *string*. Die entsprechend gebildeten Phänotypen werden als Individuen einer Population betrachtet und werden über die Zuordnung einer Fitness (Fortpflanzungswahrscheinlichkeit) bewertet.

Werden mehrere Zielgrößen simultan optimiert, gibt es meistens keine einzelnen sondern eine Menge alternativer Lösungen, die so genannten *Pareto*-optimalen Lösungen. Letztere können in keiner Zielfunktion verbessert werden ohne eine weitere Zielfunktion zu verschlechtern.

Für die Medienoptimierung in dieser Arbeit wurden zwei Programme verwendet. Das Programm GALOP basierte auf dem *Vector Evaluated Gentic Algorithm* (VEGA). Eine zweite Software, basierte auf dem *Strength Pareto Evolutionary Algorithm* (SPEA) (für Details siehe Kapitel 4.9.3 und 4.9.4) (Zietzler, 1999). Der Prozess der Medienoptimierung verlief für den VEGA und SPEA gleich. Beide Programme gaben die Medienzusammensetzung vor. Die Medien der ersten Generationen wurden zufällig generiert. Alle weiteren Generationen basierten auf den Ergebnissen der vorherigen Generation.

Aufgrund vorangegangener *one-at-a-time*-Experimente wurde der Suchraum für die einzelnen Medienkomponenten ausgehend von der Konzentration des BG-11-Medium auf die zehnfache Konzentration bzw. Verdünnung beschränkt (Tabelle 12.15).

Medien wurden im 10 mL Maßstab hergestellt und anschließend autoklaviert. Um der Bildung von Präzipitaten entgegenzuwirken, wurden die heißen Medien nach dem Autoklavivorgang unter Schütteln abgekühlt. Nach dem Befüllen und Animpfen der 1 mL Reaktoren mit unterschiedlichen Medien und gleicher Biomasse erfolgte die Kultivierung. Nach 72 h wurden 200  $\mu\text{L}$  zur OD-Bestimmung abgenommen. Das Volumen der Medienentnahme und die Verdunstung wurden mit dem jeweiligen Medium ausgeglichen und die Biotransformation durchgeführt.

#### **4.9.1 Kultivierung**

Als Inokkulum dienten Zellen aus einer Blasensäule, die nach  $168\text{ h}^{-1}$  geerntet wurden. Diese Blasensäule wurde nach der Ernte mit frischem Medium auf eine  $\text{OD}_{730}$  von 0,0013 aufgefüllt. Die Zellen wurden steril absedimentiert ( $8000\text{ Xg}$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 10 min) und in 25 %igem BG-11-Medium suspendiert. Jeder 1 mL Reaktor wurde anschließend mit 1 mL des entsprechenden Mediums befüllt und mit  $0,06\text{ g}_{\text{BTM}}\text{ L}^{-1}$  Zellsuspension versetzt. Zur Kontrolle des Prozesses wurden drei inokkulierte Reaktoren mit BG-11-Medium verwendet. Die Kultivierung erfolgte für 72 h bei  $20^\circ\text{C}$ ,  $42\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  und  $600\text{ min}^{-1}$  im Kühlinkubator.

#### **4.9.2 Biotransformation in der Medienoptimierung**

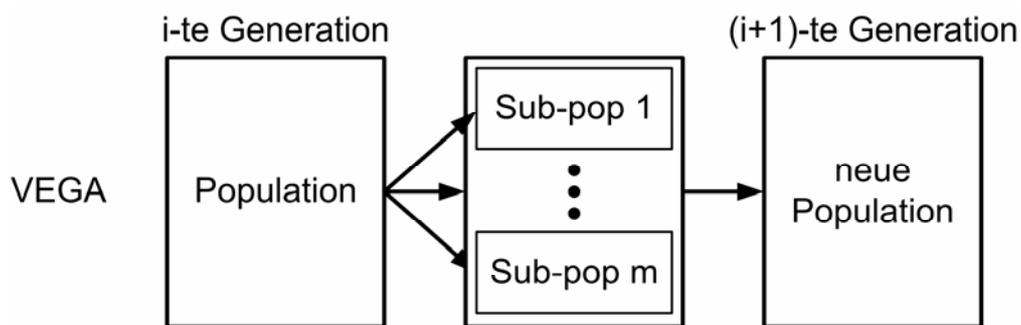
Der Biotransformationsansatz enthielt  $10\text{ g L}^{-1}$  Glukose und  $1,4\text{ mM}$  PFAP. Da PFAP stark hydrophob und flüchtig ist, wurden die 1 mL-Reaktoren mit gasdichten Deckel versehen und

das Keton über ein Septum im Deckel injiziert. Der Reaktionsansatz inkubierte bei 20°C und  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  für 21 h. Der 1 mL-Reaktor als Ganzes wurde gemäß Kapitel 4.11 extrahiert und gaschromatographisch analysiert.

#### 4.9.3 Optimierungsparameter VEGA

Das Programm GALOP ist ein Programm zur Medienoptimierung basierend auf dem VEGA. Es wurde am Institut für Biotechnologie am Forschungszentrum Jülich entwickelt.

Der erste implementierte genetische Algorithmus war der VEGA, der von Schaffer (1985) vorgeschlagen wurde. Der VEGA führt die Selektion für jedes Ziel getrennt durch. Er sucht aus der aktuellen Population Individuen über ihre Fitness gewichtet zufällig für eines von 1-m Zielen in eine Subpopulation aus (Tamaki *et al.*, 1996). Das Prinzip ist in Abbildung 4.8 dargestellt.



**Abbildung 4.8:** Schematische Darstellung der Arbeitsweise von VEGA nach Tamaki *et al.* (1996)

Alle Subpopulationen sind gleich groß und in einem Paarungspool zusammengefasst. Die *strings* der Individuen in diesem Pool werden zufällig gepaart und *cross-over* sowie Mutationen eingefügt. Die aus diesen rekombinierten *strings* hervorgehenden Individuen stellen die Folgegeneration dar, die erneut obigen Zyklus durchläuft.

GALOP wurde mit 40 Medienzusammensetzungen (Individuen) initialisiert. Variiert wurden 13 Komponenten von 0-700  $\mu\text{L}$  in 7 $\mu\text{L}$  Schritten (*round resolution*). Die beiden Zielfunktionen BTM und Umsatz entsprachen den Fitnessfunktionen und wurden gleich gewichtet. *Scaling Window of Generation* wurde auf 0 und der „*Fitness Multiple Factor*“ auf 1,1 gesetzt. Als Auswahlmethode der Individuen wurde „*keep best, ball bearing*“ gewählt. Eine Zusammenfassung der Konfiguration und der Einstellungsparameter kann Tabelle 4.5 entnommen werden.

#### 4.9.4 Optimierungparameter SPEA

Der SPEA verwendet das Prinzip der Dominanz, zur Bestimmung der Werte für die Fitness. Dominanz eines Individuums bedeutet, dass kein anderes Individuum in allen Zielfunktionen zugleich besser ist. Das Maß an Dominanz für ein Individuum definiert sich über die Anzahl an Individuen, die im Ergebnisraum bessere Ergebnisse in allen Zielfunktionen zeigen. Dominante Individuen werden von der aktuellen Population in eine externe Population überführt und dienen dort als ein Archiv für effiziente Lösungen. Wird die externe Population zu groß, wird sie über *cluster*-Analyse verkleinert. Dabei werden nah beieinander liegende Ergebnisse zusammengefasst. Das Verfahren zur Bestimmung der Dominanz, *cluster*-Analyse und Fortpflanzung wird von Zitzler *et al.* (1999) im Detail beschrieben. Die Konfiguration und Einstellungsparameter sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

**Tabelle 4.5:** Konfiguration und Parameter des VEGA und SPEA

Parameter	VEGA	SPEA
Populationsgröße	40	20
Generationen	8	8
Experimente	320	160
Länge des binären <i>strings</i>	91	91
<i>Cross-over</i> -Methode	<i>single point</i>	<i>single point</i>
<i>Cross-over</i> -Wahrscheinlichkeit	0,95	1
Mutationswahrscheinlichkeit	0,01	0,01

Der SPEA wurde mit 20 Individuen initiiert. Analog zu GALOP wurden die 13 Komponenten im Bereich von 0-700  $\mu\text{L}$  in 7  $\mu\text{L}$  Schritten variiert. Die beiden Zielfunktionen BTM und OD wurden gleich gewichtet.

#### 4.10 Durchführung der Biotransformation

##### 4.10.1 Biotransformation im gasdichten Analysesystem

Die Biotransformationen wurden im 0,5-1 mL Maßstab in gasdicht verschlossenen 1 mL Reaktoren im Satzverfahren durchgeführt. 1 mL Kulturen wurden gasdicht mit einem Deckel im Reaktor verschlossen und mittels Injektion durch ein Septum im Deckel mit PFAP (1,4 mM) versehen. Die Inkubation erfolgte auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei  $600 \text{ min}^{-1}$  bei  $20^\circ\text{C}$ , wahlweise bei 42 oder  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  für 24 h. Die Extraktion des Reaktionsansatzes

erfolgte durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  Extraktionsmittel im verschlossenen 1 mL-Reaktor gemäß Kapitel 4.11.1.

### **4.10.2 Biotransformation in 100 mL gasdichten Reaktoren**

Die Biotransformationen im 100 mL gasdichten Erlenmeyerkolben wurden mit einem Arbeitsvolumen von 50 mL im Satzverfahren durchgeführt. Die eingesetzten Zellen wurden aus 20 L Kulturen über eine kontinuierliche Zentrifuge (9000 Xg, 20°C) aufkonzentriert oder als lyophilisierte Zellen eingewogen. In den Reaktionsansätzen wurden die Glukosekonzentration (0 oder 10 g L<sup>-1</sup>) und die Lichtintensität (0 oder 102  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) variiert. Als Kontrolle dienten Reaktoren ohne Substrat bei der jeweiligen Bedingung. Für die Biotransformation wurden, wenn nicht anders angegeben, 10 mM PFAP eingesetzt. Nach Zugabe aller Reaktionskomponenten wurden die Reaktoren gasdicht verschlossen und nach den ersten 30 min in 60 min Intervallen Proben genommen.

Die verwendeten Kolben waren mit zwei Stützen ausgestattet, die mit einer pH-Elektrode und einer Kanüle für Probenentnahmen besetzt wurden. Die Reaktoren wurden mit Magnetrührern (200 min<sup>-1</sup>) auf einem Mehrfachrührplatz betrieben. In den bis zu 8 parallelen Reaktoren wurde der pH über ein Datenlogger System der Firma DASGIP mit dem Programm FedBatchPro (Version 1.5) aufgenommen. Versuche mit Lichteintrag wurden im Kühlkubator durchgeführt und die Reaktoren zur pH-Messung jeweils zur pH-Messstation transferiert. Bei jeder Probenentnahme wurden 1,5 mL mit Spritzen über die Probenentnahme-Kanüle submers isoliert. Die Spritzen schlossen über die gesamte Versuchszeit die Kanüle gasdicht ab.

### **4.10.3 Kinetische Untersuchung der Ganzzellbiotransformation**

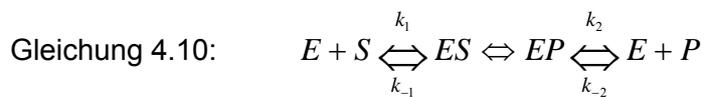
Die kinetische Untersuchung der Biotransformation wurde in parallelen 1 mL Ansätzen im Satzverfahren mit einer Biomasse von 0,67 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> gemäß Kapitel 4.10.1 durchgeführt. Es wurden Substratkonzentrationen zwischen 0,2 – 20 mM PFAP eingesetzt. Aufgrund der maximalen Löslichkeit von 2,8 mM PFAP in BG-11-Medium wurden Konzentrationen unter 2,8 mM in 20 mL BG-11-Medium vorgelöst. Nach 3, 19, 23,5 und 26,5 h wurde von jeder Konzentrationsstufe ein Reaktor gemäß 4.11.1 und 4.11.2 extrahiert und gaschromatographisch analysiert.

Die Produktbildungsrate kann im Satzverfahren durch die Steigung der Produktkonzentrationen innerhalb eines Zeitintervalls beschrieben werden.

Gleichung 4.9: 
$$v = \frac{dP}{dt}$$

Mit  $v$  Produktbildungsrate,  $\text{min}^{-1}$   
 $P$  Produktkonzentration, mM

Die Daten wurden nach der Methode der Anfangsgeschwindigkeiten ausgewertet. Es wurde eine Reaktion gemäß Gleichung 4.10 mit einem Enzym und einem Substrat ohne Rückreaktion sowie ohne Stofftransportlimitation im Fließgleichgewicht angenommen.



Mit  $\frac{dc_{ES}}{dt} = 0$  ;  $k_{-2} = 0$  und  $c_P \sim 0$

$E$  Enzym  
 $S$  Substrat  
 $ES$  Enzym-Substrat-Komplex  
 $P$  Produkt

Es wurde eine Michaelis Menten Kinetik (Michaelis und Menten, 1913) angenommen:

Gleichung 4.11: 
$$v = v_{\max} \cdot \frac{c_E}{c_E + K_m}$$

Mit  $v_{\max}$  Maximale Produktbildungsrate,  $\text{min}^{-1}$   
 $c_E$  Konzentration an Edukt, mM  
 $K_m$  Halbsättigungskonstante, mM

Die Ermittlung der Werte für  $v_{\max}$  und  $K_m$  erfolgte über nichtlineare Regression unter Verwendung des Nealder-Mead Simplex Verfahrens (Lagarias *et al.*, 1998).

#### **4.10.4 Biotransformationen mit ionischen Flüssigkeiten in 2 mL Reaktoren**

Als Reaktionsgefäße für Biotransformationen mit ionischen Flüssigkeiten dienten gerührte zylindrische Glasgefäße mit 4 mL Nominalvolumen und einem Arbeitsvolumen von 1,4 mL.

Diese Reaktoren wurden nach dem Befüllen mit einem gasdichten Deckel versehen. Als Rührorgan kamen über eine Mehrfachrührplatte angetriebene Kreuzmagnetstäbchen zum Einsatz. In den Reaktoren wurden die ionischen Flüssigkeiten mit gelöstem Edukt vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe der Zellsuspension mit gelöstem Kosubstrat ( $10 \text{ g L}^{-1}$  Glukose) gestartet. Die Konzentrationen des Edukts, bezogen auf die wässrige Phase, waren in allen Reaktoren gleich. Zur Dispersion der ionischen Flüssigkeit wurde der Reaktionsansatz in den ersten 5 min bei  $900 \text{ min}^{-1}$  und anschließend bei  $200 \text{ min}^{-1}$  gerührt. Die Umsetzung fand bei Raumtemperatur im Lösungsmittelabzug bei  $0 \text{ } \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  statt.

Nach 5 h, 24 h und 48 h Umsetzung wurden  $10 \text{ } \mu\text{L}$  zur Analyse der Membranintegrität entnommen. Nach 24 h wurden  $0,5 \text{ mL}$  der Oberphase entnommen und extrahiert (Kapitel 4.11.1). Die verwendeten ionischen Flüssigkeiten sind in (Tabelle 12.14) zusammengefasst.

### **4.11 Gaschromatographische Analytik von Edukten und Produkten**

Die Analyse der Edukte und Produkte von Biotransformationen wurde mit Hilfe des Gaschromatographen CP-3800 durchgeführt (Tabelle 12.5). Dieser wurde mit verschiedenen Trennsäulen ausgerüstet. Das Trennverfahren und die zugehörigen Trennsäulen variierten für die verschiedenen Substanzen. Die Quantifizierung erfolgte über Kalibrierstandards und Acetophenon als internen Standard.

#### **4.11.1 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie**

Die Proben für die Gaschromatographie wurden mit  $-20^\circ\text{C}$  kaltem Ethylacetat mit  $36 \text{ mM}$  Acetophenon in einer Schwingmühle ( $1800 \text{ min}^{-1}$ , 10 min) extrahiert. Die enzymatischen Reaktionen kamen durch die niedrige Temperatur zum Stillstand und die Enzyme wurden durch das Lösungsmittel inaktiviert.

Die Proben von den  $1 \text{ mL}$  Reaktoren oder dem *in-vitro*-Ketonreduktionssystem wurden im jeweiligen Reaktor in einem Phasenverhältnis von 2:1 der wässrigen Phase zur Ethylacetatphase extrahiert. Es konnten bis zu 12 Reaktoren parallel in der Schwingmühle ( $1800 \text{ min}^{-1}$ , 10 min) extrahiert werden. Eine Klärung der lösungsmittelhaltigen Oberphase konnte erreicht werden, indem die Proben eingefroren und während des Auftauens sedimentiert ( $4800 \text{ Xg}$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 30 min) wurden.

Das Zellmaterial der Proben aus den Versuchen mit ionischen Flüssigkeiten und gasdichten  $100 \text{ mL}$  gerührten Kolben wurde in  $1,5 \text{ mL}$  Reaktionsgefäßen mittels Sedimentation ( $57000 \text{ Xg}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5min) entfernt. Der zellfreie Überstand wurde anschließend in einem Phasenverhältnis von 1:1 der wässrigen Phase zur Ethylacetatphase in  $2 \text{ mL}$

Reaktionsgefäßen extrahiert. Eine Phasentrennung erfolgte durch Sedimentation (57000 Xg, 4°C, 10 min).

Da auf die Trennsäule kein Wasser aufgebracht werden durfte, wurden 100 µL der erhaltenen Extrakte in 400 µL K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> getrocknetem Ethylacetat verdünnt. Die Proben wurden bis zur Vermessung bei –20°C in gasdicht verschlossenen 1 mL Probefläschchen gelagert.

#### **4.11.2 Chirale GC Analytik von PFAP und PFE**

2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon (PFAP) und 1-(2'-3'-4'-5'-6'-Pentafluorphenyl)-ethanol (PFE) wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Probeninjektion:	5 µL; Split 40
Säulenströmung:	5,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	80°C für t=0 min; mit 1°C min <sup>-1</sup> auf 100°C für 2 min; mit 15°C min <sup>-1</sup> auf 150°C für 2 min
Retentionszeiten:	AP: 14,1 min; PFAP: 13,23 min; (R)-PFE: 22,91 min; (S)-PFE: 23,27 min

#### **4.11.3 Achirale GC Analytik von PFAP und PFE**

Trennsäule:	CP-Sil 8 CB-MS
Probeninjektion:	5 µL; Split 40
Säulenströmung:	5,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	80°C für t=0 min; mit 1°C min <sup>-1</sup> auf 100°C für 2 min; mit 15°C min <sup>-1</sup> auf 150°C für 2 min
Retentionszeiten:	AP: 14,1 min; PFAP: 13,23 min; (R)-PFE: 22,91 min; (S)-PFE: 23,27 min

### **4.11.4 Chirale GC Analytik von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE**

4-Chloracetophenon (4-Cl-AP) und 1-(4-Chlorphenyl)-ethanol (4-Cl-PE) wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Probeninjektion:	5 µL; Split 40
Säulenströmung:	9,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	75°C für t=0 min; mit 2,5°C min <sup>-1</sup> auf 150°C für 1 min
Retentionszeiten:	AP: 9,74 min; 4-Cl-AP: 20,75 min; (R)-4-Cl-PE: 25,98 min; (S)-4-Cl-PE: 26,33 min

### **4.11.5 Chirale GC Analytik von EBA und HPPE**

Ethylbenzoylacetat (EBA) und 3-Hydroxy-3-phenylpropionat (HPPE) wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	Lipodex E
Probeninjektion:	5 µL; Split 50
Säulenströmung:	3,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	110°C für 30 min; mit 15°C min <sup>-1</sup> auf 200°C für 15 min
Retentionszeiten:	AP: 3,04 min; EBA: 31,09 min; (R)-HPPE: 32,49 min; (S)-HPPE: 32,63 min

### **4.11.6 Chirale GC Analytik von 4-Cl-ACE und CHBE**

Ethyl-4-chloracetoacetat (4-Cl-ACE) und Ethyl-4-chlor-3-hydroxybutyrat (CHBE) wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	Lipodex E
Probeninjektion:	5 µL; Split 50
Säulenströmung:	5,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	110°C für 15 min
Retentionszeiten:	AP: 2,14 min; 4-Cl-ACE: 3,68 min; (R)-CHBE: 4,91 min; (S)-CHBE: 5,22 min

## **4.12 SDS-PAGE**

Zur Analyse von Proteinproben wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Proteine können mit dieser Methode in einem Acrylamidpolymer-

Maschenwerk in Form von färbaren Proteinbanden proportional zu ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Cooper, 1981) (Anhang 12.1.2).

#### 4.12.1 Coomassie Färbung

Zur Färbung von Proteinbanden in Acrylamidgelen wurde der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau, ein Triphenylmethanfarbstoff, gemäß einem modifizierten Protokoll nach Fairbanks *et al.* (1971) eingesetzt (Tabelle 4.6). Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 50-100 ng Protein.

Nach vollendeter Auftrennung wurden die Gele nacheinander in den 3 Färbelösungen aufgekocht und 5 min lang geschwenkt. Beim letzten Schwenken in Lösung C wurde ein Stück handelsüblichen Küchenpapiers mit in die Färbeschale gelegt. Dieses nahm überschüssige Farbe auf.

**Tabelle 4.6** Färbelösungen nach Fairbanks *et al.* (1971)

Lösung A:	25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,5 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R250
Lösung B:	10 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure, 0,005 % (w/v) Coomassie Brillant BlauR250
Lösung C:	10 % (v/v) Essigsäure; 0,005 (w/v) Coomassie Brillantblau R250

#### 4.12.2 Silberfärbung

Silberfärbung nach Heukeshofen und Dernik (1988) diente dem Nachweis von Proteinmengen im Bereich von bis zu 10 ng.

Zum Fixieren wurden die Acrylamidgele 20 min in Silberfixierlösung 1 und anschließend mindestens 30 min in Silberfixierlösung 2 geschwenkt. Es folgten drei zehninütige Waschschrte mit VE-H<sub>2</sub>O und 30 min Schwenken in einer Silberfärbelösung. Bei der Entwicklung wurden ca. 40 mL an Entwicklerlösung über die Gele geschichtet. Der letzte Schritt beendete die Entwicklung mit Stopplösung.

**Tabelle 4.7** Färbelösungen für Silberfärbungen

---

Silberfixierlösung 1	0 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Silberfixierlösung 2	0,4 M Natriumacetat, 0,5 % Essigsäure, 30 % Ethanol, pH 6; Jeweils frisch hinzugefügt: 0,1 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> und 2 mL Glutaraldehyd
Färbelösung	6 mg L <sup>-1</sup> AgNO <sub>3</sub> und 25 µL Formaldehyd in 100 mL VE-H <sub>2</sub> O
Entwicklerlösung	7,5 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> und 120 µL Formaldehyd in 300 mL VE-H <sub>2</sub> O
Stopplösung	50 mM EDTA, pH 7,5

---

### 4.13 Zellaufschluss

Die Zellen für den Zellaufschluss wurden in einer definierten Menge 50 mM MES Puffer (pH 6,5) oder Proteinpuffer (Tabell 12.17) resuspendiert (95 mg<sub>Feuchtgewicht</sub> mL<sup>-1</sup>). Es erfolgte die Zugabe von Hühnereiweiß-Lysozym (0,5 g L<sup>-1</sup>) und eine Inkubation (60 min<sup>-1</sup>, 30°C, 2 h) in einem Schüttelkolben. So vorbehandelte Zellen dienten als Ausgangsmaterial für den Zellaufschluss.

#### 4.13.1 French Press

Der Aufschluss der Zellsuspension erfolgte in einer *french press* (Basic Z, Constant Systems, Warkick, UK). Die Zellen wurden in einem vorgekühlten Zylinder (8°C) eingesaugt und dort mit einem Druck von 2,1 kbar aufgebrochen.

#### 4.13.2 Schwingmühle

Zum Aufschluss von Zellen in einer Schwingmühle standen zwei Geräte mit unterschiedlichem Fassungsvermögen zur Verfügung. Die Zellen wurden durch Scherkräfte zwischen Glasperlen einer Partikelgröße von 0,01-0,04 mm aufgebrochen.

Für analytische Aufschlüsse im 1 mL Maßstab wurde eine Schwingmühle mit einem Adapter für bis zu zehn 1,5-2,2 mL Reaktionsgefäße verwendet. Zu 750 µL Glasperlen wurden 400 µL Zellsuspension hinzugefügt und bei 1800 min<sup>-1</sup> für 3 min aufgeschlossen.

Für präparative Volumina stand eine kühlbare Zelmühle (4°C) mit Einsätzen für bis zu 250 mL zur Verfügung. Die Zellsuspension wurde in spezielle Behälter mit 80 % Glasperlen beschickt und mit unterschiedlichen Intervallen aufgeschlossen.

### 4.13.3 Ultraschall

Der Aufschluss von Zellen im Ultraschall erfolgte mittels einer Sonotrode bei 10-40 kHz. Die mit Lysozym ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) vorbehandelte Zellsuspension wurde bei 57 % Power für 40 Sekunden auf Eis aufgeschlossen. Nach einer Abtrennung der Membranfragmente durch Sedimentation ( $17000 \text{ Xg}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 30 min) wurde der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

### 4.14 Präparative FPLC

Zur präparativen Trennung von Proteinen standen zwei automatisierte FPLC-Systeme zur Verfügung (Tabellen 12.2 und 12.4; Abbildung 4.9). Grundsätzlich wurde mit gefilterten ( $0,2 \mu\text{m}$  Filter) und entgasten Puffern bei  $4^\circ\text{C}$  im Kühlraum gearbeitet. Die Proteingemische wurden über Probenschleifen (12-70 mL) in den Laufmittelstrom eingebracht und in Säulen aufgetrennt. Vor jedem Probenauftrag wurden die Proteinproben zur Entfernung von Aggregaten sedimentiert ( $47808 \text{ Xg}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 30 min). Die Detektion von Proteinen erfolgte über UV-Absorptionsmessungen bei 206 nm bzw. 280 nm oder über Tryptophan-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und Emissionswellenlänge von 330 nm. Das Eluat wurde mittels eines Fraktionskollektors gesammelt.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Chromatographieverfahren und Säulen vorgestellt.



Abbildung 4.9: FPLC-Apparatur

#### 4.14.1 Ionenaustauschchromatographie

Es wurde eine schwache Anionentauschersäule DEAE52 (Servacell DEAE 52, Serva, Heidelberg) mit einem Volumen von 65 mL (Tabelle 12.3) bei  $4^\circ\text{C}$  verwendet.

Bei hohen Ionenstärken in der Proteinprobe wurde sie in einem Dialyseschlauch mit MWCO 12-14 kDa gegen Proteinpuffer (Tabelle 12.17) dialysiert. Die Elution erfolgte mittels eines Gradienten von 0-3 M NaCl bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL min<sup>-1</sup> (Tabelle 12.3).

### 4.14.2 Gelfiltration

Zur Aufreinigung der Proteinprobe wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 200 Säule (Amersham, Uppsala) mit einer Gradi-Frac Einheit (Tabelle 12.4) verwendet. Diese Säule besitzt einen Trennbereich zwischen 10 – 600 kDa und wurde mit einem Gelfiltrationspuffer (Tabelle 12.19) betrieben. Die Säule wurde mit einem Säulenvolumen equilibriert.

Die Proben wurden für die Auftrennung auf eine Pufferkonzentration von 100 mM Tris (pH8) eingestellt. Mit einer Flussrate von 2 mL min<sup>-1</sup> wurden die Proteine aufgetrennt. Fraktionen mit Oxidoreduktase-Aktivität wurden zusammengeführt.

### 4.15 Klonierung der FNR

Für eine lösliche heterologe Expression der FNR von *Synechococcus* PCC7942 in *E. coli* wurde der Vektor pet21a (Novagen, Madison, USA) mit einem T7 Promotor gewählt. Voraussetzung für die erfolgreiche Expression war somit ein Wirtstamm mit einer DE3-Kassette. Die Sequenz der FNR (*petH*; GeneID: 3199383 Locus tag: *syc0566\_c*; Protein Accession Nr.: YP\_171276) wurde einer Restriktionsanalyse für eine Ligation in pet21a unterzogen und die Schnittstellen *Nde I* und *EcoRI* als geeignet befunden.

Die Isolation von genomischer DNA aus Cyanobakterien erfolgte nach einem Protokoll von Wu *et al.* (2000) aus 50 mL Cyanobakterienkultur (Anhang 12.2.1). Die Amplifikation von *petH* aus der genomischen DNA erfolgte über PCR (Tabelle 4.7) mit einer Taq-Polymerase (GenScritp, Piscataway, USA) (Anhang 12.2.2).

**Tabelle 4.7:** PCR-Primer

Syn_for3	GGGGATCCATATGTTGAATGCGAGTGTGGCTG
Syn_back2	AGAGATCGAATTCCTAGTAGGTTTCTGGTAGTCAGACCAAACAGAGATCGAATTC

Die erhaltenen PCR-Fragmente (1,25 kbp) wurden mit dem QuiaQuick PCR Purification Kit<sup>®</sup> (Quiagen, Hilden) aufgereinigt. Der Vektor und die Insert-DNA wurden mit den beiden

Restriktionsenzymen in getrennten Reaktionsansätzen geschnitten. Anschließend wurde die Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Beide Reaktionsansätze wurden mit dem QuiaQuick PCR Purification Kit<sup>®</sup> aufgereinigt. Die Ligation erfolgte bei 4°C für 8 h im Kühlschrank (Anhang 12.2.4).

Die Ligationsprodukte wurden anschließend mittels DNA-Aufnahme über Hitzeschock in *E. coli* XL-Gold ultrakompetente Zellen transformiert. Plasmidtragende Kolonien wurden mittels Ausplattieren auf Ampicillin-Agarplatten selektiert und Klone mit *insert* über Restriktionsverdau (wie PCR-Fragment in Kapitel 12.2.3) und anschließender Agarosegelelektrophorese (Kapitel 12.2.7) identifiziert.

Die Expression von *petH* erfolgte in frisch transformierten *E. coli* BL21 (DE3) und JM109 (DE3) Zellen und wurde sowohl mittels SDS-Page (Kapitel 4.12) als auch über die Ketonreduktion (Kapitel 4.10.1) und über die Diaphoraseaktivität (Kapitel 4.2.10) verfolgt.

#### **4.16 Proteinfingerprint**

Die Identifikation der Oxidoreduktase erfolgte mittels eines Proteinfingerprints. Hierbei wurde eine aufgereinigte Proteinprobe mittels SDS-PAGE (Kapitel 4.12) aufgetrennt und die zu analysierende Proteinbande nach einer Coomassie-Mischfärbung ausgestanzt.

Die Probe wurde anschließend tryptisch verdaut und die Peptidfragmente im Massenspektrometer analysiert. Das erhaltene Peptid-Muster konnte über die Proteindatenbanken NCBI und Swiss-Prot mit den dort gespeicherten Proteinsequenzen verglichen und das entsprechende Enzym identifiziert werden. Die Übereinstimmung von mindestens 7 Fragmenten lieferte ein eindeutiges Ergebnis.

##### **4.16.1 Probenvorbereitung**

Um eine möglichst hohe Proteinkonzentration bzw. -detektion zu gewährleisten, wurde die entsprechende Proteinprobe über eine Natriumdesoxycholat-(Nadoc)-Trichloressigsäure (TCA)-Fällung aufkonzentriert (Tabelle 4.8). Das Pellet wurde in 50 µL Roti-load<sup>®</sup> aufgenommen.

**Tabelle 4.8** Nadoc-TCA-Fällung

Lösung	Volumen
Proteinlösung	1,5 mL
10 % (w/v) Nadoc	1,5 µL
Auf Vortex gemischt, anschließend 20 min auf Eis inkubiert	
50 % (v/v) TCA	200 µL
30 min auf Eis inkubiert, anschließend sedimentiert (16000 Xg, 45 min, 4°C) und Pellet getrocknet	
¼ Roti-load-Puffer® (verdünnt mit VE-H <sub>2</sub> O)	50 µL

Nach der Auftrennung und Färbung wurde die zu analysierende Proteinprobe mit einer abgeschnittenen sterilen 1 mL Pipettenspitze aus dem Gel ausgestanzt und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Analyse wurde die Probe mit  $12 \cdot 10^{-9} \text{ g L}^{-1}$  Trypsin versetzt, für 12 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  verdaut und im Massenspektroskop Ultraflex I MALDI-TOF/TOF (Brucker Daltronics, Bremen, Deutschland) nach Schäfer *et al.* (2001) aufgetrennt. Die Analyse des Peptidmusters erfolgte über das Softwarepaket „BioTools software packages Brucker Daltronics coupled with Mascot“ (Matrix Science, London, UK).

#### 4.16.2 Trennparameter der SDS-PAGE

Ein gut polymerisiertes Acrylamidgel (65 µL APS und 3,3 µL TEMED) wurde für 10 min bei 25 mA laufen gelassen, um störendes TEMED zu entfernen. Anschließend wurde die Proteinprobe auf das Gel aufgetragen und bei 25 mA für 1 h 30 min aufgetrennt.

#### 4.16.3 Coomassie-Mischfärbung

Eine Coomassie-Mischfärbung (Tabelle 12.7) färbt eine Proteinbande in einem Acrylamid aufgrund seines hohen Anteils an Coomassie G250 durch Anlagerung des Farbstoffes von außen an das Protein. Im Gegensatz dazu färbt Coomassie R 250 durch Einlagerung in die Polypeptidkette. Dies verringert deutlich das Rauschen des Messsignales in der Massenspektroskopie.

#### 4.17 In-silico-Sequenzanalyse

Die *in-silico*-Analyse der ermittelten Proteinsequenz wurde mit den in Tabelle 4.10 zusammengefassten Programmen durchgeführt.

**Tabelle 4.10:** Software für die *in-silico*-Analyse

Programm	Institution	Quelle
ExPASy ProtParam-Tool	ExPASy ( <b>Expert Protein Analysis System</b> ) proteomics server des <i>Schweizer Instituts für Bioinformatik (SIB)</i> (URL: <a href="http://www.expasy.org/tools/protparam">http://www.expasy.org/tools/protparam</a> )	Gasteiger <i>et al.</i> , 2003
HMMTOP Version 2.0 <i>Programm zur Vorhersage von Transmembran-helices und Topologie von Proteinen</i>	<i>Institut für Enzymologie der Hungarian Academy of Sciences</i> (URL: <a href="http://www.enzim.hu/hmmtop/">tp://www.enzim.hu/hmmtop/</a> )	Tusnády and Simon, 1998; Tusnády and Simon, 2001
SOSUI Programm zur <i>Vorhersage von Transmembranhelices und Topologie von Proteinen</i>	<i>Mitaku Group</i> <i>Department of Biotechnology Tokyo University of Agriculture and Technology</i> (URL: <a href="http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/">http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/</a> )	Mitaku <i>et al.</i> , 2002; Mitaku und Hirokawa, 1999; Hirokawa <i>et al.</i> , 1998
ProtScale Programm zur <i>Vorhersage der Hydrophathie einer Aminosäuresequenz</i>	ExPASy proteomics server des <i>Schweizer Instituts für Bioinformatik (SIB)</i> (URL: <a href="http://www.expasy.org/tools/protscale">http://www.expasy.org/tools/protscale</a> )	Kyte und Doolittle, 1982
BLAST	ExPASy proteomics server des <i>Schweizer Instituts für Bioinformatik (SIB)</i> (URL: <a href="http://www.expasy.org/tools/blast/">http://www.expasy.org/tools/blast/</a> )	Gasteiger <i>et al.</i> , 2003
BRENDA	<i>Bioinformatik Zentrum Universität zu Köln (CUBIC)</i> (URL: <a href="http://www.brenda.uni-koeln.de/index.php4">http://www.brenda.uni-koeln.de/index.php4</a> )	Schomburg <i>et al.</i> , 2004

## **5 Prozessentwicklung zur Herstellung von *Synechococcus* PCC7942**

Als Referenz zur Prozessentwicklung diente eine Publikation von Nakamura *et al.*, (2000), in welcher die Reduktion von 5,7 mM des Ketons 2'-3'-4'-5'-6'-Pentafluoracetophenon mit einem Enantiomerenüberschuss von > 99 % bei 90 % Ausbeute mit dem Cyanobakterium *Synechococcus* PCC7942 im Schüttelkolben beschrieben wird.

Ziel der im Folgenden beschriebenen Versuche war es, basierend auf den Erkenntnissen von Nakamura *et al.*, (2000) einen geeigneten Prozess zu entwickeln, um Cyanobakterien als Biokatalysatoren mit einer hohen Raum-Zeit-Ausbeute herzustellen. Darüber hinaus sollte die gewonnene Biomasse als Ausgangsmaterial für die Identifikation der ketonreduzierenden Oxidoreduktase dienen.

### **5.1 Untersuchungen zu den primären Anzuchtbedingungen**

In der Publikation von Nakamura *et al.* (2000) wird die Kultivierung von *Synechococcus* PCC7942 bei 20 °C in 300 mL Erlenmeyerkolben mit einem Arbeitsvolumen von 100 mL BG-11-Medium (Tabelle 12.15) bei 1000 lux Beleuchtung mit Leuchtstoffröhren dargestellt. Nach einer Kultivierungsdauer von 336 h wurde die Biotransformation eingeleitet.

Da genauere Angaben zu den primären Anzuchtbedingungen und der verwendeten Lichtquelle fehlten, mussten im ersten Schritt der Prozessentwicklung grundlegende Parameter mit Einfluss auf die Anzuchtbedingungen für *Synechococcus* PCC7942 identifiziert werden.

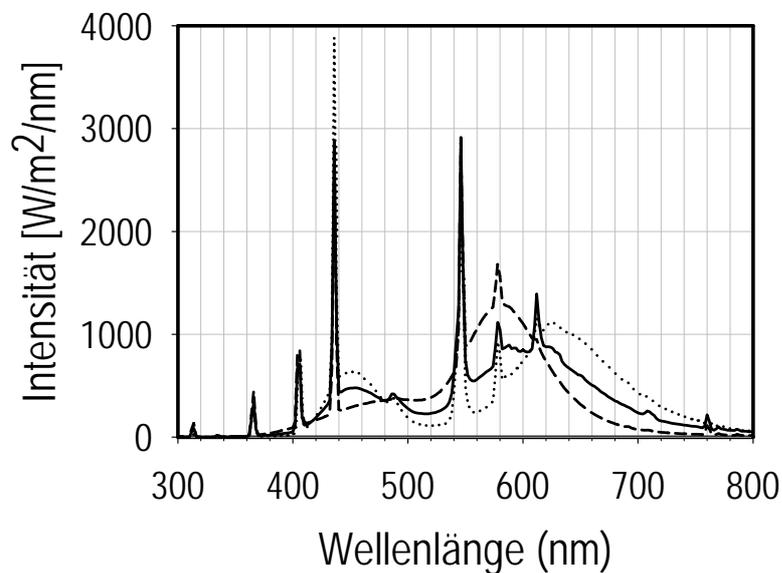
#### **5.1.1 Parameterstudie zur Kultivierung von *Synechococcus* PCC7942**

Zur Kultivierung photoautotropher Organismen musste eine geeignete reproduzierbare Beleuchtungsquelle identifiziert werden. Die Lichtquelle sollte am Tageslichtspektrum angelehnt sein, um Freilandversuche im Labor zu simulieren. Anschließend war eine sinnvolle Dauerkulturform zu bestimmen, um eine Zellbank für weitergehende Untersuchungen bereitzustellen.

#### **Geeignetes Lichtspektrum zur Kultivierung von Cyanobakterien**

Das Tageslichtspektrum zeichnet sich dadurch aus, dass zwischen Wellenlängen von 300 nm bis 800 nm weitgehend alle Lichtquanten in annähernd gleicher Quantendichte vorkommen. Herkömmliche Leuchtstoffröhren emittieren Licht, das aus wenigen distinkten

Wellenlängen einer hohen Quantendichte besteht. Die Lichtanlage für die Kultivierung photoautotropher Organismen konnte daher nur aus Leuchtstoffröhren mit einem Tageslicht-imitierenden Spektrum und einer ausreichenden Lichtintensität ( $> 5 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) bestehen. Ermittlungen anhand von Herstellerdaten ergaben, dass keine Tageslichtleuchtstoffröhre zugleich Intensitätsmaxima bei 540 und 640 nm entsprechend dem Aktionsspektrum von Cyanobakterien aufweist. Es war daher notwendig, zwei Röhren miteinander zu kombinieren. Als geeignete Lichtquellen wurden die Leuchtstoffröhren „SunGlo“ und „Fluora L77“ identifiziert. Ihre einzelnen Spektren, das mathematisch summierte sowie das gemessene kombinierte Lichtspektrum beider Röhren, sind in Abbildung 5.1 dargestellt.



**Abbildung 5.1:** Spektrum der eingesetzten Tageslichtleuchtstoffröhren. „SunGlo“ (-----); „Fluora L77“ (.....); Kombiniertes Spektrum beider Röhren (——).

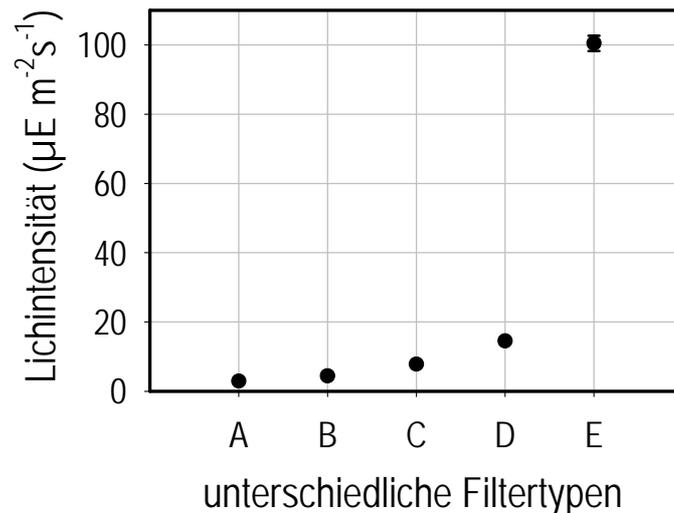
Die Tageslicht-Leuchtstoffröhre „SunGlo“ zeigt eine Emissionsspitze bei 436 nm und ein Maximum mit weiten Schenkeln bei 578 nm. Eine hohe Intensität bei 640 nm war nicht gegeben. Die gemessene Lichtintensität lag bei  $14,24 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (1205 lux).

Die Pflanzenleuchtstoffröhre „Fluora L77“ besitzt sowohl zwei breit angelegte Maxima bei 450 nm und 624 nm, als auch zwei stark ausgeprägte Intensitäts-Spitzen bei 436 nm und 546 nm. Das Spektrum entsprach nicht dem Tageslicht, da Lichtquanten der Wellenlängen von 476 nm bis 574 nm weitgehend fehlten. Die gemessene Lichtintensität lag bei  $17 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (736 lux).

Das kombinierte Spektrum zeigte einen weitgehend kontinuierlichen Verlauf mit zwei Maxima mit breiten Schenkeln bei 54 nm und 612 nm auf. Die Lichtintensität von  $32 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  entsprach der 6-fachen Intensität, die zur Kultivierung gefordert war.

### **Reproduzierbare Lichtverhältnisse**

Die Verwendung zweier unterschiedlicher Röhren zur Beleuchtung ergab eine asymmetrische Lichtquelle. Streulicht durch Reflexionen an den Wänden des Inkubators trug zusätzlich zu einer inhomogenen Lichtverteilung bei. Daher wurden die gerührten Kolben vertikal unter der Lichtquelle angeordnet und Streulichtbarrieren mit Lochblenden (Anhang 12.1.3) entwickelt. So wurde eine reproduzierbare Beleuchtung mit variabel einstellbarer Lichtintensität an mehreren parallelen Kultivierungspositionen ermöglicht (Abbildung 5.2).



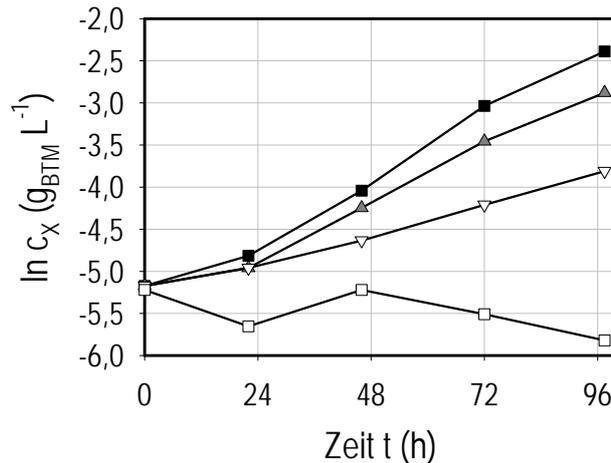
**Abbildung 5.2:** Vergleich der Lichtintensitäten an allen 6 Kultivierungspositionen mit unterschiedlichen Lochblenden.

Die Intensitätsmessungen an allen sechs Positionen im Kultivierungssystem für gerührte Kolben zeigten bei unterschiedlichen Intensitätsfiltern gleiche Werte. Die durchschnittliche Standardabweichung vom Mittelwert lag unter 3 %.

### **5.1.2 Reaktivierungsverfahren von Festkulturzellen**

Herkömmlich werden zur Konservierung von Mikroorganismen Kulturen mit Glycerin als Frostschutzmittel versetzt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im Gegensatz zu heterotrophen sowie chemoautotrophen Organismen können von den meisten photoautotrophen Organismen keine Glycerinkulturen hergestellt werden. Es boten sich folglich nur Dauerkulturformen auf Festmedien oder in Form von Cryokulturen an. Beide Kulturformen sollten in ihrer Eignung miteinander verglichen werden.

Kulturen unterschiedlicher Erntezeitpunkte aus Blasensäulen (siehe 4.5.2) wurden aufkonzentriert und mit einer definierten optischen Dichte eingefroren. Das Wachstumsverhalten in Blasensäulen der reaktivierten Cryokulturen wird in Abbildung 5.3 wiedergegeben.



**Abbildung 5.3:** Verlauf der Biomassekonzentration  $c_X$  von reaktivierten Cryokulturen unterschiedlicher Erntezeitpunkte in Blasensäulen. Erntezeit der Blasensäule zur Herstellung der Cryokultur nach 48 h (□); 96 h (▽); 144 h (△) und 240 h (■). Die Kultivierung erfolgte bei  $88,2 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

Nach einer anfänglichen Adaptions-Phase von 24 h wurde bis 96,5 h ein konstantes exponentielles Wachstum beobachtet. Wachstumsraten von  $\mu_{240\text{h}}=0,033 \text{ h}^{-1}$ ,  $\mu_{144\text{h}}=0,028 \text{ h}^{-1}$  und  $\mu_{96\text{h}}=0,015 \text{ h}^{-1}$  konnten ermittelt werden. Cryokulturen mit einer Erntezeit bei 48 h zeigten kein Wachstum.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden Zellen aus Impfösenabstrichen von Festmedien und Zellen aus Cryokulturen im Satzverfahren in gerührten Kolben kultiviert, um eine geeignete reproduzierbare Dauerkulturform zu bestimmen.

Zellen von Festmedien zeigten eine um 48 h längere *lag*-Phase als Zellen aus Cryokulturen, erzielten jedoch nach 336 h mit  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  50 % mehr Biomasse aufgrund eines deutlich stärkeren linearen Zuwachses der Biomasse. Des Weiteren konnte bei Zellen von Cryokulturen eine Photoinaktivierung bei  $102 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  festgestellt werden, die bei Zellen von Festmedien nicht auftrat (Daten nicht gezeigt).

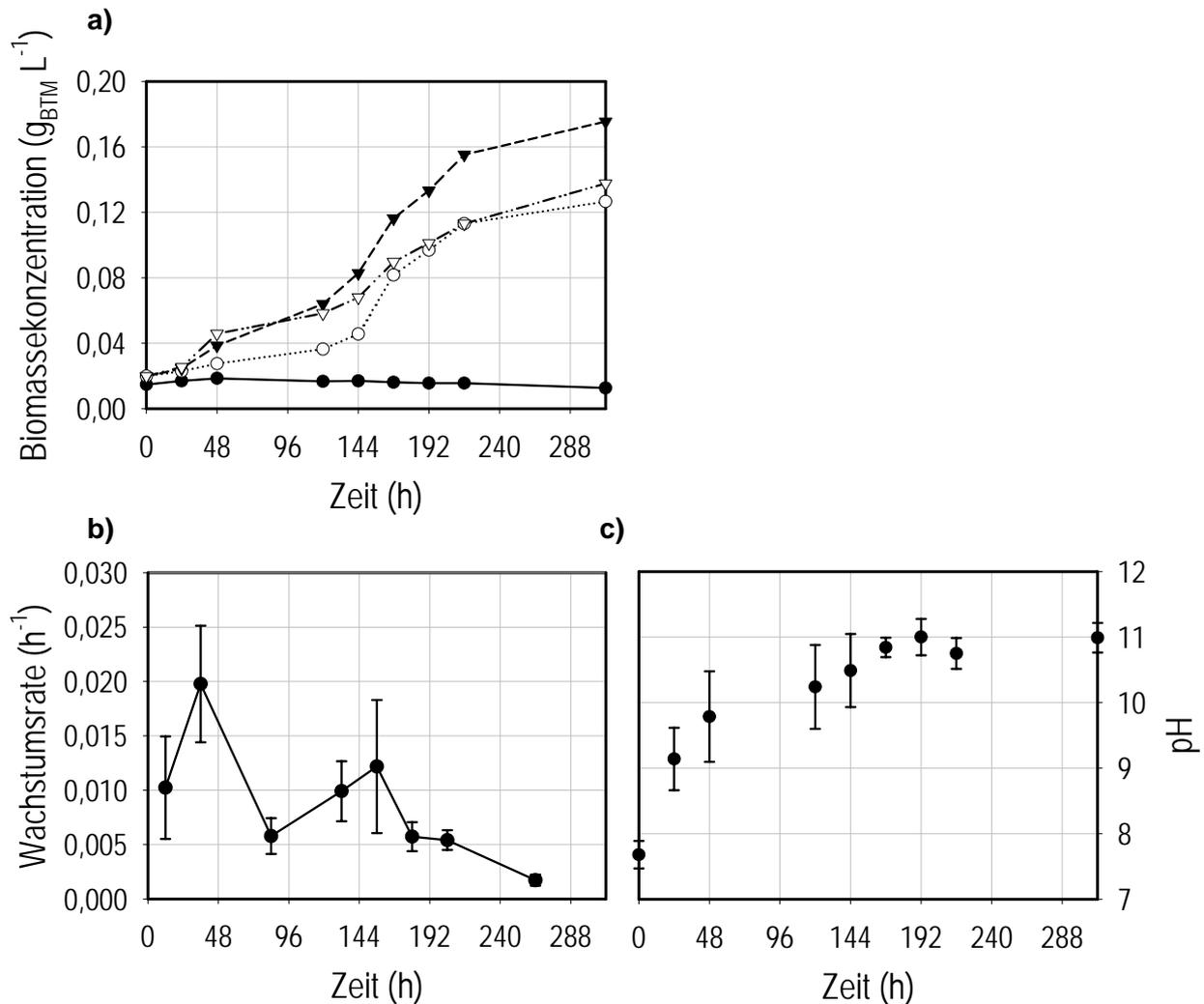
Weiterführende Untersuchungen in Blasensäulen ergaben eine Verringerung der maximalen Wachstumsrate um den Faktor 5, wenn die Vorkultur aus Cryokulturen angezogen wurde (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der verringerten Wachstumsrate von Cryokulturen wurden Festmedienkulturen als Dauerkulturform für reproduzierbare Kultivierungen verwendet. Cryokulturen dienten ausschließlich der Konservierung von Stämmen.

### 5.1.3 Anzucht in gerührten Kolben

*Synechococcus* PCC7942 wurde in 250 mL gerührten Kolben im Satzverfahren mit einem Arbeitsvolumen von 100 mL BG-11-Medium bei konstanten Lichtintensitäten kultiviert. Den Verlauf der optischen Dichte über die Kultivierungsdauer zeigt Abbildung 5.4a.

Ab einem Schwellenwert von  $21 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  konnte ein Wachstum von *Synechococcus* PCC7942 beobachtet werden. Nach 312 h wurde eine maximale Biomasse von  $0,18 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  bei  $66 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  erreicht.



**Abbildung 5.4:** Parallele Kultivierung in Rührkolben im Satzverfahren bei konstanten Lichtintensitäten. **a)** Verlauf der Biomassekonzentration bei  $15 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (●),  $21 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (○),  $66 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (▼),  $96 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (▽). **b)** Mittlere Wachstumsraten und **c)** mittlere pH-Verläufe aller Kultivierungen zwischen  $21$  und  $102 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

Nach einer Wachstumsphase von 48 h gingen alle Kulturen unabhängig von der eingestrahelten Lichtintensität in ein lichtlimitiertes Wachstum über (Abbildung 5.4b).

Die maximale Wachstumsrate betrug  $0,025 \text{ h}^{-1}$  bei  $96 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  nach 36 h. Der durchschnittliche pH stieg innerhalb der ersten 48 h um zwei Einheiten von 7,5 auf pH 9,8 und pendelte sich für annähernd alle Kulturen bis 144 h auf pH 11 ein (Abbildung 5.4c).

#### **5.1.4 Diskussion**

Ein Beleuchtungssystem mit artifiziellem Sonnenlicht ermöglicht die Kultivierung von *Synechococcus* PCC7942 unter tageslichtähnlichen Bedingungen. Das Tageslicht lässt sich formal in einen Rot-, Grün- und Blau-Anteil aufteilen, die einzeln betrachtet einen Einfluss auf Längenwachstum, Glykogen- und Pigmenteinlagerung aufweisen. Eine Einschränkung auf einen Wellenlängenabschnitt hätte physiologische und morphologische Veränderungen zur Folge. Der hohe Rot-Anteil bedingt ein stärkeres Wachstum und eine erhöhte Einlagerung von Glykogengranula (Albertano, 1991). Dieser positive Nebeneffekt erzeugt beste Voraussetzungen für eine Biokatalyse bei hohen Zelldichten. Die Energieerhaltung der Zellen kann somit im Dunkeln aufrechterhalten werden.

Es ist bekannt, dass *Synechococcus* PCC7942 bei Lagerung unter dem Gefrierpunkt innerhalb der ersten zwei Wochen einen kontinuierlichen Abfall der Photosyntheseaktivität zeigt (Roullion *et al.*, 1999). Eine Langzeitschädigung in Form einer verringerten maximalen Wachstumsrate wurde jedoch bislang nicht beschrieben. Cryokulturen kommen daher als Animpfgut für reproduzierbare Kultivierungen von Cyanobakterien nicht in Frage.

Der Kultivierungsanleitung der Stammsammlung folgend, sollen Cyanobakterien bei  $5 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in 20 mL sanft geschüttelten Kulturen gezüchtet werden. Der beobachtete, deutlich höhere Schwellenwert von  $21 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  für eine erfolgreiche Kultivierung in gerührten Kolben ist vermutlich auf die Kultivierungsbedingungen in einem gerührten System mit dem fünffachen Kulturvolumen zurückzuführen.

Der ständige Wechsel der Lichtintensität durch die schnellen Beschleunigungen der Zellen zur Reaktorwand und zurück in die Kernflüssigkeit führt vor allem in Kulturen mit steigender optischer Dichte zu hohen Amplituden des Lichteintrags. Der erzeugte Zellstress äußert sich im ständigen Umbau der Photosynthesezentren und der damit verbundenen Lichtantennen (Kruse, 2001). Dies erklärt die besseren Zellausbeuten bei mittleren Lichtintensitäten wie  $66 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in einem dichteren Kulturstadium.

Zellen werden in Photobioreaktoren gegenüber ihrem natürlichen Habitat bei einer bis zu  $10^8$  Zellen  $\text{L}^{-1}$  höheren Konzentration kultiviert und erleben dabei 100-1000 fach stärkere Geschwindigkeiten. Die Zellen sind somit einen kontinuierlichen, mechanischen Stress auf die Zellwände ausgesetzt (Tredici, 1999). Geringe Zelldichten, wie sie in der Natur

angetroffen werden, sind jedoch für eine hohe Produktivität unzureichend (Borowitzka und Borowitzka, 1988; Grobbelaar, 2000).

Die beobachtete Alkalisierung des Mediums ist auf eine  $\text{CO}_2$ -Zehrung zurückzuführen (Romo, 1994). Das Wachstum bei hohem pH ist bei Cyanobakterien weit verbreitet und wird durch ihr hoch effizientes Kohlenstoff-Aufnahmesystem ermöglicht (Ogawa und Kaplan, 2003). Bei hohen pH-Werten liegt anorganischer Kohlenstoff hauptsächlich als  $\text{HCO}_3^-$  im Medium vor, das mit annähernd gleicher Effizienz in die Zelle transportiert wird wie  $\text{CO}_2$ . Das limitierte Wachstum ist wahrscheinlich eine Manifestation von Licht- und Kohlenstofflimitation in dichten Kulturen.

Obwohl einige Arten des Picoplankton bereits bei  $130 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  photoinhibiert werden (Pulz, 2001), wurde für *Synechococcus* PCC6301 eine Inhibitionsschwelle bei einer mittleren Lichtintensität von  $200 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  errechnet (Suh und Lee, 2001). Die gemessenen maximalen Wachstumsraten zu Beginn der Kultivierung bei Lichtintensitäten zwischen 81 und  $102 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  bestätigen, dass *Synechococcus* PCC7942 keine Lichtinhibierung erfährt. Die gemessenen Wachstumsraten zwischen  $0,026 \text{ h}^{-1}$  und  $0,033 \text{ h}^{-1}$  stehen im Einklang zu den berichteten Wachstumsraten bei  $30^\circ\text{C}$  von  $0,032 \text{ h}^{-1}$  (Scanlan *et al.*, 1995). Die Kürze der beobachteten exponentiellen Phasen ist nicht überraschend, da durch Selbstverschattungen Lichtlimitationen auftreten. Häufig geht die Zunahme der Biomasse in einen typischen linearen Zuwachs über (Tredici, 1999).

Da bei Zellen von Festmedien keine Photoinaktivierung beobachtet werden konnte, ist ein maximaler Lichteintrag mit  $102 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  die beste Lösung für eine Vorkultur in gerührten Kolben.

## 5.2 Reaktionstechnische Untersuchungen zur Anzucht in Blasensäulen

Ziel der reaktionstechnischen Untersuchungen war die Entwicklung einer modellgestützten Kultivierung für *Synechococcus* PCC7942 im 250 mL Maßstab. Dabei sollten Lichtlimitationen und Inhibierungseffekte aufgedeckt werden und die gewonnenen Erkenntnisse der Modellentwicklung im 20 L-Maßstab dienen.

### 5.2.1 Geeignete Lichtversorgung

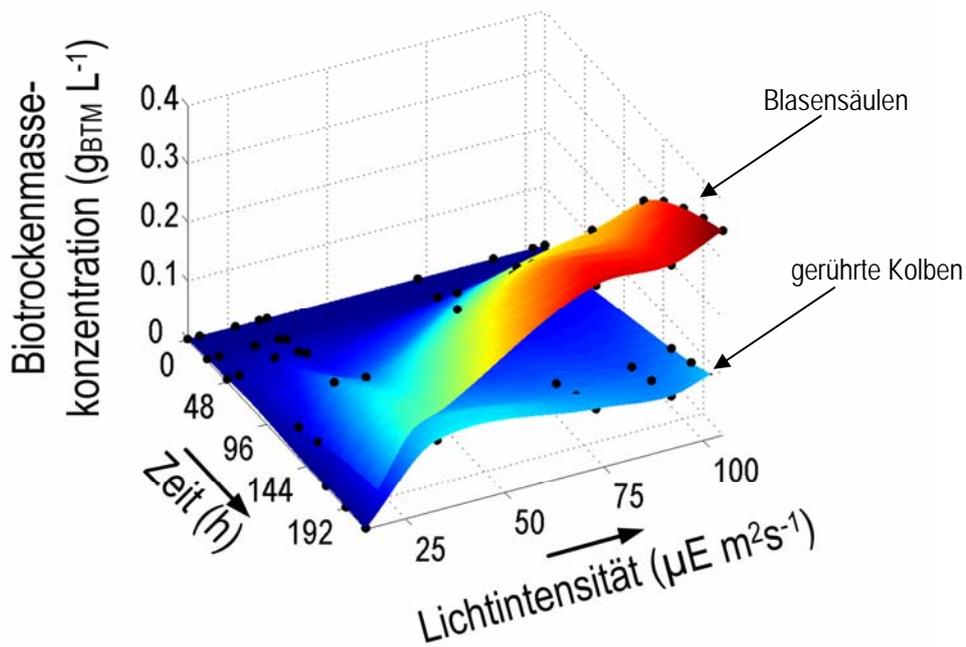
Zur reproduzierbaren Kultivierung von Cyanobakterien musste das vorhandene System aus parallelen 250 mL-Blasensäulen umstrukturiert werden. Als Lichtquelle wurde die in Kapitel 5.1.1 beschriebene Röhrenkombination verwendet. Die Lichtanlage wurde gemäß Kapitel 4.5.2 installiert und mit Streulichtabdeckungen versehen. Aufgrund der hohen

Wärmeentwicklung durch die Leuchtstoffröhren war es überdies notwendig ein Kühlsystem einzubauen (Abbildung 4.3).

Lichtmessungen im Raum zeigten, dass trotz Streulichtzylindern eine inhomogene Ausleuchtung der Reaktorpositionen vorlag (Daten nicht gezeigt). Für eine reproduzierbare Ausleuchtung wurden daher Lochblenden eingesetzt, um definierte Lichtintensitäten in den verwendeten Blasensäulen zu gewährleisten.

### 5.2.2 Wachstumskinetische Untersuchungen in 250 mL Blasensäulen

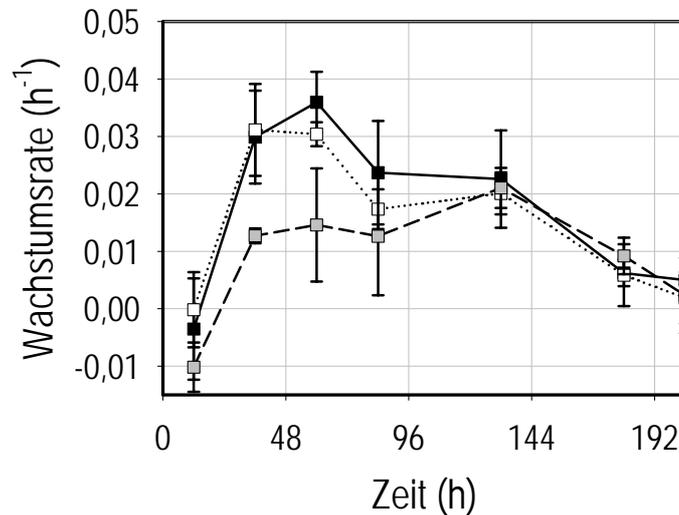
Die Kultivierungen in 250 mL Blasensäulen wiesen gegenüber denjenigen in gerührten Kolben eine 66 % höhere Biomassekonzentration bei einer 37 % schnelleren maximalen Wachstumsrate von  $0,042 \text{ h}^{-1}$  auf (Abbildung 5.5). Eine Biomassekonzentration von  $0,33 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  wurde bei einer Lichtintensität von  $105 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  nach 192 h erreicht. Der pH wurde über die gesamte Kultivierungszeit über die Gaszusammensetzung bei 7,5 konstant gehalten.



**Abbildung 5.5:** Verlauf der optischen Dichte von *Synechococcus* PCC7942 in Blasensäulen und gerührten Kolben.

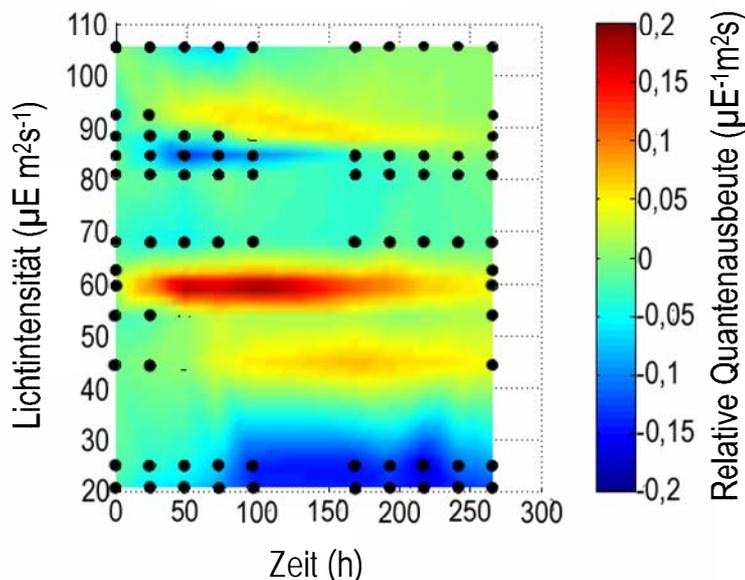
Innerhalb der ersten 60 h der Kultivierung kam es in allen Kulturen unabhängig von der Lichtintensität zu einem Anstieg der Wachstumsrate. Anschließend nahm diese stetig ab (Abbildung 5.6). Nach 132 h Kultivierungszeit zeigten alle Kulturen unabhängig vom Lichteintrag im Mittelwert gleich sinkende Wachstumsraten.

Unter Einbeziehung der Standardabweichung befinden sich die Wachstumsraten bei Lichtintensitäten  $> 60 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in der gleichen Größenordnungen. Lichtintensitäten unterhalb  $60 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  führen zu verringerten Wachstumsraten innerhalb der ersten 132 h Kultivierungszeit.



**Abbildung 5.6:** Wachstumsraten von *Synechococcus* PCC7942 in Blasensäulen. Mittlere Wachstumsrate zwischen  $20\text{-}54 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (■), zwischen  $60\text{-}80 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (□), zwischen  $84\text{-}105 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (■). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

Die relative Quantenausbeute (nach Gleichung 4.5) als Maß für den Einfluss der Lichtintensitäten auf die Bildung von Biomasse zeigte nach 24 h besonders bei Intensitätswerten von  $45, 60$  und  $90 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  verschiedene Maxima (Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7:** Relative Quantenausbeuten der Blasensäulenkultivierungen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden veränderliche Lichtprofile erstellt (Abbildung 5.7 und Abbildung 4.6). Die Lichtprofile starteten von der maximalen Lichtintensität bei  $105 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  bzw.  $93 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  und senkten sich über 50 h auf die Bereiche mit hoher relativer Quantenausbeute bei 90, 60, und  $45 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ab. Bei letztgenanntem Profil wurden  $45 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  unterschritten und die Lichtintensität bis auf  $20 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  abgesenkt, um auch den Intensitätsbereich abzudecken, der vom Pasteur Institut für eine Kultivierung vorgeschlagen wird. Die Ergebnisse der Kultivierungen wurden zur Validierung der entwickelten Modelle verwendet.

### 5.2.3 Entwicklung eines Absorptionsmodells

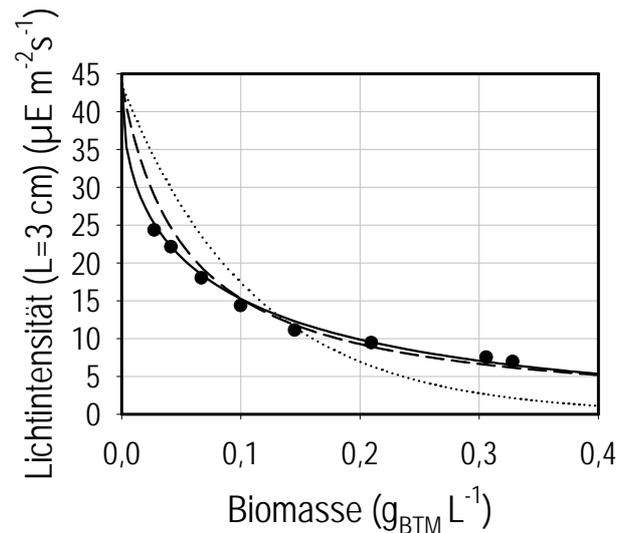
Grundlage für die Modellentwicklung in 250 mL Blasensäulen war die Aufklärung der vorherrschenden Lichtbedingungen in den Reaktoren. Drei geeignete Modelle für die Beschreibung der Lichtverhältnisse in einem Photobioreaktor waren das Lambert-Beer'sche Gesetz, eine modifizierte Version des Lambert-Beer'schen Gesetzes und das Absorptionsmodell nach Reynolds und Pacala (Kapitel 4.6.2).

Die Bestimmung des Absorptionskoeffizienten erfolgte anhand von Absorptionssmessungen bei einem Lichtweg von 3 cm. Der Mittelwert der Absorptionskoeffizienten (Tabelle 5.1) wurde zur Simulation der Lichtverhältnisse in Abhängigkeit der vorliegenden Biomasse gewählt (Abbildung 5.8).

Die genaueste Wiedergabe der tatsächlichen Lichtverhältnisse ermöglichte das modifizierte Lambert-Beer'sche Gesetz. Eine ähnlich gute Übereinstimmung erreichte das Absorptionsmodell nach Reynolds und Pacala bei Biomassen  $> 0,1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ . Das Lambert-Beer'sche Gesetz lag bei Biomassen  $< 0,15 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  über und bei Biomassen  $> 0,15 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  unterhalb der gemessenen Werte.

**Tabelle 5.1:** Mittelwerte der ermittelten Absorptionskoeffizienten

Absorptionskoeffizient	Modell
$3,68 \text{ L cm}^{-1} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$	Lambert und Beer
$7,42 \text{ L cm}^{-1} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$	Reynolds und Pacala
$1,33 \text{ L cm}^{-1} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$	Lambert und Beer modifiziert



**Abbildung 5.8:** Vergleich der Absorptionsmodelle unter Verwendung statistisch gemittelter Absorptionskoeffizienten mit Messdaten. Lichtintensität berechnet nach Lambert und Beer (.....), Reynold und Pacala (— —); Lambert und Beer modifiziert (—). Messwerte bei unterschiedlichen Biomassekonzentrationen (●) bei einem Lichtweg von  $L = 3 \text{ cm}$  ( $\cong \frac{1}{2} \varnothing$  der Blasensäule).

#### 5.2.4 Modellentwicklung für 250 mL Blasensäulen

Zur Modellierung des Wachstums von *Synechococcus* PCC7942 in Blasensäulen wurden die Parameter eines empirischen (Aiba, 1992) und eines nicht segregierten, strukturierten Wachstumsmodells (Eilers und Peeters, 1988) angepasst. Aufgrund der besten Wachstumsraten in gerührten Kolben bei mittleren Lichtintensitäten von  $66 \mu E m^{-2} s^{-1}$  musste angenommen werden, dass zu hohe oder zu niedrige Lichtintensitäten Zellstress verursachen (siehe Kapitel 5.1.4).

Das Modell von Aiba (Gleichung 4.6) berücksichtigte als einziges empirisches Modell die Lichtlimitierung und -inhibierung. Die Tabellen 5.2 und 5.3 stellen die identifizierten Modellparameter dar.

**Tabelle 5.2:** Parameter für das Modell nach Aiba (1992)

$\mu_{\max}$	4,86 ( $h^{-1}$ )
$K_S$	8302,78 ( $\mu E m^{-2} s^{-1}$ )
$K_i$	1,61 ( $\mu E m^{-2} s^{-1}$ )
$\tau$	2,44 (h)

**Tabelle 5.3:** Parameter für das Modell von Eilers und Peeters (1988)

k	0,40 (-)
$\gamma$	29,80 ( $\text{h}^{-1}$ )
m	0,009 ( $\text{h}^{-1}$ )

Aufgrund fehlender Kenntnis über die Parameterbereiche zu Beginn der mathematischen Anpassung des Modells ist besonders für  $K_i$  ein Wert ermittelt worden, der mit einem sehr großen Fehler behaftet ist. Aufgrund der Kultivierungsdaten bislang ist anzunehmen, dass  $K_i$  vernachlässigbar ist, da keine inhibierenden Phänomene beobachtet wurden. Daher ist der ermittelte Wert für  $c_{I,opt} = 110 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  nach Gleichung 3.7, bei der die größtmögliche Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{opt}$  gilt, nicht sinnvoll und im besten Fall als Richtwert zu betrachten und konnte in den folgenden Simulationen ignoriert werden, da 110 PAR nie überschritten werden.

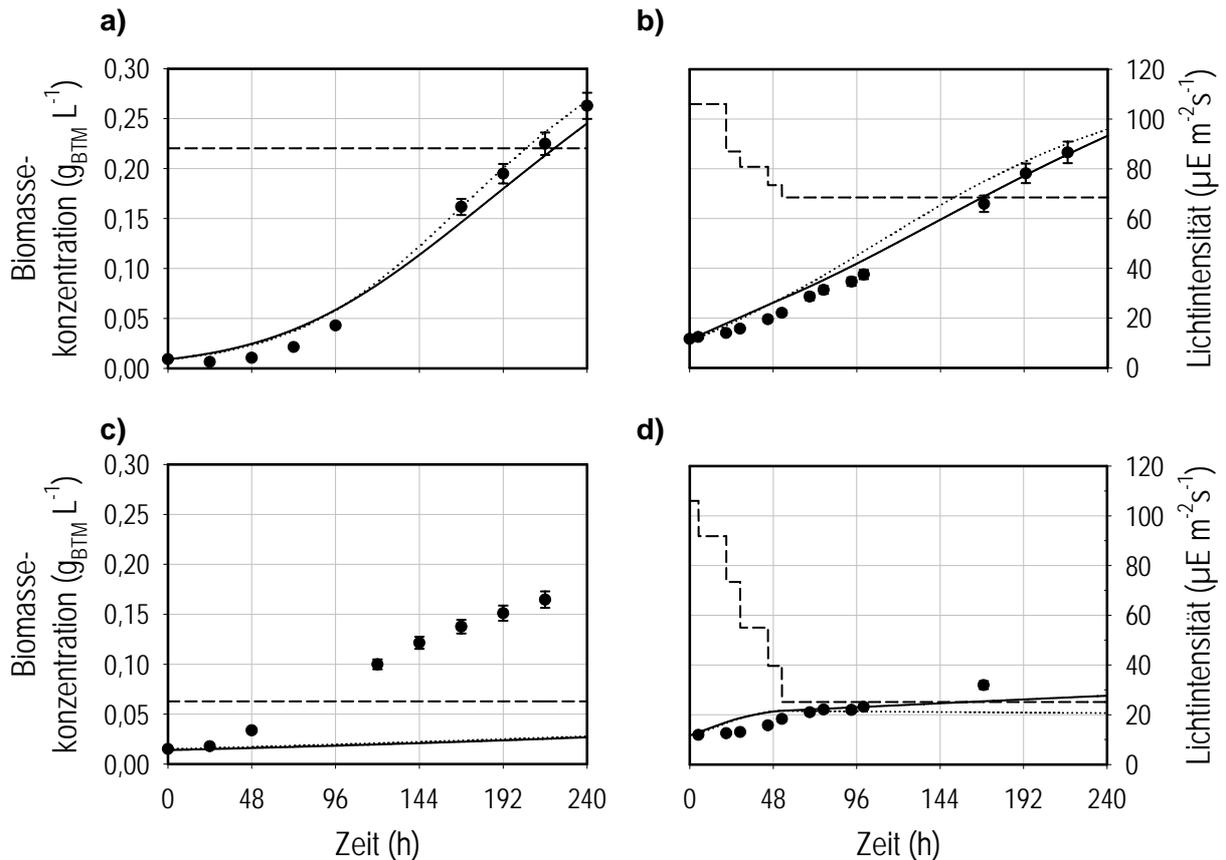
Es war daher nicht sicher, ob das Modell die experimentellen Daten unterhalb des ermittelten Schätzwertes für  $c_{I,opt}$  bei der geringen Lichtintensität der Lichtanlage von maximal  $102 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  wiedergeben konnte.

Die Abbildungen 5.9a-d geben den Verlauf simulierter und gemessener Daten in Abhängigkeit von der Ausgangsbiomasse  $c_x$  und der eingestrahnten Lichtintensität  $I_0$  wieder.

Bei Lichtintensitäten  $\geq 70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  konnte mit beiden kinetischen Modellen eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten erreicht werden. Dabei liegen bei konstanten Lichtintensitäten die simulierten Werte mit dem Modell nach Aiba näher an den reellen Daten (Abbildung 5.9a). Bei veränderlichen Lichtverhältnissen erzeugte hingegen das Modell von Eilers und Peeters bessere Lösungen (Abbildung 5.9b).

Wurde die Lichtintensität auf  $25 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  verringert, so war keines der Modelle in der Lage, den tatsächlichen Biomasseverlauf wiederzugeben (Abbildungen 5.9c und d).

Das Modell nach Eilers und Peeters unterscheidet unterschiedliche Aktivierungszustände der Photosynthesefabriken einer Zelle (Lichtsammelkomplexe, Photosynthesezentren und biochemische Apparate), um die Wachstumsgeschwindigkeit zu beschreiben. Dabei ist die Überführung einer aktivierten Photosynthesefabrik in den ruhenden Zustand der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die Analyse der Simulationsergebnisse für das Modell nach Eilers und Peeters zeigte, dass sich bei den eingestrahnten Lichtintensitäten 98 % der Photosynthesefabriken im ruhenden und 2 % im aktivierten Zustand befanden. Der inhibierte Zustand war nicht aufgetreten.



**Abbildung 5.9:** Vergleich der Simulationen bei unterschiedlichen Ausgangslichtintensitäten  $I_0$  (— —) mit experimentell gemessenen Daten (●). Modell nach Aiba (.....) und Eilers und Peeters (—) in Blasensäulen mit einem Durchmesser von 6 cm unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Absorptionsmodells.

### 5.2.5 Diskussion

Die Anlage mit 250 mL Blasensäulen ist das erste miniaturisierte Blasensäulensystem, das über eine variabel einstellbare, reproduzierbare Lichtanlage verfügt. Es ermöglichte somit kinetische Messungen für *Synechococcus* PCC7942 im kleinen Maßstab bei einem hohen Parallelisierungsgrad. Die Lichtintensitäten waren analog den Lichtintensitäten bei Kultivierungen in gerührten Kolben einstellbar.

Die erreichten Wachstumsraten in Blasensäulen lassen darauf schließen, dass sowohl die Alkalisierung des Mediums im gerührten Kolben als auch die damit verbundene  $\text{CO}_2$ -Limitierung zu verringerten Wachstumsraten führen. Die erhöhte Turbulenz gegenüber gerührten Kolben ist in Blasensäulen zusätzlich für ein besseres Wachstum verantwortlich, da die Frequenz der Bewegung in und aus der Beleuchtungszone einen wichtigen Einfluss hat (Luo *et al.*, 2003).

Die maximale Wachstumsrate von  $0,042 \text{ h}^{-1}$  liegt um 420 % über den publizierten Daten mit *Synechococcus* PCC6301 in Blasensäulen bei  $30^\circ\text{C}$  (Suh und Lee, 2001) und um 18 % unter der Wachstumsrate von Kultivierung von *Synechococcus* PCC6301 im Chemostaten bei  $167 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  und  $30^\circ\text{C}$  (Lepp und Schmidt, 1998). Sie überstieg einen generellen Referenzwert für Mikroalgen in Blasensäulen mit bis zu 0,19 m Durchmesser um 38 % (Sánchez Miron *et al.*, 2002).

Viele Forschergruppen haben mathematische Modelle zur Vorhersage der Lichtverteilung in einem Photobioreaktor entwickelt (Cornet *et al.*, 1995; Acién Fernández *et al.*, 1997; Suh und Lee, 2001, 2003). Trotz einer Vernachlässigung der Streuung von Zellen gibt das Lambert-Beer'sche Gesetz die exponentielle Abnahme der Lichtintensität mit phototrophen Kulturen im Zentrum der Blasensäule gut wieder. Die Lichtintensität nahm mit der Kulturdichte exponentiell ab und stimmte mit Ausführungen von Tredici (1999) überein.

Die Messwerte der Kultivierungen mit veränderlichen Lichtprofilen können, solange nicht 63 % der  $\mu_{opt}$  zugeordneten geschätzten Lichtintensität von  $c_{I,opt} = 110 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  unterschritten wird, durch die untersuchten zwei kinetischen Modelle (Aiba, 1982; Eilers und Peeters, 1988) gut wiedergegeben werden. Dieses Resultat ist überraschend, da das Modell von Aiba selbst im lichtlimitierten Bereich zwischen  $70$  und  $105 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  noch zufriedenstellende Ergebnisse liefert. Die identifizierten Modellparameter und Simulationsergebnisse beider Modelle zeigen, dass die in den Versuchen eingesetzten Lichtintensitäten zu gering waren um Inhibierungsphänomene beobachten zu können. Für *Synechococcus* PCC6301 ist laut Literatur eine Inhibierung erst ab  $200 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  zu erwarten (Suh und Lee, 2001).

Unter Einbeziehung der maximalen Wachstumsrate von  $0,042 \text{ h}^{-1}$  ist es sinnvoll, für eine Maßstabsvergrößerung in einen 20 L Rührkesselreaktor eine kontinuierliche Lichtintensität von  $102 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  über 96 h einzusetzen. Somit kann eine ausreichende Zellmenge für das große Kulturvolumen als Inokkulum bereitgestellt werden. Nach einer Kultivierungszeit von 96 h findet ein deutlicher Abfall der Wachstumsrate statt. Derartiges Animpfgut würde voraussichtlich eine längere lag-Phase hervorrufen.

### 5.3 Reaktionstechnische Untersuchungen zur Anzucht in Rührkesselreaktoren

Basierend auf den Daten der reaktionstechnischen Untersuchungen in 250 mL Blasensäulen sollte ein Modell für einen 20 L Rührkesselreaktor entwickelt werden. Der bislang eingesetzte Referenz-Prozess ist in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

**Tabelle 5.4:** Prozessdaten der Referenzkultivierung

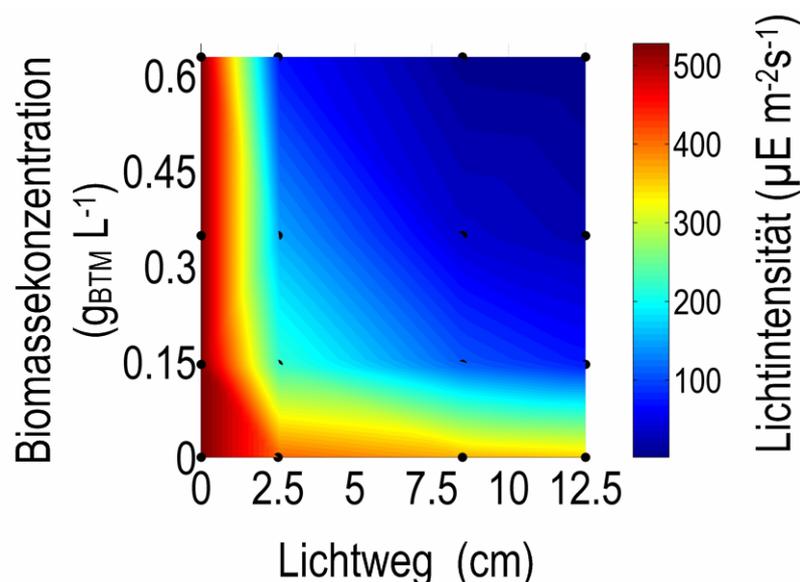
	$I_0$ ( $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$t$ (h)	$c_X$ ( $\text{g}_{\text{BTM L}^{-1}}$ )	$\mu_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	RZA ( $\text{g}_{\text{BTM L}^{-1} \text{h}^{-1}}$ )
Referenz	154	600	0,59	0,01	$1 \cdot 10^{-3}$

Die erreichte Biomassekonzentration war aufgrund fehlender Kenntnisse über die Lichtansprüche der Organismen minimal. Eine modellgestützte Kultivierung mit einem optimierten Lichtprofil sollte eine bessere Raum-Zeit-Ausbeute gewährleisten.

### 5.3.1 Beleuchtungsstudie im 20 L Rührkesselreaktor

Analog den Untersuchungen in 250 mL Blasensäulen wurde die Absorption im Rührkesselreaktor entlang dem Radius bei unterschiedlichen Kulturdichten gemessen. Abbildung 5.10 zeigt zusammenfassend die aus den Absorptionmessungen gewonnenen Daten.

Aus ihnen geht hervor, dass bei Biomassekonzentrationen  $\geq 0,19 \text{ g}_{\text{BTM L}^{-1}}$  die Lichtintensität nach einer Eindringtiefe von  $> 5 \text{ cm}$  auf weniger als 10 % der Ausgangsintensität absinkt. Nur bei Biomassekonzentrationen  $< 0,067 \text{ g}_{\text{BTM L}^{-1}}$  dringt das Licht bis zum Mittelpunkt des Reaktors vor.



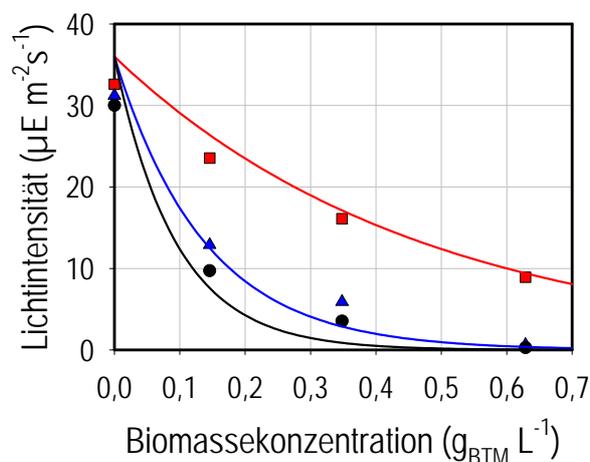
**Abbildung 5.10:** Verlauf der Lichtintensität im Medium im 20 L Rührkesselreaktor über den Lichtweg, bei unterschiedlichen Biomassekonzentrationen und einer eingestrahelten Lichtintensität von  $528 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

### 5.3.2 Entwicklung eines Absorptionsmodells

Aus den unter 5.3.1 gezeigten Daten wurden die Absorptionskoeffizienten für das Lambert-Beer'sche Gesetz und das Absorptionsmodell nach Reynolds und Pacala sowie für das modifizierte Absorptionsmodell nach Reynolds und Pacala berechnet. Für das Lambert-Beer'sche Gesetz wurde ein Absorptionskoeffizient von  $0,8538 \text{ L cm}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  und für beide Modelle nach Reynolds und Pacala ein Absorptionskoeffizient von  $2,3873 \text{ L cm}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  bestimmt.

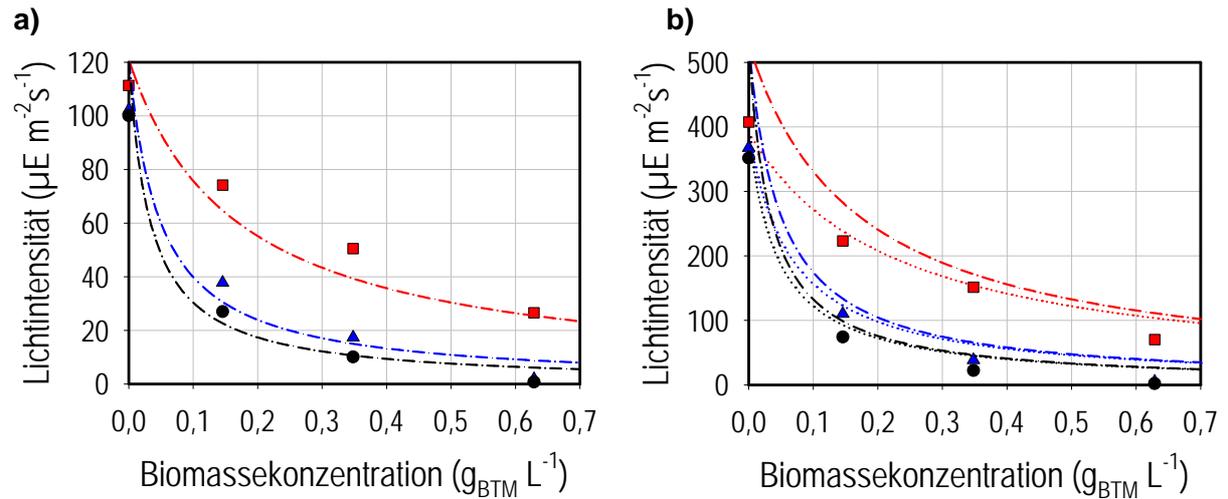
Keines der drei Modelle konnte die Lichtintensität in der Mitte des Reaktors beschreiben. Jedes der Modelle hatte seinen Geltungsbereich für eine bestimmte eingestrahelte Lichtintensität  $I_0$  (Abbildung 5.11 und 5.12).

Niedrige Lichtintensitäten wurden durch das Lambert-Beer'sche Gesetz am besten wiedergegeben (Abbildung 5.11). Zwischen  $83$  und  $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  stimmte das ursprüngliche Modell von Reynolds und Pacala gut mit den gemessenen Werten überein (Abbildung 5.12a), während zwischen  $269$  und  $528 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  das modifizierte Modell von Reynolds und Pacala die besten Lösungen im Vergleich mit den Messwerten lieferte (Abbildung 5.12b).

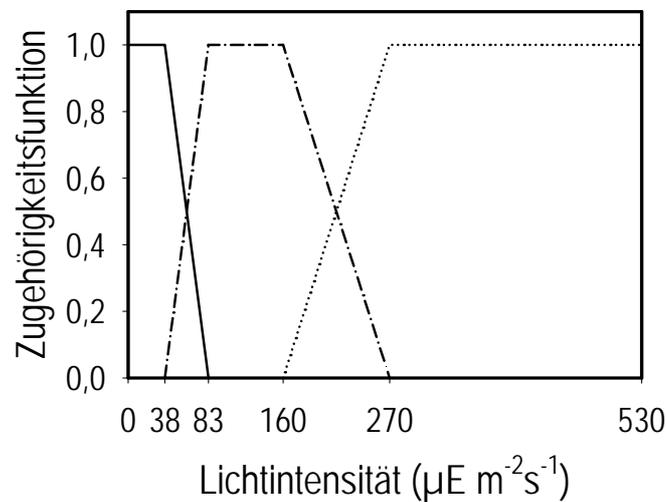


**Abbildung 5.11:** Vergleich der Simulation mit dem Lambert-Beer'schen Modell bei einer Ausgangslichtintensität  $I_0$  von  $36 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  mit experimentell gemessenen Daten bei Lichtwegen von  $2,5 \text{ cm}$  (■);  $8,5 \text{ cm}$  (▲);  $12,5 \text{ cm}$  (●). Modell (—) im 20L-Rührkesselreaktor.

Unter Verwendung eines Soll/Ist-Vergleichs wurde die Zugehörigkeit der einzelnen Lichtmodelle zu den eingestrahelten Lichtintensitäten analysiert und mit Hilfe von einer Zugehörigkeitsfunktion kombiniert (Abbildung 5.13).



**Abbildung 5.12:** Vergleich der Simulation mit den Absorptionsmodellen nach Reynolds und Pacala bei unterschiedlichen Ausgangslichtintensitäten  $I_0$  a)  $120 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; b)  $528 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  mit experimentell gemessenen Daten bei Lichtwegen von 2,5 cm (■); 8,5 cm (▲); 12,5 cm (●) im 20L-Rührkesselreaktor. Modell nach Reynolds und Pacala (— .) und nach Reynolds und Pacala modifiziert (.....).



**Abbildung 5.13:** Darstellung der Zugehörigkeit der Lichtmodelle zu den eingestrahelten Lichtintensitäten  $I_0$ . Modell nach Lambert-Beer (—); nach Reynolds und Pacala (— .) und nach Reynolds und Pacala modifiziert (.....).

Die trapezoide Zugehörigkeitsfunktion beschrieb, unter welchen Lichtbedingungen ein spezifisches Modell zur Simulation herangezogen wurde. Im überlappenden Bereich zweier Modelle wurden die Ergebnisse für die Lichtintensitäten prozentuell der Gewichtung in der Zugehörigkeitsfunktion aufsummiert. Dieses Zugehörigkeitsfunktions-Modell zeigte seinen

Vorteil, indem es die Unschärfe der Gültigkeitsbereiche einzelner Absorptionsmodelle in Form einer Zuordnung zu Werten zwischen 0 und 1 überwindete. In dieser kompakten und einfachen Form ermöglichte es die Berechnung der Lichtintensität, ohne Kenntnis der physikalischen Begebenheiten an den Gültigkeitsgrenzen der einzelnen Modelle.

### 5.3.3 Wachstumskinetische Untersuchungen im Rührkesselreaktor

Das Wachstum von 20 L *Synechococcus* PCC7942 Kulturen wurde bei konstanten Lichtintensitäten von 83, 160, 300 und 528  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  nach einer Anpassungsphase von 96 h bei 36  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  untersucht.

Bei Einstrahlung einer höheren Lichtintensität während dieser Anpassungsphase konnte ein geringeres Wachstum beobachtet werden (Tabelle 5.5 und Abbildung 5.14a). Bei einer Biomassekonzentration von 0,027  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$  und einer Lichtintensität von 528  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  wurde ein schnelles Ausbleichen der Zellen festgestellt. Diese Bleichung trat ab einer Biomassekonzentration von 0,054  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$  nicht mehr auf (Daten nicht gezeigt).

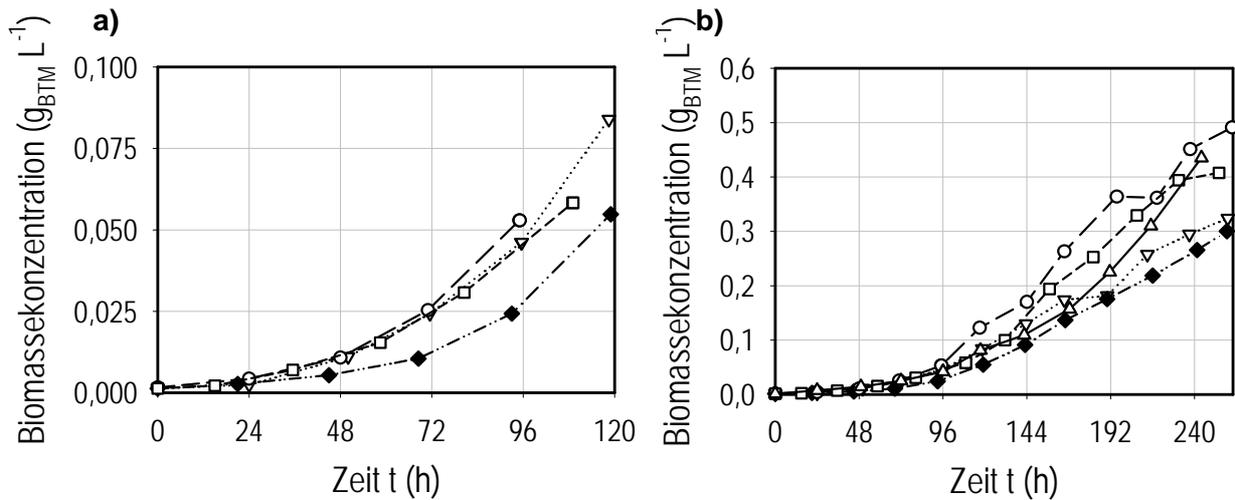
Während der Kultivierungsphase war das Wachstum bei Kultivierungen mit mittleren Ausgangslichtintensitäten von 160  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  am schnellsten (Tabelle 5.6).

**Tabelle 5.5:** Wachstumsraten während der ersten 96 h

	$I_0$ ( $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$\mu_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )
Mit Anpassungsphase	36	0,034
Ohne Anpassungsphase	83	0,03
Ohne Anpassungsphase	528	0

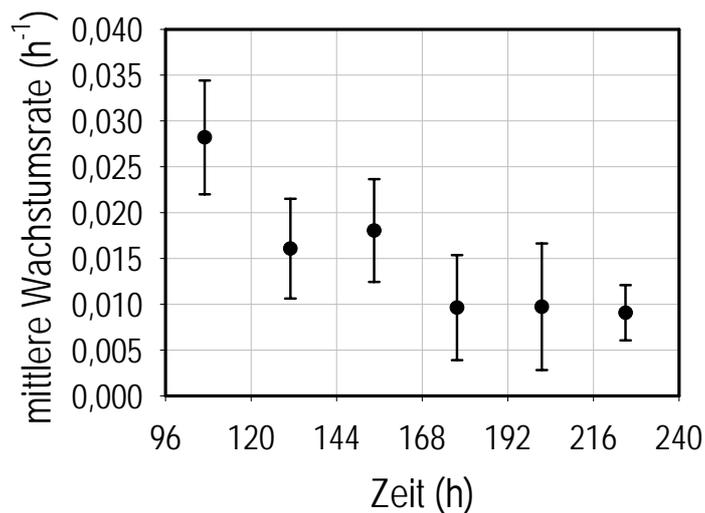
**Tabelle 5.6:** Wachstumsraten während der Kultivierungsphase nach 96 h

	$I_0$ ( $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$\mu_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )
Mit Anpassungsphase	160	0,036
Mit Anpassungsphase	300	0,025
Mit Anpassungsphase	528	0,014



**Abbildung 5.14:** Biomassekonzentration von *Synechococcus* PCC7942 im 20L-Rührkesselreaktor während der **a)** Anpassungsphase und der nachfolgenden **b)** Kultivierungsphase bei unterschiedlichen Ausgangslichtintensitäten  $I_0$   $83 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $\nabla$ );  $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $\circ$ );  $300 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $\square$ );  $528 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $\Delta$ ); und  $83 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $\blacklozenge$ ) ohne Anpassungsphase. Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

Mit zunehmender Kulturdichte war eine deutliche Abnahme der Wachstumsraten zu verzeichnen (Abbildung 5.15).



**Abbildung 5.15:** Wachstumsraten von *Synechococcus* PCC7942 während der Kultivierungsphase für alle Versuche mit Anpassungsphase. Konstante Lichtintensitäten bei 83, 160, 300 und  $528 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### 5.3.4 Modellgestützte Kultivierung im 20L-Rührkesselreaktor

Der Simulation des Wachstums von *Synechococcus* PCC7942 lag das empirische Modell von Aiba (1982) zugrunde (Tabelle 3.3). Es bezog seine Lichtintensitätswerte aus dem unter 5.3.2 entwickelten Zugehörigkeitsfunktions-Lichtmodell. Die identifizierten Modellparameter sind in den Tabellen 5.7 zusammengefasst.

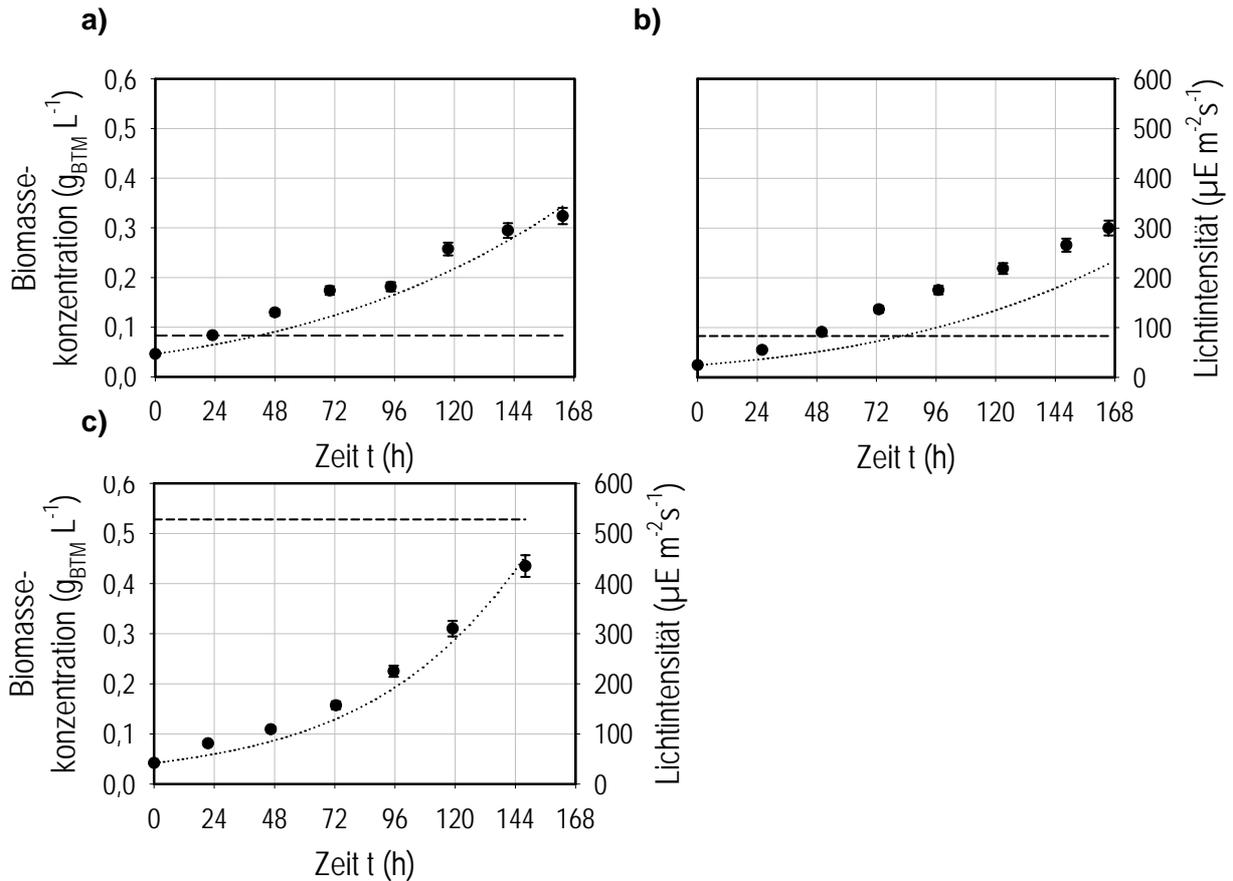
**Tabelle 5.7:** Identifizierte Parameter des Modells nach Aiba (1982).

$\mu_{\max}$	0,12 (h <sup>-1</sup> )
$K_S$	8,25 (μEm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
$K_i$	795 (μE <sup>-1</sup> m <sup>2</sup> s)

Ein Vergleich der Simulation mit den experimentell ermittelten Werten zeigte eine gute Übereinstimmung von durchschnittlich 86-88 % (Abbildung 5.16).

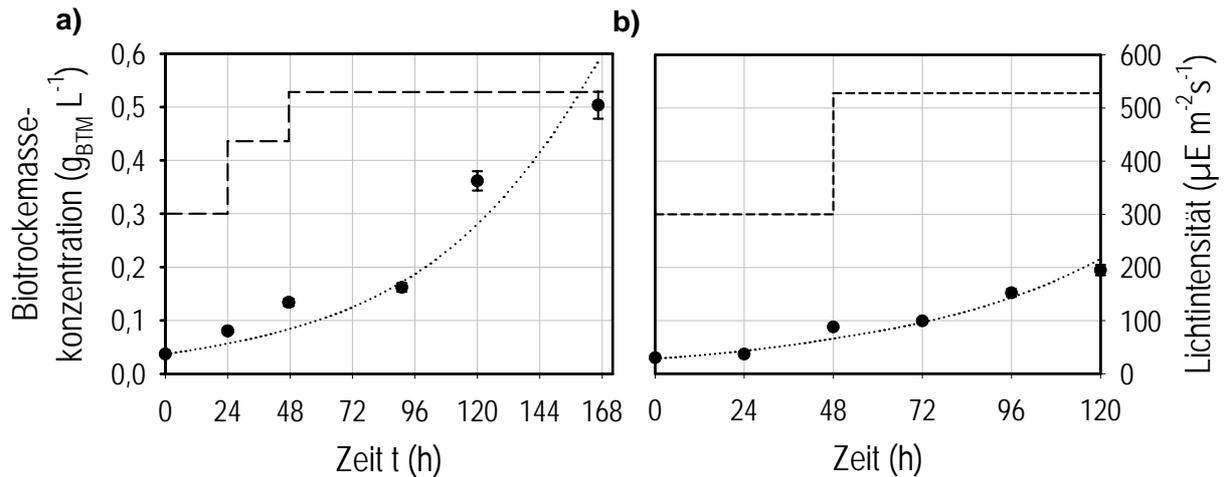
Die Simulation lag ohne eine vorangegangene Anpassungsphase (Kapitel 5.3.3) im Durchschnitt um 32 % unter den experimentell bestimmten Werten (Abbildung 5.16b).

Für Kultivierungen bei konstanten Lichtintensitäten befand sich die Simulationen mit den reellen Daten gut in Einklang.



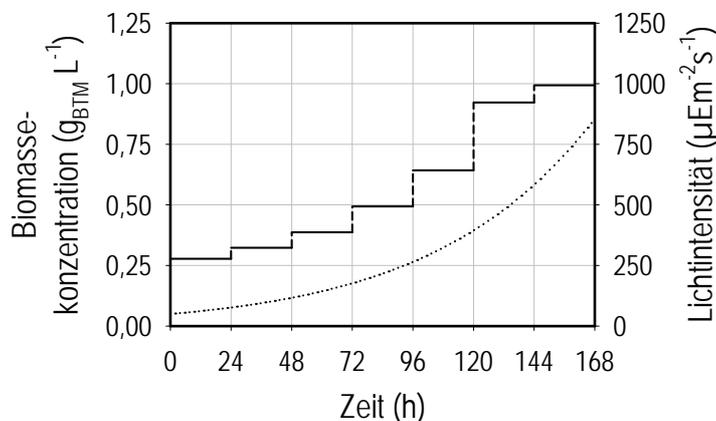
**Abbildung 5.16:** Simulation des Wachstumsmodells für *Synechococcus* PCC7942 in der Kultivierungsphase. **a)** und **c)** mit vorgehender Anpassungsphase bei 36 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> und **b)** mit kontinuierlich 83 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Vergleich der Kultivierung bei unterschiedlichen Ausgangslichtintensitäten  $I_0$  (---) mit experimentell gemessenen Daten (●). Modell nach Aiba (.....).

Auf Basis des Modells wurde ein optimiertes Lichtprofil unter Zuhilfenahme eines genetischen Algorithmus erstellt. Als Optimierungsziel diente die Maximierung der produzierten Biomasse durch Variation der externen Lichtintensität in Intervallen von 24 h (Kapitel 4.7.6). Die experimentellen Daten des optimierten Lichtprofils (Abbildung 5.17a) stimmten gut mit der Simulation überein. Der Verlauf der Biomassekonzentration eines nicht optimierten Sprungprofils ist deutlich flacher als bei einem optimierten Lichtprofil (Abbildung 5.17b) und spiegelt die Sensibilität der Kultur gegenüber der Lichtintensität innerhalb der ersten 48 h nach der Anpassungsphase wider.



**Abbildung 5.17:** Kultivierung von *Synechococcus* PCC7942 im 20L-Rührkesselreaktor mit einem **a)** optimierten Lichtprofil und **b)** nicht optimierten Lichtprofil. Ausgangslichtintensitäten (— —), experimentell gemessenen Daten (●), Modell von Aiba (.....).

Durch den Einsatz des optimierten Lichtmodells wurde nach einer Kultivierungsphase von 168 h, bei insgesamt 264 h Gesamtkultivierungszeit eine Biomasse von  $0,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  gewonnen. Dies entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



**Abbildung 5.18:** Simulierte Kultivierung von *Synechococcus* PCC7942 mit Sonnenlicht. Simulierte Daten des Modells von Aiba (.....). Lichtprofil (— —).

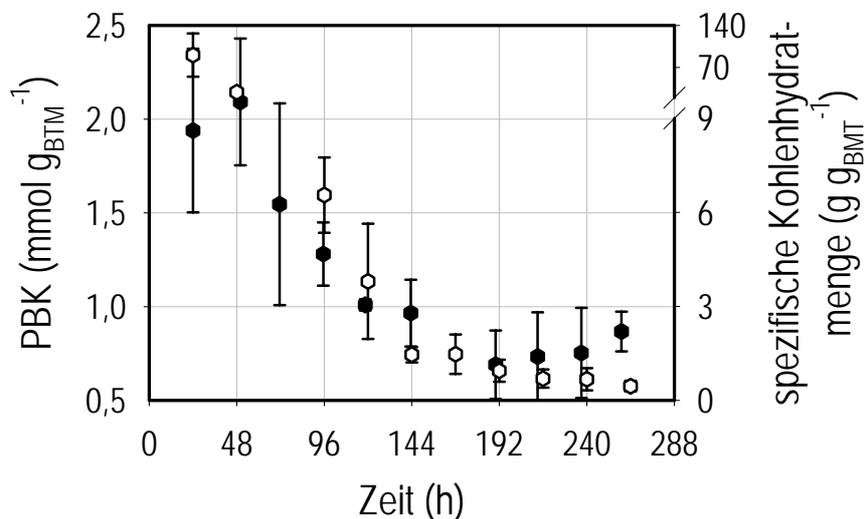
Auf Grundlage des vorliegenden Modells wurde eine Kultivierung von *Synechococcus* PCC7942 bei Sonnenlichtintensitäten mit einem optimierten Stufenprofil simuliert (Abbildung 5.18).

Die erwartete Biomassekonzentration wurde auf 152-170 % der Biomassekonzentration, die bislang bei  $528 \text{ µE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  mit künstlicher Beleuchtung erreicht wurde, geschätzt. (Tabelle 5.9)

### 5.3.5 Qualität von Zellen in Rührkesselreaktoren als Biokatalysator

Um einen Rückschluss auf den physiologischen Zustand der Zellen bei Kultivierungen im Rührkesselreaktor zu ziehen, wurden die Produktbildungskapazität und der spezifische Gehalt an Kohlehydraten der Zellen untersucht. In diesem Zusammenhang gab die Produktbildungskapazität Auskunft über die Menge an S-PFE, die durch eine spezifische Biomasse an *Synechococcus* PCC7942 aus PFAP bei 20°C im Satzverfahren produziert wurde. Der Gehalt an Kohlehydraten war ein Maß für die Menge an gespeicherten Energieträgern die dem Stoffwechsel zur Verfügung standen.

Die mittlere Produktbildungskapazität nahm ausgehend von dem Wert 2,1 mmol g<sub>B<sub>TM</sub></sub><sup>-1</sup> über die Kultivierungsdauer stetig ab (Abbildung 5.19). Die Anfangswerte bei 24 h ließen darauf schließen, dass die entwickelte Vorkultur-Herstellung in gerührten Kolben (Kapitel 5.1.4) und Blasensäulen (Kapitel 5.2.5) Zellen von guter Qualität als Biokatalysator lieferte.



**Abbildung 5.19:** Produktbildungskapazität (PBK) für S-PFE (●) und spezifischer Gehalt an Kohlehydraten (○) von *Synechococcus* PCC7942 bei Kultivierungen im 20 L-Rührkesselreaktor. Kultivierung mit kontinuierlichen Lichtintensitäten bei 83, 160, 320 und 528  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Abbildung. 5.14).

Im Vergleich dazu stiegen die Produktbildungskapazitäten bei Kultivierungen in gerührten Kolben und Blasensäulen bei 38  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  erst nach 264 h Kultivierungszeit von 0 mmol g<sub>B<sub>TM</sub></sub><sup>-1</sup> auf 0,55 mmol g<sub>B<sub>TM</sub></sub><sup>-1</sup> und 1,83 mmol g<sub>B<sub>TM</sub></sub><sup>-1</sup> an (Daten nicht gezeigt).

Der spezifische Gehalt an Kohlehydraten fiel ausgehend von ca. 90 g g<sub>B<sub>TM</sub></sub><sup>-1</sup> auf 0,5 % des Ausgangswertes (Abbildung 5.19). Die mittlere Produktbildungskapazität aller Reaktorläufe mit konstanter Lichtbestrahlung verhielt sich tendenziell wie der Verlauf des Gesamtkohlenhydratgehalts sämtlich untersuchter Kultivierungen (Abbildung 5.19).

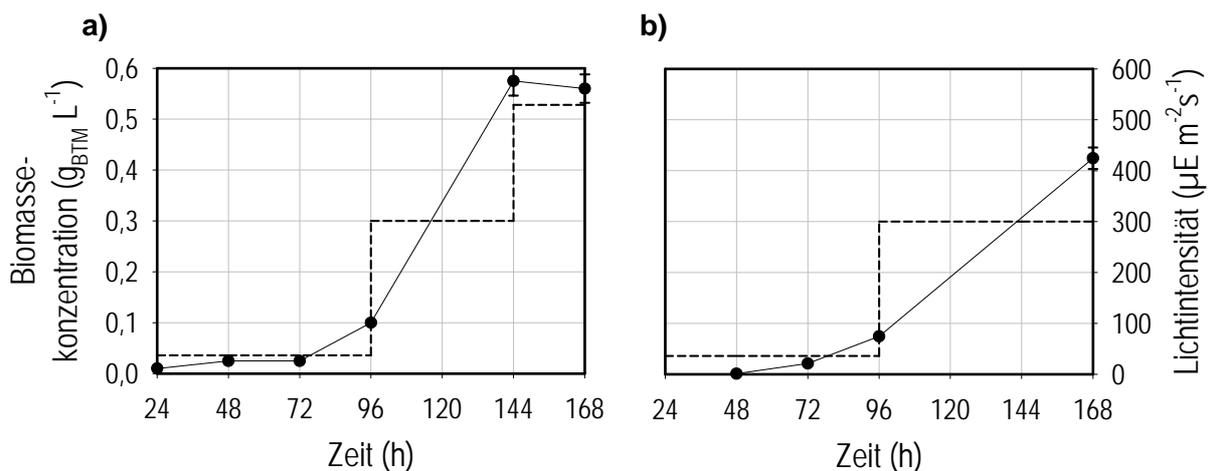
### 5.3.6 Vergleichende Kultivierungsstudie verschiedener Cyanobakterienstämme

Das optimierte Anzuchtverfahren für *Synechococcus* PCC7942 sollte auf seine Übertragbarkeit untersucht werden. Hierzu wurden die Stämme *Anabaena variabilis* und *Nostoc muscorum* im 20 L-Maßstab mit veränderlichen Lichtprofilen kultiviert (Abbildung 5.20).

Nach einer Anpassungsphase bei  $36 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  war die Kultivierung beider Stämme im Rührkesselreaktor erfolgreich. Die ermittelten Prozessdaten sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst.

**Tabelle 5.8:** Prozessdaten der optimierten Vergleichskultivierungen

Organismus	$I_0$ ( $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$t$ (h)	$c_x$ ( $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$ )	$\mu_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	RZA ( $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
<i>Anabaena variabilis</i>	36-528	168	0,56	0,083	$3,31 \cdot 10^{-3}$
<i>Nostoc muscorum</i>	36-528	168	0,42	0,050	$2,51 \cdot 10^{-3}$



**Abbildung 5.20:** Kultivierungsergebnisse heterozystischer Cyanobakterien im 20 L-Rührkesselreaktor. a) *Anabaena variabilis* und b) *Nostoc muscorum*. Biomassekonzentration (●) und Lichtintensität (- - -). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

### 5.3.7 Diskussion

Mit der am 20 L-Rührkesselreaktor installierten Lichtanlage konnten Lichtintensitäten von  $528 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  erreicht werden. Dies entspricht 30 % der photosynthetisch aktiven Sonnenstrahlung (Pulz, 2001). Es ist bekannt, dass die energetische Effizienz der Umwandlung von elektrischer Energie in Biomasse einen Wert zwischen 0,7 und 2 % bei Verwendung von Leuchtstoffröhren annimmt (Conet *et al.*, 1998). Trotzdem wird eine künstliche Beleuchtung aufgrund ihrer sicheren Verfügbarkeit bei sehr wertvollen Produkten als ernsthafte Alternative zu Sonnenlicht betrachtet. Ein optimiertes Lichtspektrum kann eine

Effizienz der Photosynthese von bis zu 15 % im Vergleich zu 20 % bei gesättigtem Sonnenlicht erreichen (Tredici, 1999).

Es konnte ausreichend Licht in den Rührkesselreaktor eingetragen werden, um das Phänomen der Lichtinhibierung zu beobachten. Photoinhibierende Prozesse sind zeitabhängig. Bei starkem Licht können nach 10 - 20 min bereits 50 % einer Kultur irreversibel geschädigt werden (Pulz, 2001). Dies kann anhand des schnellen Ausbleichens dünner Kulturen (Biotrockenmassekonzentration =  $0,027 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ ) bei Lichtintensitäten von  $528 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  beobachtet werden. Die Anpassung der Lichtsammelfallen sowie die Reparaturen von Bestandteilen der Photosynthesezentren lassen für inhibitorische Strahlungswerte  $> 200 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ein langsames Wachstum erwarten (Kruse, 2001; Rubio *et al.*, 2003). Eine derartige Photoadaptation benötigt mindestens 10 - 40 min. Das Konzept einer Anpassungsphase bei  $36 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  erlaubt es innerhalb kurzer Zeit Zellen zu erzeugen, die im weiteren Verlauf schnelle Lichtanpassungen durchführen können.

Die Daten aus den Kultivierungsläufen belegen, dass bei einer Lichtintensität von  $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  die Biomassezunahme maximal ist. Mit Überschreitung der Sättigungslichtintensität sinkt die Nutzung des Sonnenlichtes auf 20 % (Tredici, 1999). Es ist anzunehmen, dass bei einer erheblichen Überschreitung von  $110 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  eine stetig ineffizientere Nutzung der Lichtenergie erfolgt und so, bei sehr hohen Lichtintensitäten, keine deutliche Steigerung im Wachstum beobachten werden kann. Ferner nehmen mit steigender Lichtintensität inhibitorische Phänomene am Reaktorrand zu.

Aufgrund der Untersuchungen von Sánchez-Miron *et al.* (2002) mit *Phaeodactylum tricornutum* war zu erwarten, dass mit zunehmender Abschattung der Zellen Kohlenhydrate akkumuliert werden. Eine Zunahme der Kohlenhydrate konnte bei *Synechococcus* PCC7942 nicht beobachtet werden. Lichtgesättigtes Wachstum von Mikroalgen führt zu einer geringen Speicherung von Kohlenhydraten, aber zu einer deutlichen Anreicherung struktureller Komponenten der Zellen (Sánchez-Miron *et al.*, 2002). Es ist möglich, dass die applizierte Lichtintensität nicht ausreichte, um eine Einlagerung zu fördern. Lichtgesättigte Zellen der Vorkultur bestätigen diese Vermutung. Frische Zellen im Reaktor zeigen hohe spezifische Konzentrationen an Kohlenhydraten.

Der Grund für den Rückgang der Kohlenhydrate ist in der zunehmenden Abschattung der Zellen durch die Randzonen des Reaktors zu suchen. Da bei Biotrockenmassekonzentrationen  $> 0,19 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  Licht weniger als 5 cm in den Reaktor eindringt, werden im dunklen Reaktorkern die gespeicherten Kohlenhydrate für den Erhaltungsstoffwechsel als Energiequelle respiratorisch genutzt (Schmetterer, 1994).

Die experimentell ermittelte Raum-Zeit-Ausbeute von  $1,91 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  lag deutlich unter den publizierten Werten anderer Mikroalgen. Sie sind die Konsequenz des schlechten

Oberfläche zu Volumenverhältnis von  $6,4 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$  des Rührkesselreaktors, der geringen Eindringtiefe des extern applizierten Lichtes und der langsam wachsenden Stämme. Beleuchtete Rührkesselreaktoren mit unterschiedlichen, getauchten Beleuchtungselementen zeigten Produktivitäten von  $4,2 - 41,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  mit einem Oberfläche zu Volumenverhältnissen von  $2 - 8 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$  (Pulz, 2001).

Die gemessenen maximalen Wachstumsraten von *Synechococcus* PCC7942 bei Kultivierungen mit konstanten Lichtintensitäten im 20L-Rührkesselreaktor sind 13 % geringer als in 250 mL Blasensäulen. Dies liegt an der ungenügenden Ausleuchtung des deutlich größeren Reaktorquerschnittes. Ferner erfahren Zellen an der Reaktorwand sehr hohe Lichtintensitäten, die eine Photoinhibierung verursachen können (Barber und Andersson, 1992). Hingegen leiden Zellen im Reaktorkern unter Photolimitation aufgrund ungenügender Lichtzufuhr. Sowohl die Qualität als auch die Quantität des eingesetzten Lichtes haben Einfluss auf das Zellwachstum (Märkl, 1980; Laws *et al.*, 1983; Pulz und Scheibenbogen, 1998; Merchuk *et al.*, 1998).

Die gesammelten Erkenntnisse wurden in den Modellannahmen formuliert (Kapitel 4.7.2). Die Simulation geht davon aus, dass im Reaktor zwei Wachstumszonen mit schlechtem Wachstum unterschieden werden. Diese sind die lichtinhibierte Zone nahe dem Reaktormantel und eine limitierte Wachstumszone im verschatteten Reaktorkern. Die Inhibierungszone nimmt mit steigender Lichtintensität zu. Sie wird zum Schutz der dahinter liegenden Zellen toleriert. Zellen in der anschließenden Wachstumszone wachsen unter optimalen lichtgesättigten Bedingungen und kompensieren den geringen Biomasseertrag der Zonen mit vermindertem Wachstum.

Auf Basis der Absorptionmessungen wurde der Reaktor für die Modellierung in Segmente à 1,25 cm eingeteilt. Etablierte Absorptionsmodelle wie das Lambert-Beer'sche Gesetz und das Absorptionsmodell von Reynolds und Pacala (1993) konnten die gemessenen Lichtintensitäten im Reaktor nicht exakt wiedergeben. Als geeignetes Absorptionsmodell wurde daher eine Kombination aller untersuchten Modelle gewählt.

Die Simulationsergebnisse liefern gut übereinstimmende Resultate mit experimentellen Daten, solange die Biomassekonzentration nach der Adaptionphase konstant ist. Eine deutliche Abweichung von der Startbiomassekonzentration  $c_{X0}$  äußert sich in erheblichen Abweichungen von Simulation und Messung.

Bezogen auf den gesamten Prozess (264 h bzw. 600 h) konnte die Raum-Zeit-Ausbeute im Vergleich zum Ausgangsprozess um 90 % erhöht werden. Im gemeinsamen Beobachtungszeitraum (264 h) beider Prozesse zeigt die modellgestützten Kultivierung eine um den Faktor 4,8 erhöhte Raum-Zeit-Ausbeute (Tabelle 5.9).

**Tabelle 5.9:** Raum-Zeit-Ausbeuten der Kultivierungen im Rührkesselreaktor

	$I_0$ ( $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$t$ (h)	$c_X$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	$\mu_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	RZA ( $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
Referenz	154	264	0,1	0,01	$0,41 \cdot 10^{-3}$
Optimierter Prozess	36-528	264	0,5	0,63	$1,91 \cdot 10^{-3}$
Simulierter Prozess	1000	264	0,76-85	0,63	$2,9 - 3,21 \cdot 10^{-3}$

Auf Basis des Modells können neue Lichtintensitätsprofile entwickelt werden, deren Simulation durch experimentelle Daten gut wiedergegeben wird. Aufgrund der bewiesenen Funktionalität des Modells kann für *Synechococcus* PCC7942 eine Kultivierung bei Tageslichtintensitäten im 20L-Rührkesselreaktor simuliert werden. Bei Sonnenlicht könnte die Raum-Zeit-Ausbeute um 68 % gegenüber dem bisherigen Kultivierungsverfahren gesteigert werden (Tabelle 5.9).

## 5.4 Medienoptimierung

Bei der Kultivierung von *Synechococcus* PCC7942 nach den Vorgaben des Pasteur-Kulturinstituts für Cyanobakterien wurden bei der Reduktion von PFAP zu S-PFE in gasdichten gerührten Reaktoren im Satzverfahren bei 20°C nur geringe Produktbildungskapazitäten von 0,55 mmol  $\text{g}_{\text{BTM}}$  erreicht.

Jede Medienkomponente beeinflusst direkt die Ionenstärke und den pH des Mediums. Die Hauptbestandteile wie Phosphat, Stickstoff, Magnesium und Carbonat spielen eine wichtige Rolle in der Phosphorylierung, Aminosäuresynthese und dem Kohlenstoff-Stoffwechsel. Enzyme mit Metallionen in ihren katalytischen Zentren sind an diesen metabolischen und anapleuretischen Stoffwechselwegen beteiligt. Enzymen des Photosyntheseapparates enthalten Mangan, Kobalt, Kupfer und Eisen. Diese Metallionen haben somit einen direkten Einfluss auf die Leistungsfähigkeit der Photosynthesezentren von Cyanobakterien. Im folgenden Kapitel wird beschrieben, wie die Güte des Biokatalysators mittels einer Medienoptimierung verbessert wurde.

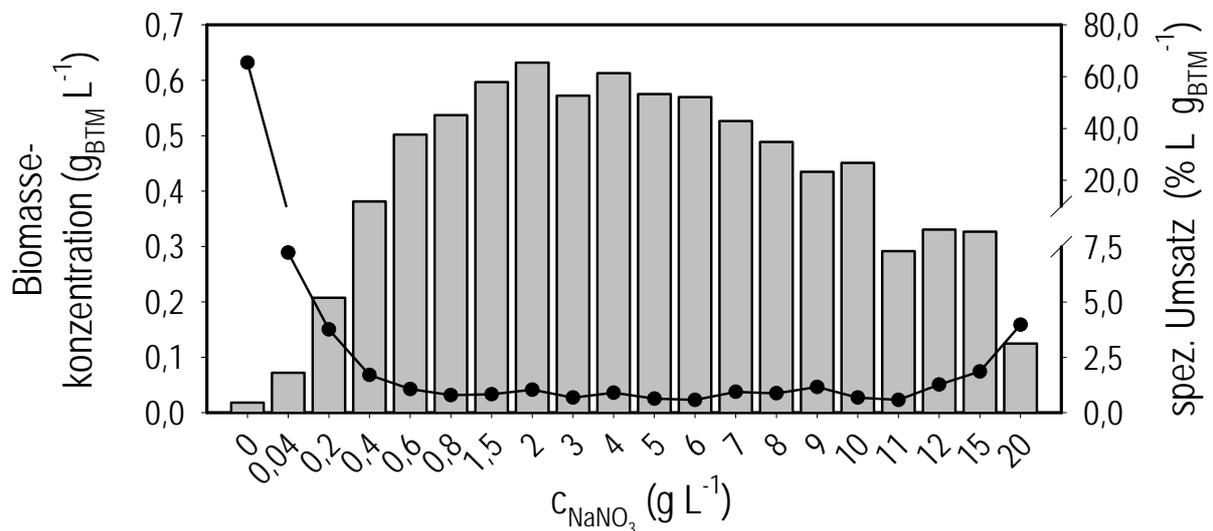
Zielfunktionen der Optimierung waren die gebildete Biomassekonzentration nach 72 h Kultivierung im Satzverfahren und die Menge an gebildetem Produkt nach 24 h Biokatalyse durch die so gewonnenen Zellen. Zur Maximierung der Zielfunktionen wurden zwei unterschiedliche genetische Algorithmen (VEGA und SPEA) verwendet, die in Kapitel 4.9 in ihrer Funktionsweise im Detail beschrieben sind.

Über eine Parameterstudie wurde zunächst der Suchraum für die Algorithmen eingegrenzt. Die Ergebnisse der Optimierung wurden durch unabhängige Versuche validiert.

#### 5.4.1 Parameterstudie zu Medienkomponenten

Über die Variation der Konzentration von jeweils einer Medienkomponente wurde der Einflussbereich jeder Medienkomponente erfasst. Dieser wurde über die gebildete Biomassekonzentration und den Zellspezifischen Umsatz, als Maß für den Umsatz von PFAP durch die gebildete Biomasse, quantifiziert.

Die gemessenen Grenzwerte sind in Tabelle 5.10 zusammengefasst. Die Medienkomponenten Natriumnitrat (Abbildung 5.21) und Kaliumphosphat hatten einen deutlichen Einfluss auf das Wachstum.



**Abbildung 5.21:** Parameterstudie von *Synechococcus* PCC7942 mit verschiedenen Konzentrationen an  $\text{NaNO}_3$  im Medium. Dargestellt sind der spezifische Umsatz von PFAP nach 24 h (●) und die gebildete Biomassekonzentration nach 168 h im Satzverfahren in 1 mL Reaktoren (■). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

Bei Magnesiumsulfat und Ammoniumeisen(III)citrat waren ab einem unteren Konzentrationsschwellenwert keine deutlich ausgeprägten Auswirkungen zu beobachten. Kulturen, in denen Natriumnitrat, Calciumchlorid und Zitronensäure fehlte, bleichten ohne Abnahme der optischen Dichte aus. Für Calciumchlorid wurde der maximale Umsatz bei der 10-fachen Konzentration, ausgehend vom BG-11-Medium, gemessen.

Bei fehlendem Natriumcarbonat und EDTA konnte kein morphologischer Einfluss auf die Kultur festgestellt werden. Basierend auf Ergebnissen mit Calciumchlorid, wurde für die Medienoptimierung der Suchraum für jede Medienkomponente auf  $\pm$  der 10-fachen Konzentration des BG-11-Mediums gewählt.

**Tabelle 5.10:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Parameterstudie für die Medienoptimierung. Positiver Einfluss (+), negative Einfluss (–) und kein Einfluss (0).

Medienbestandteil	Konzentration im BG-11-Medium (g L <sup>-1</sup> )	Einfluss bei Anwesenheit auf		Geeignete Salzkonzentration (g L <sup>-1</sup> ) für	
		BTM	Umsatz	BTM	Umsatz
NaNO <sub>3</sub>	1,5	+	+	1,5-6	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,031	+	+	0,028	0,28
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,075	0	0	> 0,3	0
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,036	-	+	-	0,36
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> *H <sub>2</sub> O	0,006	-	0	-	-
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> *xFe*xH <sub>3</sub> N	0,006	0	+	> 0,006	0
EDTA	0,001	-	0	-	0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,04	-	0	-	-

#### 5.4.2 Medienoptimierung mit genetischen Algorithmen

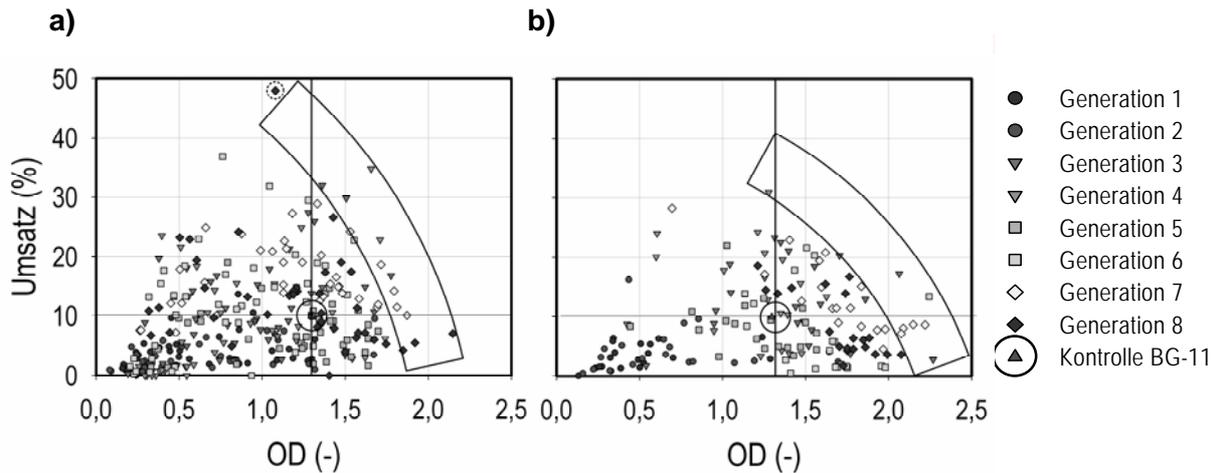
Für die Medienoptimierung wurden alle Medienkomponenten gleichzeitig variiert. Nach acht Optimierungszyklen (8 Generationen) wurde eine deutliche Verbesserung in beiden Zielfunktionen erreicht. Die Ergebnisse aller Experimente fasst Abbildung 5.22 zusammen.

Die Medien der ersten Generation waren in beiden Fällen zufällig zusammengesetzt und Grundlage für die weitere Veränderung der Medienrezepte durch die genetischen Algorithmen. Zufällig erzeugte Medien erzielten Umsetzungen von weniger als 15 % mit einer OD<sub>730</sub> unter 1,5.

Mit Fortschreiten der Optimierungsverfahren konnten Lösungen in der rechten oberen Ecke des Ergebnisraumes beobachtet werden. Ausgehend vom Ursprung des Diagrammes konvergierten die Rezepte des SPEA deutlicher früher als beim VEGA.

Beim VEGA waren nach der fünften Generation noch sehr viele Medienrezepte schlechter als die BG-11-Referenz. Die gestreuten Lösungen im Ergebnisraum ergaben eine trichterförmige Anordnung. Im Gegensatz dazu wandern die Lösungen des SPEA ausgehend von der Basis in Form eines Bandes und zeigen bereits in der dritten Generation eine OD<sub>730</sub> > 2 und Umsetzungen von 24 %.

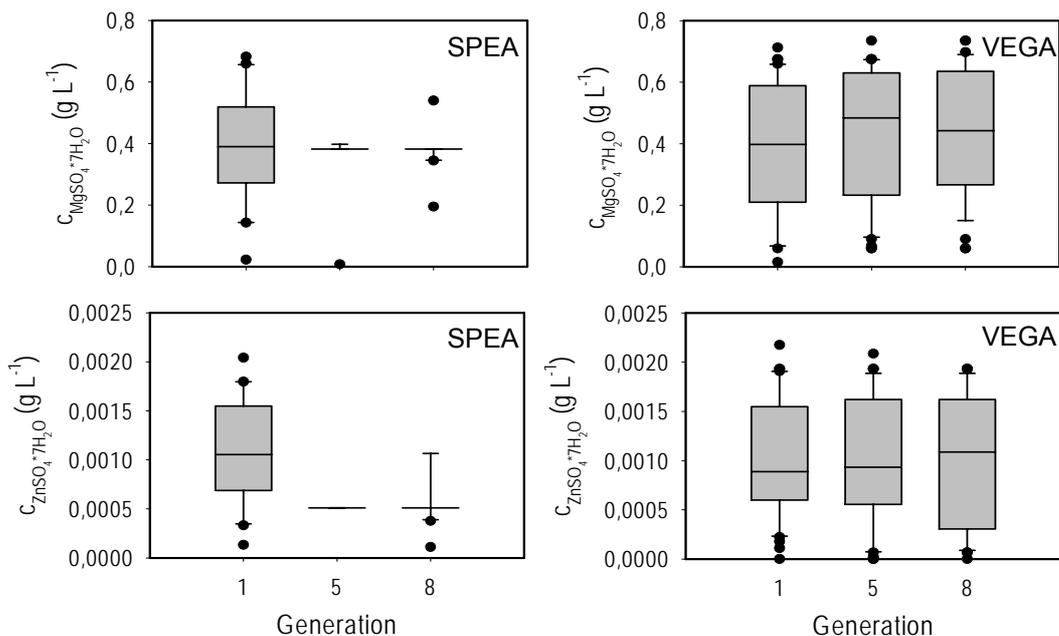
Gegen Ende beider Optimierungen war die Ausbildung von *Pareto*-optimalen Lösungen zu beobachten, die in Abbildung 5.22 durch eine gekrümmte Fläche qualitativ visualisiert werden.



**Abbildung 5.22:** Vergleich der Zielfunktionen der genetischen Algorithmen VEGA und SPEA. **a) VEGA b) SPEA.** Eine hypothetische „Pareto-Front“ (□), die BG-11 Referenz (—) und die gewählte Lösung (.....) sind im Datenraum markiert. Die „Pareto-Front“-Fläche dient der Visualisierung mit einer maximalen Fehlerannahme von 10 % bei Experiment und Analytik.

Die Konvergenz der einzelnen Salzkonzentrationen zu einem Optimum zeigte beim SPEA in den meisten Fällen bereits nach drei Generationen einen asymptotischen Verlauf (Abbildung 5.23).

Beim VEGA ist nur in wenigen Fällen eine deutliche Konvergenz der Salzkonzentrationen beobachtet worden (Anhang 12.4).



**Abbildung 5.23:** Ausgewählte Salzkonzentrationen in den einzelnen Medien als Funktion der Optimierungszyklen für die gesamte Population der jeweiligen Generation.

**Tabelle 5.11:** Beste Medienzusammensetzungen bezogen auf die zellspezifische Umsetzung durch eine Optimierung mit VEGA und SPEA.

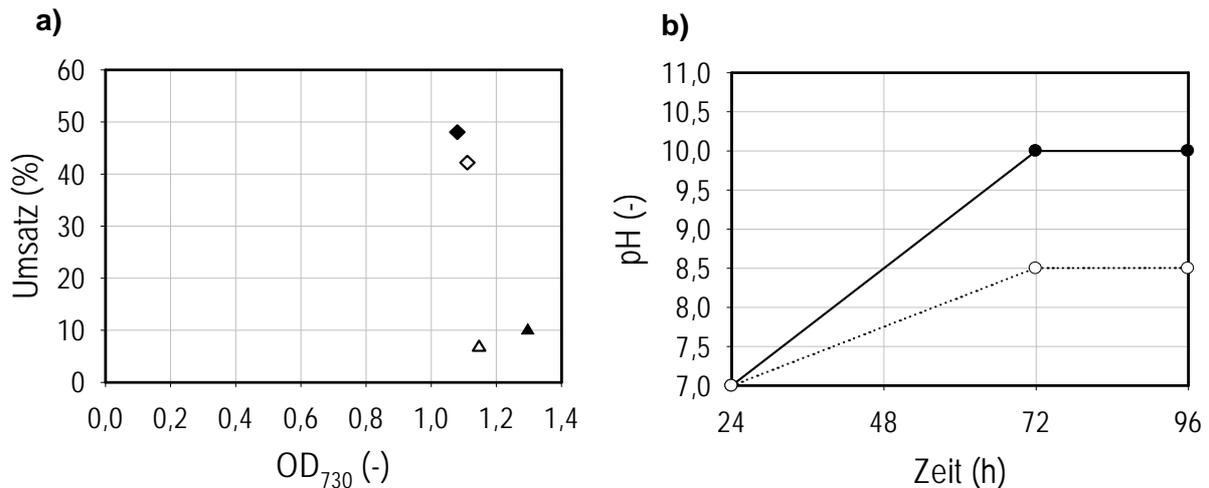
	8te Generation 14 VEGA	Standard BG-11
Umsatz	48 %	9,9 %
OD <sub>730</sub>	1,1	1,29
Zellspezifischer Umsatz ( % L g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> )	161,6	28,4
<b>Salzkonzentration (g L<sup>-1</sup>)</b>		
NaNO <sub>3</sub>	0,15	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,336	0,031
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,255	0,075
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,0576	0,037
Zitronensäure	0,0432	0,006
Ammoniumeisen(III)citrat (18 % Fe)	0,009	0,006
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,116	0,04
<b>Spurenelemente (x 10<sup>-4</sup> g L<sup>-1</sup>)</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	194	28,6
MnCl <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	21,7	18,1
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,888	2,22
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	10,14	3,9
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	3,63	0,79
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0,94	0,49

Innerhalb von acht Optimierungszyklen mit dem VEGA wurde eine Medienzusammensetzung mit einem fünfmal höheren zellspezifischen Umsatz im Vergleich zum BG-11-Medium gefunden (Tabelle 5.11).

### 5.4.3 Validierung ausgesuchter Medien

Das zur Auswahl stehende optimale Medium 14 VEGA (Tabelle 5.11) der achten Generation wurde im Folgenden auf seine Funktionalität in Blasensäulen untersucht. Dazu wurden Versuche in 250 mL Blasensäulen und Validierungsexperimente in gerührten Kolben (Abbildung 5.24) durchgeführt.

Trotz einem höheren Umsatz an PFAP in Blasensäulen fiel der zellspezifische Umsatz im 14-VEGA Medium mit 140,7 % L g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> um 14% schlechter als in 1 mL Reaktoren aus. Dabei konnte festgestellt werden, dass der pH von 14 VEGA mit 8,5 um 1,5 Einheiten deutlich geringer ausfiel als beim Referenzmedium bei nicht-begasteten Systemen.



**Abbildung 5.24:** Vergleich der Zielfunktionen und des pH von Kulturen in Pareto-optimalen Medien.

**a)** Kulturen mit dem optimierten Medium 14 VEGA in 1 mL Reaktoren ( $\diamond$ ) und der Validierung in Blasensäulen bei  $105 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $\blacklozenge$ ). BG-11 Kontrolle in 1 mL Reaktoren ( $\triangle$ ) und Blasensäulen ( $\blacktriangle$ ). **b)** pH bei Kultivierungen in gerührten Kolben mit der BG-11-Referenz ( $\bullet$ ) und mit Medium 14-VEGA ( $\circ$ ) bei  $102 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

#### 5.4.4 Diskussion

Mit Experimenten zur Variation einzelner Medienkomponenten konnte der Suchraum für jede Medienkomponente erfolgreich eingegrenzt werden. Trotz des nur geringen Einflusses von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  auf das Wachstum der Organismen wurde diese Medienkomponente als wichtige Kohlenstoffquelle im Medium beibehalten. Da EDTA als Komplexbildner Effekte durch die Salzkombinationen dämpfen kann, wurde auf diesen verzichtet. Die Auswirkungen der einzelnen Medienkomponenten äußern sich in der Energieladung der Zellen und der Aktivität von unterschiedlichen Aufnahmemechanismen (Badger, 2003). Ferner beeinflussen sie die Synthese osmoregulatorischer intrazellulärer Komponenten und Peroxidmediatoren (Dwivedi *et al.*, 2000). Auf diese Weise spiegeln sie die Grenzwerte der jeweiligen Salzkonzentrationen wider. Die beobachtete Ausbleichung der Zellen ohne Verringerung der optischen Dichte wird als *Chlorosis* bezeichnet. Es handelt sich hierbei um einen Hungerzustand der Zellen, der es ihnen erlaubt, eine entsprechende Nahrungsknappeit zu überdauern (Sauer *et al.*, 1999).

Die bei der Medienoptimierung auftretende Streuung der Daten im gesamten Suchraum ist ein gewünschter Nebeneffekt der evolutionären Optimierung und dient dem Kompromiss zwischen einer schnell konvergierenden Lösung und der Suche nach dem globalen Optimum. Aufgrund dieser Eigenschaften bildet sich mit fortlaufender Optimierung eine im

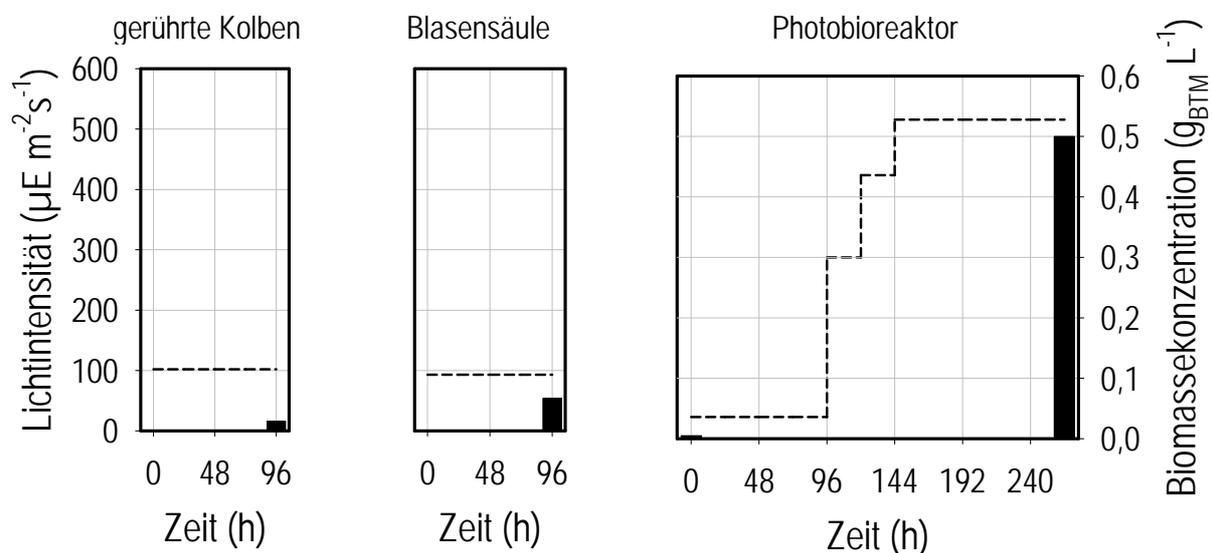
zweidimensionalen Zielfunktionsraum sichtbare virtuelle *Pareto-Front* in der rechten oberen Ecke aus (Abbildung 5.22).

Obwohl dem VEGA mit doppelt so vielen Experimenten eine größere Diversität pro Generation zur Verfügung steht, werden von beiden Algorithmen bereits in der dritten Generation Individuen erzeugt, die in der Nähe der *Pareto-Front* angesiedelt sind.

Trotz einer 14 %iger Abweichung von dem Ergebnis in 1 mL Reaktoren war das Medium 14 VEGA in Blasensäulen erheblich besser als die Referenz. Aus dem deutlich geringeren pH gegenüber der Referenz ist zu schließen, dass die Zusammensetzung des neuen Mediums bessere Puffereigenschaften als das BG-11-Medium besitzt. Das optimierte Medium kann demnach universell in begasten und unbegasten Reaktoren eingesetzt werden.

## 5.5 Optimiertes Anzuchtverfahren zur Kultivierung von *Synechococcus* PCC7942

Aus den vorliegenden Ergebnissen wurde das im Folgenden beschriebene Anzuchtverfahren abgeleitet. *Synechococcus* PCC7942 wird nach einem Impfösenabstrich in 250 mL gerührten Kolben mit einem Arbeitsvolumen 100 mL bei 102 PAR für 96 h inkubiert (Abbildung 5.26).



**Abbildung 5.25:** Schematischer Ablauf der Kultivierung von *Synechococcus* PCC7942 in den drei Kultivierungssystemen: Gerührten Kolben, 250 mL Blasensäulen und 20 L-Rührkesselreaktor. Lichtintensität (---); Biomassekonzentration (■).

Der anschließende Transfer in zwei Blasensäulen erfolgt bei einer Lichtintensität von  $93 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  über 72 h bei  $25^\circ\text{C}$  mit einer initialen Biomassekonzentration von  $1,3 \cdot 10^{-3} \text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$ . Der Transfer in den Rührkesselreaktor wird mit einer Biomassekonzentration von  $1,35 \cdot 10^{-3} \text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$  und einer Anpassungsphase von 96 h bei  $36 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  gestartet. Die weitere Kultivierung erfolgt nach dem optimierten Lichtprofil (Abbildung 5.25). So konnte bislang reproduzierbar eine Biomasse von  $0,5 \text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$  nach einer Kultivierungszeit von 264 h erreicht werden. Die Kultivierung wird dabei in allen Phasen in dem neuen Medium 14 VEGA durchgeführt.

## 6 Asymmetrische Synthese von (S)-1-Pentafluor(phenyl)-ethanol

Den folgenden Experimenten lagen als einzige Referenzen für Biotransformationen mit PFAP zwei Publikationen von Nakamura *et al.* (2000 und 2002a) zugrunde. Es wurde dort beschrieben, dass *Synechococcus* PCC7942 die asymmetrische Synthese von S-1-(Pentafluorphenyl)-ethanol mit einem Enantiomerenüberschuss von > 99 % durchführt. Dabei wurde eine Eduktkonzentration von 5,7 mM in 100 mL Reaktionsvolumen zu 90 % „photobiokatalytisch“ umgesetzt. Die Reaktion dauerte 216 h bei 1000 lux und einer Biomassekonzentration von 0,37 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>.

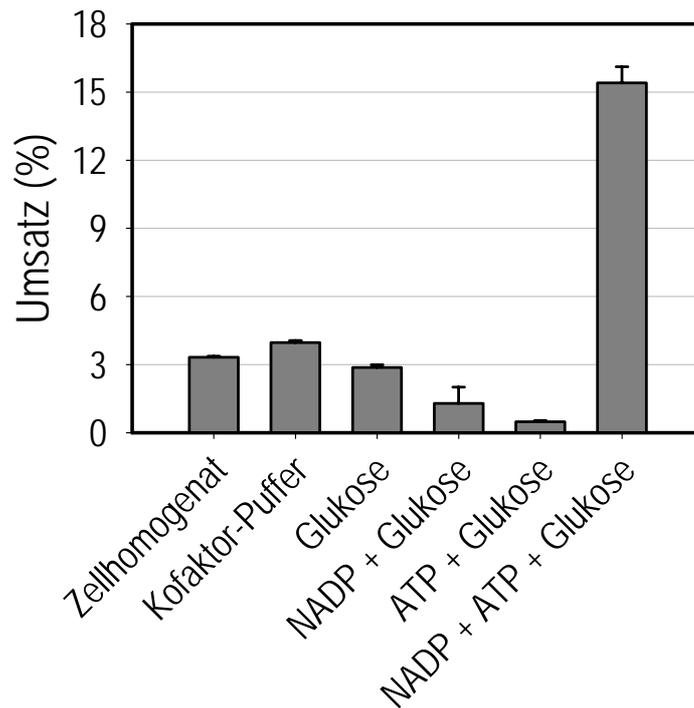
Ziel der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen war die reaktionstechnische Charakterisierung des Biokatalysators. Tiefergehende Untersuchungen beschäftigten sich sowohl mit der Eingrenzung der mit der gesuchten Oxidoreduktaseaktivität in Wechselwirkung stehenden metabolischen Wege, als auch mit der Erforschung alternativer metabolischer Wege, die eine Verwendung von Cyanobakterien in herkömmlichen Rührkesselreaktoren ermöglichen.

### 6.1 *In-vitro* Biotransformation mit Zellhomogenat

Die Funktionsweise der gesuchten Oxidoreduktase war nicht bekannt. Folglich mussten bezüglich der Natur des Kofaktorregenerierungszyklus genauere Informationen gewonnen werden.

#### 6.1.1 Kofaktorregenerierung mit Glukose als Kosubstrat

Aus *in-vitro*-Versuchen von Nakamura *et al.* (2002a) war bekannt, dass eine Biotransformation im Zellhomogenat unter Anwesenheit von 0,05 g L<sup>-1</sup> NADPH erfolgt. Die Frage, ob eine von der Photosynthese unabhängige Kofaktorregenerierung mit *Synechococcus* PCC7942 möglich ist, blieb offen. Durch den Einsatz von ATP, NADP<sup>+</sup> und Glukose als Kosubstrat konnte im Zellhomogenat die Regenerierung des Kofaktors NADPH eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 6.1).



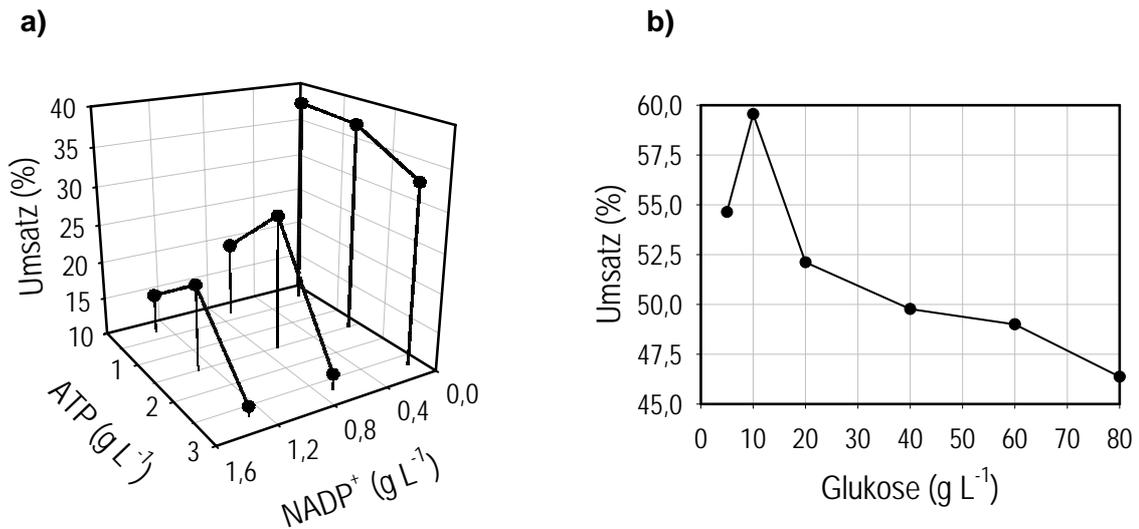
**Abbildung 6.1:** Umsatz von PFAP im Zellhomogenat von *Synechococcus* PCC7942 in Abhängigkeit verschiedener Effektoren.  $7,3 \text{ g L}^{-1}$  Zellhomogenat wurde wahlweise mit  $4,4 \text{ g L}^{-1}$  Glukose,  $11,5 \text{ g L}^{-1}$  ATP,  $2,4 \text{ g L}^{-1}$  NADP<sup>+</sup> und Stabilisierungspuffer für Kofaktoren (100 mM Triethanolamin-Puffer pH 7,6) bei  $20^\circ\text{C}$ ,  $600 \text{ min}^{-1}$ ,  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 24 h inkubiert.

### 6.1.2 Optimierung der *in-vitro*-Biotransformation

Um die benötigten Kofaktoren und das Kosubstrat Glukose möglichst effizient einzusetzen, wurde die Stöchiometrie der beteiligten Komponenten untersucht (Abbildung 6.2).

Ein relatives Maximum der Umsetzung war mit  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  ATP bei jeder Konzentration an NADP<sup>+</sup> zu beobachten. Die Menge an NADP<sup>+</sup> zeigte einen 40 % höheren Einfluss auf den Umsatz als die Menge an ATP. Beste Ergebnisse erzielte eine Kombination von  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  ATP und  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  NADP<sup>+</sup> (Abbildung 6.2a).

Mit zunehmender Glukosekonzentration nahm der Umsatz ausgehend vom Maximum mit 60 % ( $10 \text{ g L}^{-1}$  Glukose) ab (Abbildung 6.2b).



**Abbildung 6.2:** Abhängigkeit des Umsatzes **a)** vom Verhältnis der Kofaktoren ATP und NADP<sup>+</sup> mit 10 g L<sup>-1</sup> Glukose und **b)** von der eingesetzten Glukosekonzentration bei 0,3 g L<sup>-1</sup> ATP und 0,1 g L<sup>-1</sup> NADP<sup>+</sup>. Reduktion von 2,82 mM PFAP bei 20°C, 600 min<sup>-1</sup>, 0 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> für 24 h. Verbindungslinien dienen der Visualisierung

### 6.1.3 Diskussion

Im Einklang mit den Untersuchungen zur Kofaktorabhängigkeit von Nakamura *et al.* (2002a) arbeitet die Oxidoreduktase entkoppelt von der Photosynthese, wird jedoch von dieser vermutlich mit Reduktionsäquivalenten versorgt. Der Nachweis einer Kofaktorregenerierung im Dunkeln eröffnete eine gänzlich neue Möglichkeit zur Nutzung von Enzymen aus Cyanobakterien in Rührkesselreaktoren. In der Literatur wurde keine Referenz gefunden, die eine Biokatalyse mit obligat photoautotrophen Organismen ohne Licht beschreibt.

Der Oxidoreduktase kann durch Zusatz von Glukose und ATP regeneriertes NADP<sup>+</sup> zugeführt werden. Ohne oxidativen Abbau über den Citratzyklus (Smith *et al.*, 1967; Pearce *et al.*, 1969; Stal, 1992) sind die beschrifteten Stoffwechselwege der Pentosephosphatweg (Pelroy und Bassham, 1972; Matthijs und Lubberding, 1988) oder eine Fermentation, die sich Abschnitten der Glykolyse anschließt (Stal und Moezelaar, 1997). Beide Wege benötigen ATP um Edukte für eine NADP<sup>+</sup> regenerierende Reaktion zu liefern.

Die gemessenen distinkten relativen Maxima des Umsatzes durch die Zusammensetzung an ATP und NADP<sup>+</sup> für die Kofaktorregenerierung (Abbildung 6.2a), deuten auf regulatorische Mechanismen des Stoffwechsels hin, wie sie bei der Regelung des Pentosephosphatweges oder der Glykolyse angetroffen werden. Im Pentosephosphatweg ist die Konzentration an NADP<sup>+</sup> der wichtigste Regulator der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, da die oxidierte und die reduzierte Form von NADP um die Bindungsstelle konkurrieren. Im Falle der

Glykolyse ist die 6-Phosphofruktokinase durch die Verfügbarkeit von ATP gesteuert (Stryer, 1996). Eine Kombination beider Phänomene ist nicht auszuschließen.

Für weiterführende Experimente wurde das *In-vitro*-Ketonreduktionssystem aus einer Mischung von  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  ATP,  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  NADP<sup>+</sup> und  $10 \text{ g L}^{-1}$  Glukose zusammengesetzt.

## 6.2 Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Ganzzellbiokatalyse

Im Folgenden werden die Auswirkungen verschiedener Umweltbedingungen auf die Ganzzellbiokatalyse mit *Synechococcus* PCC7942 beschrieben.

### 6.2.1 Löslichkeitsverhalten

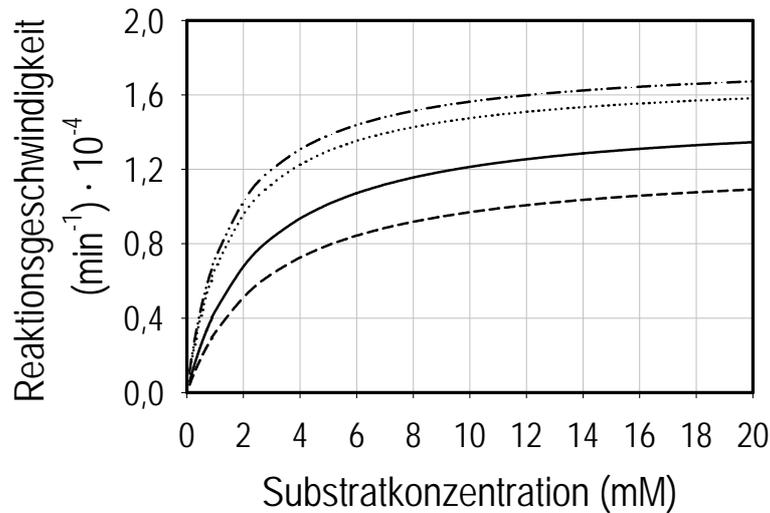
Die Nutzung der Biotransformation von PFAP setzte Kenntnisse über die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Stoffsystems im eingesetzten Reaktionssystem voraus. Löslichkeitsuntersuchungen zeigten, dass PFAP in BG-11-Medium maximal zu 2,8 mM und S-PFE bzw. R-PFE zu 15 mM löslich sind. Der hohe Dampfdruck des Ketons führte zu Bilanzlücken in der Analyse. Durch Wahl eines gasdichten Reaktionssystems, konnten nach der Umsetzung alle Substanzen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

### 6.2.2 Licht

Die Ergebnisse der Kofaktorregenerierung eröffneten die Möglichkeit einer Ganzzellbiotransformation mit Glukose als Cosubstrat im Medium. Voraussetzung dafür war eine Verwertung zellexterner Glukose. Hierzu wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten (hell, dunkel, mit und ohne Glukose) vergleichend untersucht und die kinetischen Parameter einer Sättigungskinetik identifiziert (Tabelle 6.1 und Abbildung 6.3).

**Tabelle 6.1:** Ermittelte kinetische Parameter der Ganzzellbiokatalyse

Bedingung	$v_{\max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	Biomasse bezogenes $v_{\max}$ ( $\mu\text{mol L g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)
Dunkel ohne Glukose	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$	1,5
Hell ohne Glukose	$1,71 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^{-4}$	1,57
Hell mit Glukose	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-4}$	2,46
Dunkel mit Glukose	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$1,9 \cdot 10^{-4}$	2,88



**Abbildung 6.3** Darstellung der ermittelten Sättigungskinetiken in Abhängigkeit von Licht ( $42 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) und Glukose ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ). Dunkel ohne Glukose(— . ), hell ohne Glukose (.....), dunkel mit Glukose (-.-), hell mit Glukose (—). Biomassekonzentration  $0,67 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ .

Es wurde eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von  $1,8 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  mit einem  $K_m$  von  $1,5 \text{ mM}$  in der Dunkelreaktion ohne Glukose gemessen.

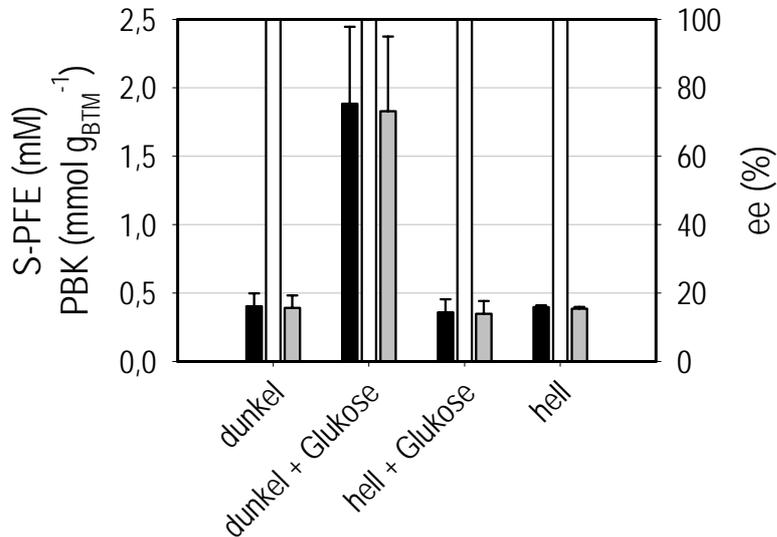
Die Kofaktorbereitstellung für die Ketonreduktion war folglich im Dunkeln um 5 % besser als durch die Photosynthese. Die Reaktionen mit externer Glukose waren um 15 - 29 % langsamer als Reaktionen ohne externe Glukose.

### 6.2.3 Glukose

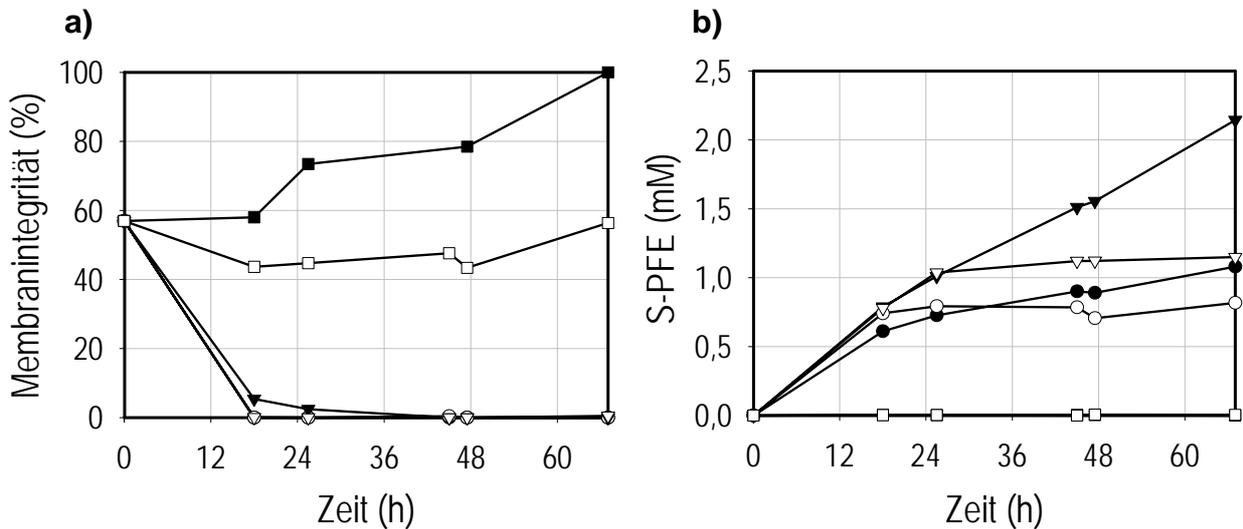
Neben den kinetischen Untersuchungen wurde auch der Einfluss von Glukose auf die Produktbildungskapazität, den Enantiomerenüberschuss und die Lebensfähigkeit der Zellen untersucht. Im Parallelansatz konnte bei der Biotransformation im Dunkeln mit Glukose eine mittlere Produktbildungskapazität von  $1,82 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$  für S-PFE gemessen werden (Abbildung 6.4). Die Ergebnisse aller anderen Bedingungen fielen mit durchschnittlich  $0,37 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$  um 80 % geringer aus. Die Enantiomerenüberschüsse waren bei allen Bedingungen  $> 99,8 \%$ .

Untersuchungen der Membranintegrität bei Biotransformationen zeigten eine Desintegration der Zellmembran innerhalb von 16 h (Abbildung 6.5a). Reaktionsansätze ohne Licht mit Glukose besaßen eine geringe Membranintegrität von 5 %.

Reaktionen ohne Glukose produzierten bis zu diesem Zeitpunkt 32 % weniger Produkt (Abbildung 6.5b). Bei einer Reaktion im Dunkeln mit Glukose konnte eine konstante Produktbildungsrate von  $0,03 \text{ mM h}^{-1}$  beobachtet werden.



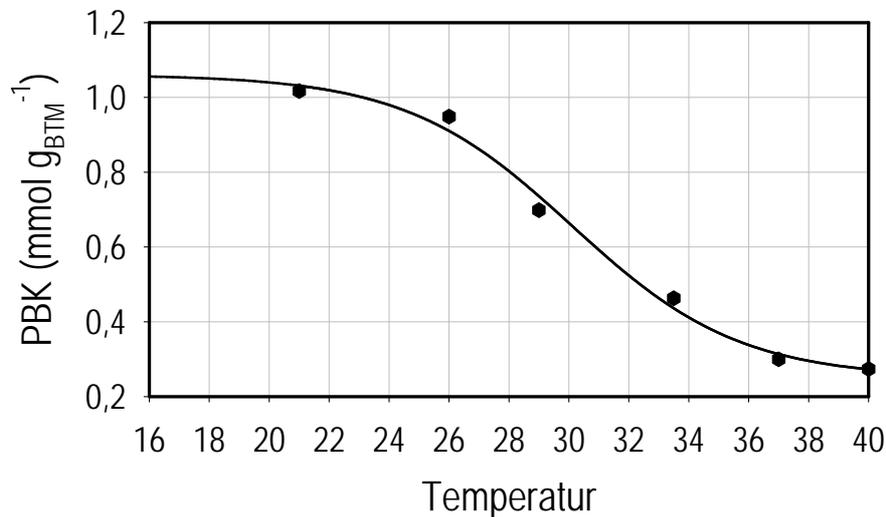
**Abbildung 6.4:** Umsetzungen mit *Synechococcus* PCC7942 bei unterschiedlichen Lichtintensitäten mit und ohne Glukose. Gebildete Konzentration an S-PFE (■); Produktbildungskapazität (▨) und gemessener Enantiomerenüberschuss (□). Reaktion bei  $0$  und  $42 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  sowie  $10 \text{ g L}^{-1}$  Glukose über  $216 \text{ h}$  mit  $1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  bei  $20^\circ\text{C}$  im  $1 \text{ mL}$  Reaktorsystem.



**Abbildung 6.5:** **a)** Membranintegrität von *Synechococcus* PCC7942. **b)** Verlauf der gebildeten Produktkonzentrationen. Reaktionen bei  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ohne Glukose (●) mit Glukose (▼), Reaktionen bei  $102 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ohne Glukose (○) mit Glukose (▽). Kontrollkulturen ohne Glukose bei  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (■) und  $102 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (□).  $100 \text{ mL}$  gasdichte Reaktoren mit  $0,48 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ . Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

### 6.2.4 Temperatur

Der Temperatureinfluss auf die Ketonreduktion wurde in 100 mL gasdichten Reaktoren untersucht. Es konnte eine funktionale Abhängigkeit der Produktbildungskapazität von der Temperatur ermittelt werden (Abbildung 6.6).



**Abbildung 6.6:** Temperaturabhängigkeit der Ganzzellbiokatalyse von *Synechococcus* PCC7942. Gemessene Werte (●); Temperaturfunktion (—). Reaktion bei 21; 26; 29; 33,5; 37 und 40°C bei 180 min<sup>-1</sup> über 264 h.

Mit steigender Temperatur nimmt die Produktbildungskapazität deutlich ab. Ihr Verlauf konnte mit Gleichung 6.1 empirisch beschrieben werden.

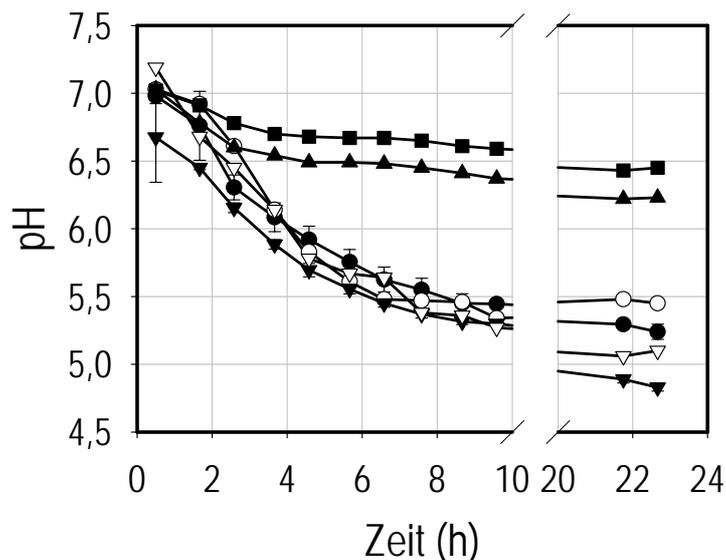
$$\text{Gleichung 6.1: } PBK_{(T)} = 0,2502 \text{ mmol g}_{BTM}^{-1} + \frac{0,8108 \text{ mmol g}_{BTM}^{-1}}{1 + e^{\frac{(T-30,12^\circ\text{C})}{(-2,788^\circ\text{C})}}}$$

Mit  $PBK_{(T)}$  Temperaturabhängige Produktbildungskapazität, mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>  
 $T$  Temperatur, °C

Das beste Ergebnis ist bei ca. 20°C zu erwarten.

### 6.2.5 pH

Wie bereits in Kapitel 5.1.3 beschrieben, steigt während der Kultivierung von *Synechococcus* PCC7942 im Satzverfahren der pH stark an. Um kritische pH-Überschreitungen zu verhindern, war es erforderlich festzustellen, wie sich der pH bei der Biotransformation verändert. Die Untersuchungen wurden im 100 mL gasdichten Reaktorsystem mit einer *online*-pH Messung durchgeführt (Abbildung 6.7).



**Abbildung 6.7:** Verlauf des pH während der Biotransformation von 20 mM PFAP mit *Synechococcus* PCC7942. Reaktion bei  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ohne Glukose (●) und mit Glukose (▼) sowie bei  $102 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ohne Glukose (○) als auch mit Glukose (▽). Kontrolle ohne Substrat (■) mit Glukose (▲). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

Während Kontrollreaktionen ohne Substrat auf einem pH von ca. 6,5 verweilten, sank der pH für alle Reaktionen mit Substrat unabhängig von den Lichtverhältnissen um zwei Einheiten. Er pendelte sich nach 9,5 h auf pH 5,3 ein. Nach 22 h war der pH von Reaktionen mit Glukose um 0,5 Einheiten geringer als ohne Glukose. Im Vergleich mit Kontrollreaktionen ist der pH innerhalb von 10 Stunden um eine zusätzliche Einheit gefallen.

### 6.2.6 Diskussion

Das Löslichkeits- und Verdunstungsverhalten von PFAP lässt darauf schließen, dass die publizierten Daten von Nakamura *et al.* (2000) fehlerhaft sind. Seine Experimente wurden nicht in gasdichten Reaktoren durchgeführt. Dies führt durch Verdunstung von Substrat zu Bilanzlücken bei der Auswertung der stöchiometrischen Ausbeute. Erfolgt die Berechnung auf Basis der gemessenen Daten, so ergibt sich zwangsläufig das publizierte Ergebnis von einer stöchiometrischen Ausbeute von 90 %. Folglich sind die publizierten Ausbeuten von Nakamura als Referenz für eine Prozessentwicklung unbrauchbar. Sowohl die Randbedingungen der publizierten Daten als auch alle Messwerte müssen in Frage gestellt werden und durch unabhängige Versuche überprüft werden.

Aufgrund der geringen Löslichkeit des Substrates (2,8 mM) sowie des Produktes (15 mM) im BG-11-Medium wäre es sinnvoll für hohe Raum-Zeit-Ausbeuten Löslichkeitsvermittler für

hohe Substrat- und Produktkonzentrationen einzusetzen. Eine Alternative ist eine Prozessführung mit 2-Phasensystemen (Eckstein *et al.*, 2004).

Im Bezug auf den Verlauf des pH während Biotransformationen konnte eine zunehmende Ansäuerung des Mediums beobachtet werden. Hohe Zelldichten bedingen eine starke Respiration. Die Eindringtiefe des Lichts ist so gering, dass es kaum zur Photosynthese beiträgt (Cheng, 1996; Tredici, 1999). Bei Sauerstoffverknappung ist eine fermentative Energiebereitstellung die Folge (Stal und Moezelaar, 1997). Der ersichtlich steiler abfallende pH aller Kulturen mit Edukt, unabhängig von Glukose und Licht, deutet auf eine fermentative Biotransformation hin.

In Bezug auf die Lebensfähigkeit der Zellen bei Biotransformationen wird eine Desintegration der Zellmembran festgestellt. Gradientengebundene, energiebereitstellende Prozesse an Membranen wie die Photosynthese und die Respiration werden folglich außer Funktion gesetzt.

Neben dem Pentosephosphatweg stehen fermentative Wege über die Glykolyse zur Verfügung. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Enzyme der Glykolyse in Cyanobakterien sind geringer als diejenigen in heterotrophen Organismen (Stal und Moezelaar, 1997). Dies würde erklären, weshalb die Reaktionsgeschwindigkeiten der Biotransformation nicht höhere Werte erreichen. Die Abhängigkeit des Kofaktorregenerierungssystems von Glukose, ATP und NADP<sup>+</sup> lässt einen Stofffluss von Glukose bzw. Glukose-6-Phosphat aus Stärke durch die Glykolyse vermuten.

Die kinetischen Daten der Biotransformation mit *Synechococcus* PCC7942 belegen, dass die Dunkelreaktion in der gleichen bzw. einer schnelleren Geschwindigkeit abläuft als die Geschwindigkeit der Lichtreaktion. Höhere Reaktionsgeschwindigkeiten der Biotransformation im Dunkeln ohne Glukose gegenüber Reaktionen mit Glukose lassen bei Dunkelreaktion auf den Verbrauch eines internen Energieträgers schließen. Die Rolle der Glukose bezüglich des Metabolismus bleibt ungeklärt. Sie äußert sich durch geringere Reaktionsgeschwindigkeiten und eine konstante Produktbildungsrate nach der Lyse der Zellen. Dies lässt auf eine unbekannt Interaktion mit den energiebereitstellenden Stoffwechselwegen schließen.

Da die Lichtreaktion Reduktionsäquivalente deutlich schneller bereit stellt als die Dunkelreaktionen (Nakamura *et al.*, 2002b; Stal und Moezelaar, 1997), ist davon auszugehen, dass die Reduktionsäquivalente der Photosynthese nicht genutzt werden. Ferner inhibiert bei Licht reduziertes Ferredoxin die 6-Phosphofruktokinase der Glykolyse, mit der Folge einer möglicherweise gehemmten Energiebereitstellung (Michal, 1999). Eine Hemmung der Photosynthese und Respiration bei gleichzeitiger Inaktivierung der Glykolyse ist auch zu Beginn der Reaktion aufgrund der gemeinsamen Elektronentransportkette

anzunehmen (Peschek und Schmetterer, 1982). Sie wäre von der Kulturdichte und der damit verbundenen Verschattung abhängig.

Trotz der geringeren Geschwindigkeit der Umsetzungsreaktionen mit Glukose, kann bei ihrer Anwesenheit eine 80 % erhöhte Produktbildung beobachtet werden. Glukose hat folglich neben ihrem Einfluss auf den Metabolismus einen unbekannt stabilisierenden Effekt auf die Zellmembran.

Bezogen auf Biotransformationen mit *Synechococcus* PCC7942 wurde für die Reduktion von  $\alpha$ - $\alpha$ -Difluoracetophenon ein Einfluss von Licht auf die Stereoselektivität beschrieben (Nakamura und Yamanka, 2002b). Dieser Einfluss konnte auf den Enantiomerenüberschuss der Biotransformation von PFAP nicht festgestellt werden. Zugleich sind die gemessenen Produktbildungskapazitäten für S-PFE der Biotransformation im Dunkeln im Satzverfahren bei 20°C mit 1,82 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> im Größenbereich der Produktbildungskapazitäten von Photobiokatalysen mit publizierten Werten von 2 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> (Nakamura *et al.*, 2002a).

Bezogen auf das Temperaturoptimum ist für die Enzyme von *Synechococcus* PCC7942 ein Temperaturbereich von 35 – 40 °C publiziert (Rouillon *et al.*, 1999). Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Umsetzung von *Synechococcus* PCC7942 mit steigender Temperatur abnimmt. Dieses Phänomen kann mit der Oxigenaseaktivität der Rubisco erklärt werden, die auch für die Photorespiration verantwortlich ist. Mit steigender Temperatur setzt diese Funktion der Rubisco, die eigentlich als Schutzmechanismus der Photosysteme dient, ein und verbraucht Reduktionsäquivalente (Nultsch, 1996). Dieser Effekt ist temperaturabhängig (Pulz, 2001). Entsprechend der Temperaturfunktion bringen Temperaturen < 20°C keine deutliche Steigerung in der Produktbildungskapazität und sind aufgrund der zunehmenden Inaktivierung von Cyanobakterien bei Temperaturen < 18°C für einen Prozess mit ganzen Zellen irrelevant.

Folglich ist ein Prozess bei 20°C in einem konventionellen Rührkesselreaktor möglich. Die Biotransformation arbeitet ohne Licht schneller und zeigt keine Einbußen in der Stereoselektivität (Tabelle 6.2).

**Tabelle 6.2:** Zusammenfassung der identifizierten Reaktionsbedingungen

Bedingung	Wert
<b>Beste Reaktionsbedingungen:</b>	
Licht	0 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Glukose	10 g L <sup>-1</sup>
Temperatur	20°C
<b>Ergebnisse:</b>	
Enantiomerenüberschuss	> 99,8 %
Produktbildungskapazität	1,82 mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup>
pH	> 6
Membranintegrität	< 16 h

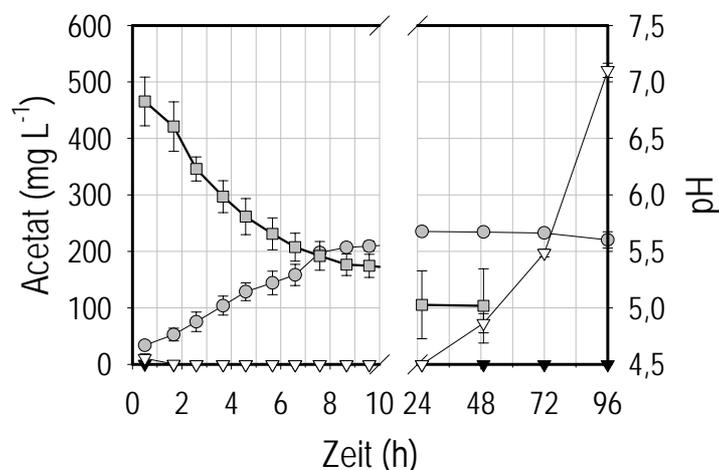
### 6.3 Metabolische Untersuchungen der Biotransformation mit ganzen Zellen

Im Folgenden sind die Ergebnisse zum Nachweis einer potentiellen Fermentation bei Reaktionen im Dunkeln zusammengefasst.

#### 6.3.1 Nachweis einer fermentativen Biotransformation

Der Nachweis des potentiellen Fermentationsproduktes Acetat erfolgte in 100 mL gasdichten Reaktoren. Hierfür wurde über den gesamten Zeitraum der pH, die Produktkonzentration sowie die Konzentrationen von Acetat und von Glukose im Medium verfolgt (Abbildung 6.8).

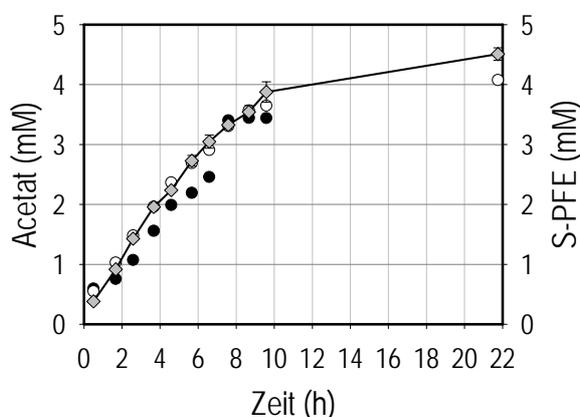
Der Verlauf der Ansäuerung des Reaktionsmediums war direkt proportional zur Bildung von



**Abbildung 6.8:** Verlauf der mittleren Acetatkonzentrationen bei Reduktion von PFAP zu S-PFE mit Glukose und ohne Glukose (●) und des mittleren pH (□). Kontrollreaktionen mit Glukose (▽) und ohne Glukose (▼). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

Acetat und erreichte nach 24 h mit pH 5 einen konstanten Wert. Nach diesem Zeitpunkt wurde keine weitere Produktbildung beobachtet. Die Kontrolle mit Glukose zeigte eine enorme Acetatproduktion nach 24 h. Die Ergebnisse belegten eine fermentative Umsetzung unter Bildung von Acetat. Dabei korrespondierte die gebildete Menge an Acetat stöchiometrisch mit den gemessenen Konzentrationen an Produkt (Abbildung 6.9).

Die Ergebnisse der Biotransformationen fasst Tabelle 6.3 zusammen. Umgerechnet entspräche die Menge an gebildetem Acetat einem Äquivalent von  $0,37 \text{ g L}^{-1}$  Glukose. Messungen der Glukosekonzentration belegten, dass die extern vorliegende Glukose ungenutzt blieb (Daten nicht gezeigt). Entsprechend den Ergebnissen der Membranintegrität in Kapitel 6.2.3 verlor *Synechococcus* PCC7942 bei der Biotransformation von PFAP innerhalb von 24 h seine Teilungsfähigkeit (Anhang 12.5.1).



**Abbildung 6.9:** Vergleich der mittleren gebildeten Konzentration an S-PFE (◆) der Reaktionen mit *Synechococcus* PCC7942 mit der mittleren Acetatkonzentration mit Glukose (○) und ohne Glukose (●). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

**Tabelle 6.3:** Ergebnisse der metabolischen Untersuchung nach 24 h

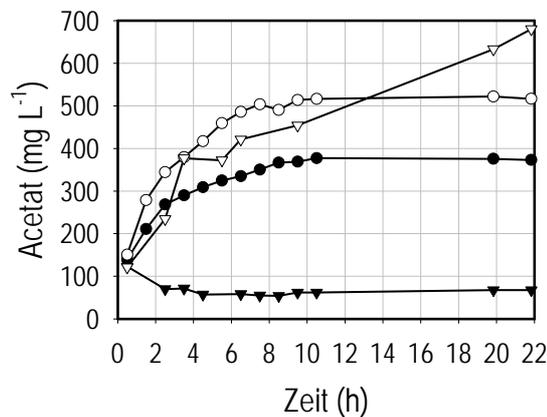
Bedingungen	Wert
Biomassekonzentration	$10,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$
Konzentration an S-PFE	4,51 mM
Enantiomerenüberschuss	> 99,8 %
Produktbildungskapazität	$0,43 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$
Acetat durch Fermentation	$0,24 \text{ g L}^{-1}$
pH	5

### 6.3.2 Vergleichende Studie zur Fermentation in unterschiedlichen Cyanobakterienstämmen

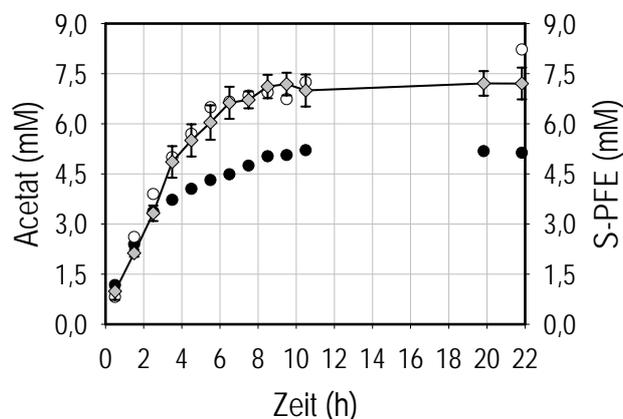
Vergleichende Studien zu den Ergebnissen von Kapitel 6.3.1 wurden mit den Stämmen *Nostoc muscorum* und *Anabaena variabilis* durchgeführt.

Sowohl bei Anwesenheit von Glukose als auch von Keton im Medium wurden bei *Nostoc muscorum* und *Anabaena variabilis* Fermentationen unter Freisetzung von Acetat beobachtet (Abbildung 6.10 und 6.12).

Die Biotransformationen kamen bei *Nostoc muscorum* mit einer mittleren Produktkonzentration von 7,2 mM zum Stillstand (Abbildung 6.11). Die zu Beginn der Reaktion gemessen 120 mg L<sup>-1</sup> Acetat (Abbildung 6.10) sind auf die Zellpräparation zurückzuführen und waren bereits im Medium vorhanden.



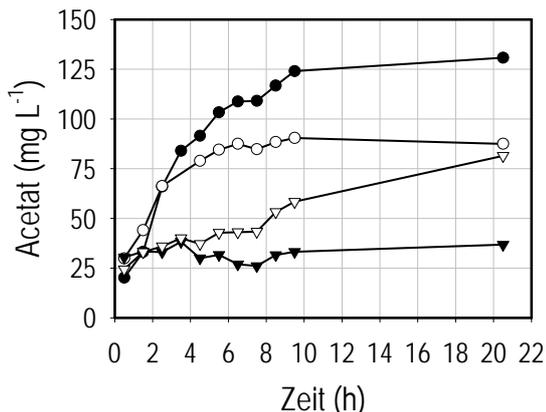
**Abbildung 6.10:** Acetatkonzentrationen bei Reduktion von PFAP zu S-PFE mit *Nostoc muscorum* mit Glukose (○) und ohne Glukose (●) im Vergleich zu Kontrollreaktionen ohne Keton mit Glukose (▽) und ohne Glukose (▼). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.



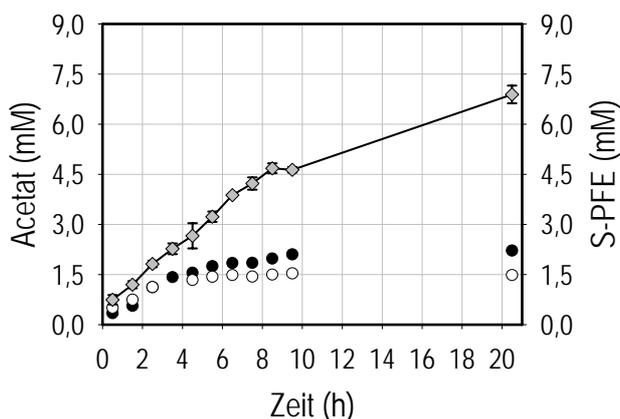
**Abbildung 6.11:** Vergleich der gebildeten mittleren Konzentration an S-PFE (◇) durch Reduktion mit *Nostoc muscorum* mit gebildeten Acetatkonzentrationen (Werte sind um den Grundgehalt an Acetat im Medium bereinigt) mit Glukose (○) und ohne Glukose (●). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

Die gebildete Konzentration an Acetat im Reaktionsansatz mit Glukose verhielt sich stöchiometrisch zu der Konzentration an S-PFE (Abbildung 6.11). Der Reaktionsansatz ohne Glukose zeigte nach 3,5 h durchschnittliche Diskrepanzen von 29-33 % zwischen der Konzentration von S-PFE und Acetat.

Bei *Anabaena variabilis* konnte die gebildete Konzentration an Acetat mit den gemessenen Konzentrationen an Produkt nicht zur Deckung gebracht werden (Abbildungen 6.13). Die Ergebnisse der metabolischen Untersuchung sind in Tabelle 6.4 zusammengefasst.



**Abbildung 6.12:** Acetatkonzentrationen bei Reduktion von PFAP zu S-PFE mit *Anabaena variabilis* mit Glukose (○) und ohne Glukose (●) im Vergleich zu Kontrollreaktionen ohne Keton mit Glukose (▽) und ohne Glukose (▼). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.



**Abbildung 6.13:** Vergleich der gebildeten mittleren Konzentration an S-PFE (◆) durch Reduktion mit *Anabaena variabilis* mit gebildeten Acetatkonzentrationen (Werte sind um den Grundgehalt an Acetat im Medium bereinigt) mit (○) und ohne Glukose (●). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

**Tabelle 6.4:** Ergebnisse der metabolischen Untersuchung nach 24 h

Bedingungen	<i>Anabaena variabilis</i>	<i>Nostoc muscorum</i>	<i>Synechococcus PCC7942</i>
Biomassekonzentration	54,4 g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup>	29,1 g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup>	10,4 g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup>
Konzentration an S-PFE	6,93 mM	7,20 mM	4,51 mM
Enantiomerenüberschuss	> 99,8 %	> 99,8 %	> 99,8 %
Produktbildungskapazität	0,13 mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup>	0,25 mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup>	0,43 mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup>
Acetat durch Fermentation	0,09-0,13 mg L <sup>-1</sup>	0,37-0,52 g L <sup>-1</sup>	0,24 g L <sup>-1</sup>
Fermentationsstillstand	9,5 h	7,5 h	10 h

Glukose zeigte bei beiden Stämmen keinen Einfluss auf die gebildete Menge an Produkt. In einer mikroskopischen Untersuchung wiesen Reaktionsansätze mit Glukose Zellverbände auf, während in Reaktionsansätzen ohne Glukose teilweise nur noch Einzelzellen nachgewiesen werden konnten (Anhang 12.5.4). Beide Stämme verloren ihre Teilungsfähigkeit analog *Synechococcus* PCC7942 innerhalb der ersten 24 h (Anhang 12.5.2-3).

### 6.3.3 Diskussion

Alle untersuchten Stämme bilden Acetat aufgrund der Biotransformation. Die dabei hergestellten Konzentrationen an S-PFE sind stammabhängig (Tabelle 6.4). Es ist folglich anzunehmen, dass analog *Synechococcus* PCC7942 eine Permeabilisierung der Zellmembran stattfindet. Die veränderte Morphologie der heterozystischen Cyanobakterien bestätigt diese Annahme und erklärt den Verlust der Teilungsfähigkeit.

Die Kontrollreaktion ohne Biotransformation mit Glukose im Medium belegt, dass bei *Synechococcus* PCC7942 bei einer Biomassekonzentration von 10,4 g L<sup>-1</sup> im gasdichten 100 mL Reaktor erst nach 24 h eine Fermentation einsetzt. Bis zu diesem Zeitpunkt bezieht der Organismus seine Energie bei ausreichend vorhandenem Sauerstoff aus der Respiration und einem nicht bestimmten Fermentationsweg, da eine deutliche Ansäuerung des Mediums vor Ablauf der 24 h festgestellt wird (Abbildung 6.7). Da fermentative Enzyme konstitutiv exprimiert und auch heterofermentative Fermentationswege in Cyanobakterien beschrieben werden (Oren und Shilo, 1979; Moezelaar und Stal, 1994; Moezelaar *et al.*, 1996), besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass weitere Gärprodukte wie Lactat, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, Formiat oder Ethanol produziert werden (Stal und Moezelaar, 1997).

Die Korrelation von Acetatakkumulation und Bildung von S-PFE bei *Synechococcus* PCC7942 belegt, dass die gesamte reduktive Kraft der Biotransformation aus der Acetatgärung bezogen wird. Die Glukose im Medium hat, neben einem stabilisierenden Effekt auf die Zellmembran, nur einen geringen Einfluss auf die gebildete Menge an Acetat. Reaktionen ohne Anwesenheit von Glukose zeigen weitgehend deckungsgleiche Verläufe mit den Produktkonzentrationen.

Analog den Erkenntnissen der kinetischen Untersuchungen steht der Reaktion ein anderer, unbekannter Energieträger als Glukose zur Verfügung. Es könnte sich bei ihm um gespeichertes Glykogen aus den Thylakoiden handeln, das über Phosphorylasen der Glykolyse in Form von Glukosephosphat schneller zugänglich gemacht wird als über Hexokinasen. Diese Hypothese wird durch die Korrelation der Produktbildungskapazität mit dem spezifischen Kohlenhydratgehalt gestützt (Kapitel 5.3.5). Die Hexokinasen in Cyanobakterien weisen nur sehr geringe Enzymaktivitäten auf (Stal und Moezelaar, 1997). Dies würde erklären, warum Glukosemonomere weitgehend ungenutzt bleiben.

Aufgrund eines Algentoxizitätswert für 50 % Hemmung  $EC_{50} \geq 8,4 \text{ mg L}^{-1}$  für nicht neutralisierte Säuren (Römpp, 2006), einer sehr niedrigen Produktbildungskapazität von  $0,13 - 0,43 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$  und ungenutzter Glukose im Medium wird eine Inaktivierung der Kofaktorregenerierung oder der Oxidoreduktase durch toxische Konzentrationen von Acetat angenommen.

Fermentationswege von Cyanobakterien sind bislang nur für symbiotische Arten im Detail aufgeklärt worden. Darunter befinden sich Arten der Gattung *Nostoc* und *Anabaena*, bei denen bislang nur Homoacetatgärung mit unterschiedlichen Mengen an Nebenprodukten wie Lactat,  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  beschrieben wurde. Für diesen Fermentationsweg spielt das Enzym Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase eine zentrale Rolle. Es setzt eine Interaktion mit einer Ferredoxin oxidierenden Hydrogenase voraus (Stal und Moezelaar, 1997). Ergebnisse von Biotransformationen mit *Nostoc muscorum* und *Anabaena variabilis* verdeutlichen, dass die Mengen an gebildetem Acetat sehr unterschiedlich ausfallen. Folglich werden unterschiedliche Fermentationswege bei Biotransformationen stammabhängig besprochen.

Bei *Nostoc muscorum* als photoheterotropher Organismus aktiviert Glukose eine unbekannte Funktion, durch die das gesamte NADPH aus der Acetatgärung in der Biotransformation genutzt wird. Dem gegenüber stammen in Reaktionsansätzen ohne Glukose nur 70 % des regenerierten NADPH aus der Acetatgärung. Selbst bei einer Fehlerannahme von 10 % des Analysesystems ergibt sich eine Bilanzlücke von 20 %. Die Reduktionsäquivalente müssen folglich aus einer anderen Quelle stammen. Es wird vermutet, dass Cyanobakterien Fermentationswege über Kontrollmetabolite durch Aktivierung und Inhibierung von Enzymen

steuern (Stal und Moezelaar, 1997). Ein derartiger Metabolit scheint Glukose bei *Nostoc muscorum* zu sein.

Bei *Anabaena variabilis* als photoautotropher Organismus nimmt die Bilanzlücke mit fortschreitender Biotransformation zu. Sowohl in *Nostoc muscorum* als auch in *Anabaena variabilis* könnte diese durch den Pentosephosphatweg oder durch einen heterofermentativen Gärungsweg geschlossen werden (Stal und Moezelaar, 1997).

### **6.4 Ganzzellbiotransformation in 2-Phasensystemen**

Die in Kapitel 6.2.1 vorgestellten Löslichkeiten von Substrat und Produkt von 2,8 und 15 mM machen einen Prozess mit hoher Raum-Zeit-Ausbeute nur mit einer kontinuierlichen Produktabtrennung möglich. In diesem Teil der Arbeit wird untersucht, ob 2-Phasensysteme mit Cyanobakterien sinnvoll eingesetzt werden können. Die Versuche wurden ohne Beleuchtung durchgeführt, da ein industrieller Prozess nur so zweckmäßig realisierbar ist. Als Maß für die Biokompatibilität der zweiten Phase diente ein Membranintegritätstest.

#### **6.4.1 Lebensfähigkeit ganzer Zellen mit organischen Lösungsmitteln**

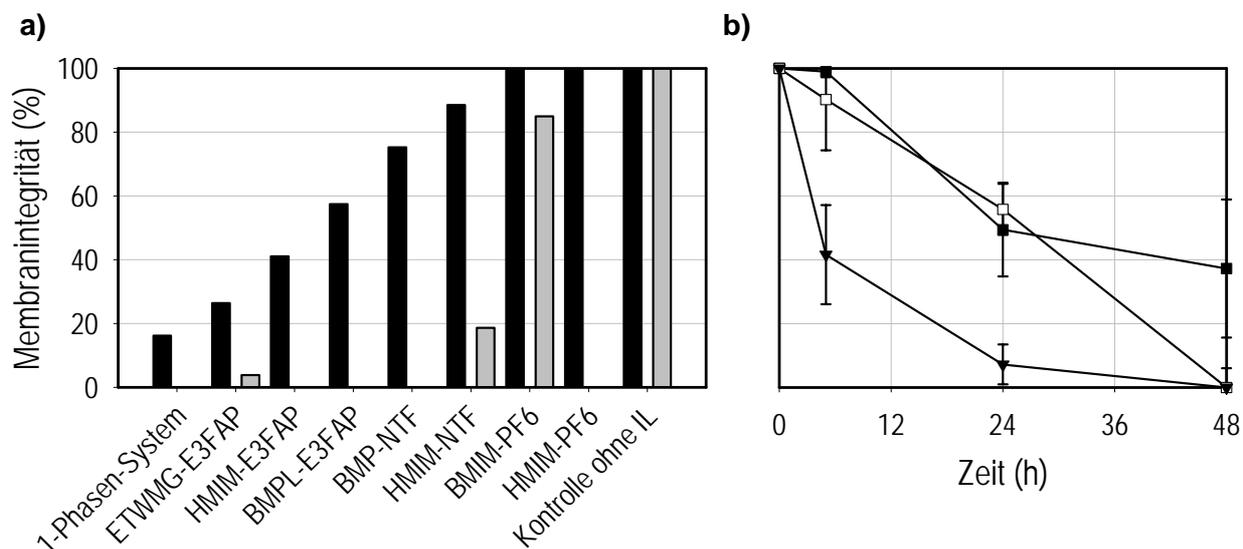
Die Lösungsmittel Ethylacetat, n-Butylacetat, Hexan und Methyl-tert-Butylether wurden mit *Synechococcus* PCC7942 Kulturen im Verhältnis von 1:5 der organischen zur wässrigen Phase eingesetzt. In den 2-Phasensystemen wurde weder eine Lebensfähigkeit der Zellen nach 5 h Inkubation noch gebildetets Produkt nach 24 h festgestellt (Daten nicht gezeigt).

#### **6.4.2 Lebensfähigkeit ganzer Zellen mit ionischen Flüssigkeiten**

Erste Versuche mit ionischen Flüssigkeiten (Tabelle 12.14) bei Biotransformationen mit *Synechococcus* PCC7942 in 2 mL Reaktoren machten deutlich, dass ohne Glukose im Medium nach 5 h Biotransformation bis auf die ionische Flüssigkeit 1-Butyl-3-methylimidazoliumhexafluorosphat (BMIM-PF6) kein einziges 2-Phasensystem besser war als der rein wässrige Reaktionsansatz mit Glukose (Abbildung 6.14a).

Die Membranintegrität wurde durch Anwesenheit von Glukose um ein Vielfaches ausgeprägter. Innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 5 h waren Zellen in Systemen mit ionischen Flüssigkeiten stabiler als im rein wässrigen System. Optimale Biokompatibilität zeigten Hexafluorphosphate (PF6), gefolgt von den Bis(trifluormethylsulfonyl)imiden (NTF) (Abbildung 6.14b). BMIM-PF6 erzielte die besten Ergebnisse mit einer Membranintegrität von 47 % nach 48 h.

Bei allen Systemen mit ionischen Flüssigkeiten ging die Teilungsfähigkeit der Zellen verloren (Daten nicht gezeigt).

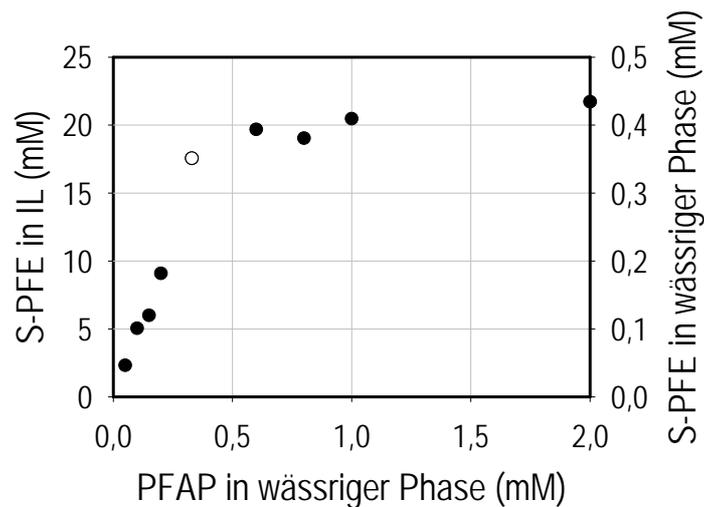


**Abbildung 6.14:** Vergleich der Membranintegritäten von *Synechococcus* PCC7942 bei Biotransformationen mit und ohne ionischen Flüssigkeit. **a)** Membranintegrität nach 5 h; mit Glukose (■) und ohne Glukose (▒). **b)** Mittlere Membranintegrität der Salzgruppen PF6 (■), NTF (□) und Tris(pentafluorethyl)trifluorophosphat (E3FAP) (▼). Daten sind auf 100 % Membranintegrität der Kontrolle normiert. Reaktionsbedingung: Biotransformation von 100 mM PFAP mit 25 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> in 2 mL Reaktoren bei 200 min<sup>-1</sup>, 0 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, RT. Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

### 6.4.3 Umsetzungen in ionischen Flüssigkeiten

Um den Effekt der besten ionischen Flüssigkeitsphase auf die Biotransformation zu untersuchen, wurden unterschiedliche Konzentrationen von 0,05-2,5 mM PFAP in der wässrigen Phase eingestellt. Nach 24 Stunden wurde die Produktkonzentration in der wässrigen Phase bestimmt (Abbildung 6.15).

Bei einer Einstellung von 0,33 mM PFAP in der wässrigen Phase, lagen im gesamten Reaktionssystem mit BMIM-PF6 ( $\log_D=2,6$ ) 100 mM PFAP vor. In der ionischen Flüssigkeit befand sich nach der Reduktion eine Produktkonzentration ( $\log_D=1,7$ ) von 17,6 mM S-PFE. Wird das Phasenverhältnis von 1:5 hinzugezogen, befindet sich im rein wässrigen System mit 4,1 mM annähernd die gleiche Menge an Produkt (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 6.15:** Konzentrationen an S-Pentafluorphenylethanol nach 24 h Biotransformation mit *Synechococcus* PCC7942 in einer BMIM-PF6 Phase und in der wässrigen Phase. Produktkonzentration bei 100 mM PFAP im gesamten Reaktionssystem (○).

Bis zu einer Konzentration von 0,33 mM PFAP in der wässrigen Phase nimmt die gebildete Konzentration an S-PFE um 1,08 mol Produkt per mol gelöstes Substrat zu (Abbildung 6.15). Eine Produktkonzentration von 0,4 mM in der wässrigen Phase wird kaum überschritten.

#### 6.4.4 Diskussion

Aufgrund der toxischen Effekte von Lösungsmitteln auf die Zellen von *Synechococcus* PCC7942 kann keine Produktbildung beobachtet werden. Da zumindest für Hexan eine Biokompatibilität für *Anabaena variabilis* berichtet wird (León *et al.*, 2001), ist davon auszugehen, dass die erhöhte Toxizität aus einer Kombination des Lösungsmittels mit dem Keton hervorgeht.

Ionische Flüssigkeiten erwiesen sich als sinnvoll, um die Membranintegrität der Zellen bei Biotransformationen zu steigern. Besonders gut eignen sich ionische Flüssigkeiten mit PF6 Salzen, da diese eine lang anhaltende Membranintegrität gewährleisten. In diesem Zusammenhang ist die Membranintegrität durch den stabilisierenden Effekt von Glukose deutlich verstärkt worden. Der Mechanismus für diese Stabilisierung ist nicht bekannt. Die Teilungsfähigkeit der Zellen geht jedoch verloren.

Da bei gleicher Ausgangskonzentration an Edukt im 2-Phasensystem die gleiche Menge Produkt wie im wässrigen System gebildet wird, kann eine Substratinhibierung ausgeschlossen werden. Gleiches gilt für eine Produktinhibierung aufgrund der linearen Zunahme der Produktkonzentrationen bis 0,35 mM (Abbildung 6.15). Aus den metabolischen

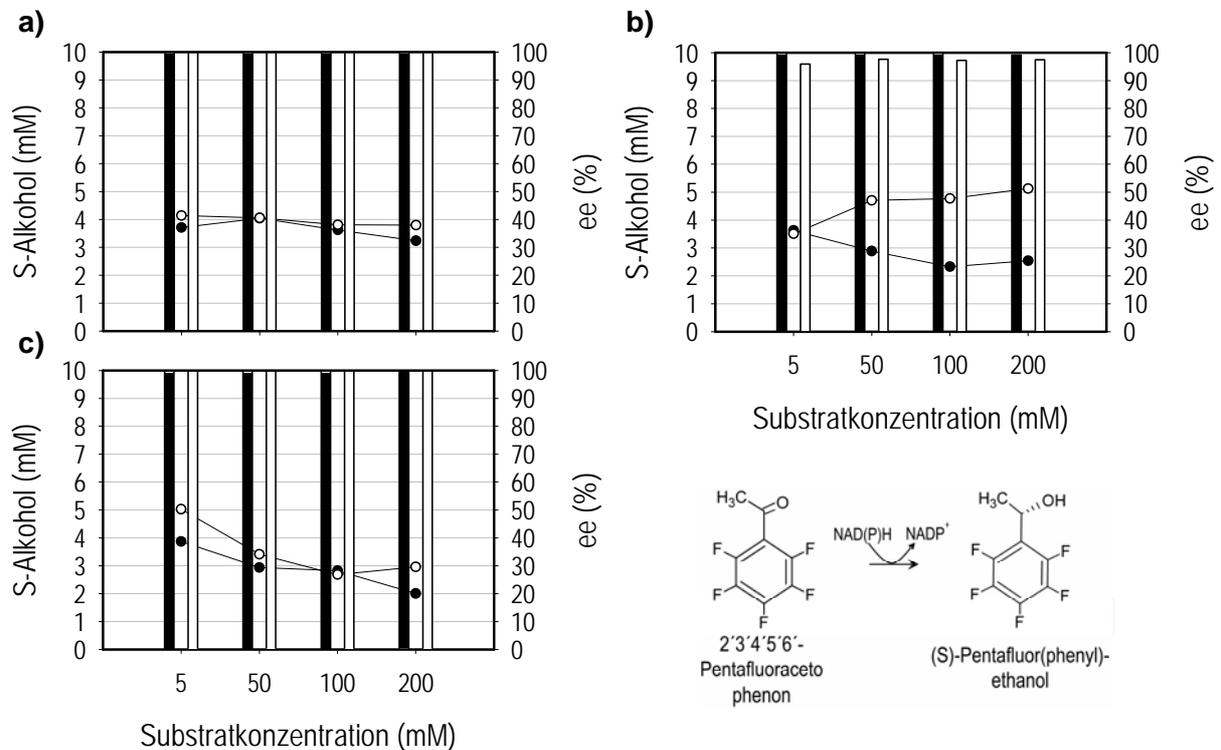
Untersuchungen ist bekannt, dass die Reaktion nach 9,5 h bei 4,51 mM Produkt zum Stillstand kommt. Obwohl die Membranintegrität mit ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zum wässrigen Reaktionssystem erheblich gesteigert ist und sogar mit der doppelten Biomasse der metabolischen Untersuchungen (Abbildung 6.9) gearbeitet wurde, konnten maximal ca. 4 mM Produkt im Zweiphasensystem mit ionischen Flüssigkeiten gebildet werden. Folglich kommt es zu einer Inaktivierung der Reaktion und als Konsequenz daraus zu einer Verringerung der Produktbildungskapazität für S-PFE im Satzverfahren um ca. 60%. Auch hier könnte aus Ergebnissen der metabolischen Untersuchungen gefolgert werden, dass zellinternes Acetat zu einer Vergiftung des Biokatalysators geführt hat.

## 7 Asymmetrische Synthesen mit unterschiedlichen Cyanobakterien

Im Folgenden werden die Ergebnisse eines breit angelegten Substrat-Produkt-Suchverfahrens mit *Synechococcus* PCC7942, *Nostoc muscorum* und *Anabaena variabilis* präsentiert. Als Ausgangssubstrate wurden die Ketone 2'-3'-4'-5'-6'-Pentafluoracetophenon, Ethyl-4-Chloracetoacetat, 4-Chloracetophenon und Ethylbenzoylacetat verwendet. Alle Reaktionen wurden mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  Glukose im Medium bei  $20^\circ\text{C}$  für 48 h mit oder ohne Licht durchgeführt.

### 7.1 Produkte

#### 7.1.1 Synthese von (S)-1-Pentafluor(phenyl)-ethanol

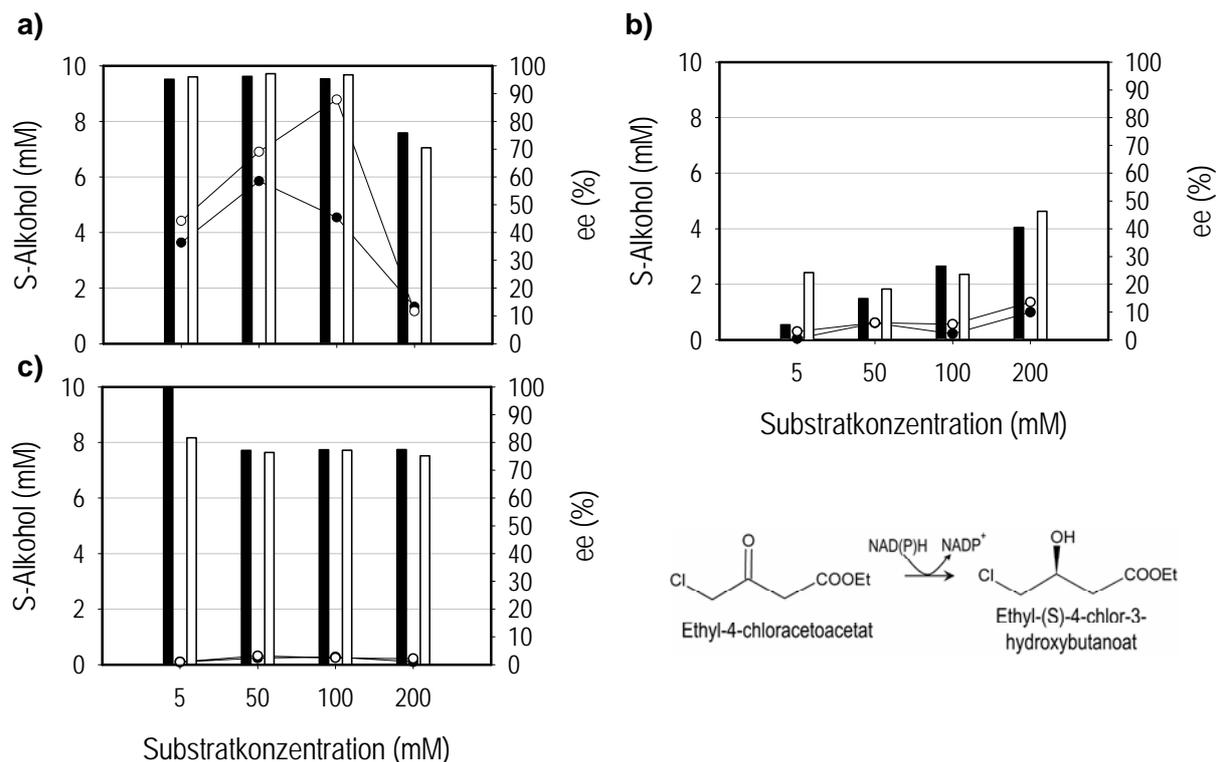


**Abbildung 7.1:** Gebildete Konzentrationen an S-PFE mit unterschiedlichen Cyanobakterien. Biotransformationen mit **a)**  $7,72 \text{ g L}^{-1}$  *Synechococcus* PCC7942, **b)**  $10,86 \text{ g L}^{-1}$  *Nostoc muscorum* und **c)**  $8,76 \text{ g L}^{-1}$  *Anabaena variabilis*. Gebildeter S-Alkohol bei  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (●); gebildeter S-Alkohol bei  $26 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (○); Enantiomerenüberschuss bei  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (■); Enantiomerenüberschuss bei  $26 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (▣). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

Das Keton PFAP wird von allen untersuchten Cyanobakterienstämmen zu seinem korrespondierenden S-Alkohol S-PFE mit einem Enantiomerenüberschuss zwischen 95,9 %

und  $\geq 99,8\%$  umgesetzt (Abbildung 7.1). Die maximal gebildeten Produktkonzentrationen liegen bei 5 mM S-Alkohol. Eine Erhöhung der Eduktkonzentration führte zu keiner Verbesserung in der Produktbildung. Ein Einfluss von Licht auf die Produktbildung kann nur bei Biotransformationen mit *Nostoc muscorum* beobachtet werden und äußert sich durch eine doppelt so hohe Konzentration bei Lichtenwesenheit (Abbildung 7.1b).

### 7.1.2 Synthese von Ethyl-S-4-chlor-3-hydroxybutyrat



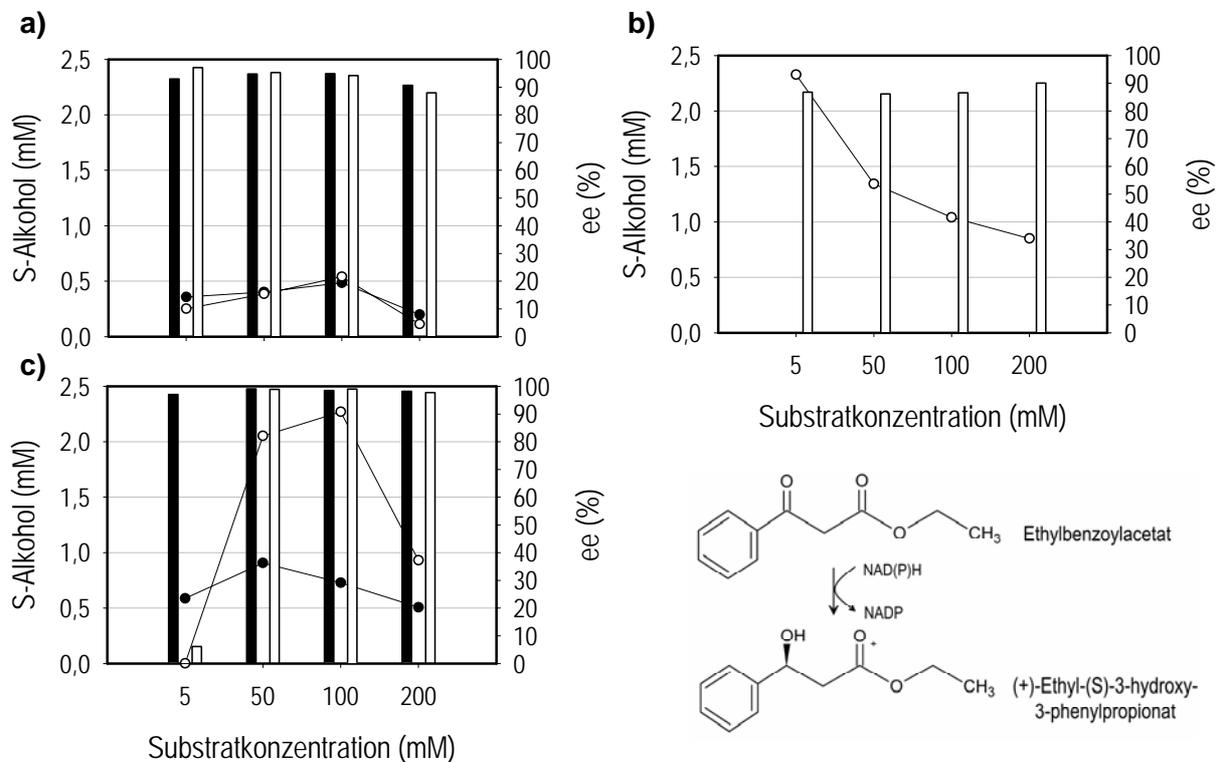
**Abbildung 7.2:** Gebildete Konzentrationen an Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat mit unterschiedlichen Cyanobakterien. Biotransformationen mit **a)**  $7,72 \text{ g L}^{-1}$  *Synechococcus* PCC7942, **b)**  $10,86 \text{ g L}^{-1}$  *Nostoc muscorum* und **c)**  $8,76 \text{ g L}^{-1}$  *Anabaena variabilis*. Gebildeter S-Alkohol bei  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (●); gebildeter S-Alkohol bei  $26 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (○); Enantiomerenüberschuss bei  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (■); Enantiomerenüberschuss bei  $26 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (▣). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

Das Keton Ethyl-4-chloracetoacetat wird von *Synechococcus* PCC7942 zu seinem korrespondierenden S-Alkohol Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat mit einem Enantiomerenüberschuss von  $\geq 97\%$  umgesetzt (Abbildung 7.2). Die maximal gebildeten Produktkonzentrationen liegen bei 8,78 mM S-Alkohol. Dabei kann eine Abhängigkeit der Produkt- von der Eduktkonzentration beobachtet werden. Höhere Konzentrationen als

100 mM Edukt führten zu verringerten Produktkonzentrationen. Ein Einfluss von Licht auf die Produktbildung äußert sich bei Biotransformationen mit *Synechococcus* PCC7924 durch eine doppelt so hohe Produktkonzentration bei Lichtanwesenheit (Abbildung 7.2a). Die heterozystischen Cyanobakterien *Anabaena variabilis* und *Nostoc muscorum* tendieren dazu R-Alkohol als Nebenprodukt zu bilden (Abbildungen 7.2b und c).

### 7.1.3 Synthese von (+)-Ethyl-3-hydroxy-3-phenylpropionat

Das Keton Ethylbenzoylacetat wurde von allen untersuchten Cyanobakterien zu seinem korrespondierenden S-Alkohol (+)-Ethyl-(S)-3-hydroxy-3-phenylpropionat umgesetzt (Abbildung 7.3).

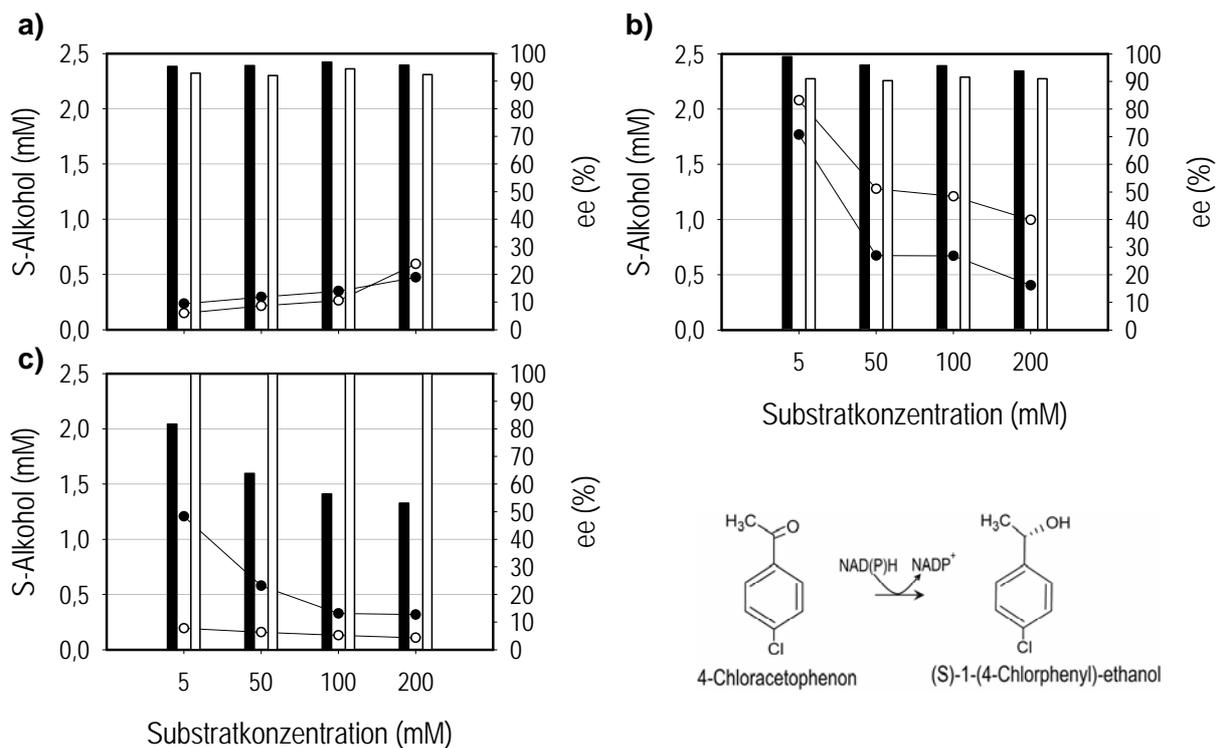


**Abbildung 7.3:** Gebildete Konzentrationen an (+)-Ethyl-(S)-3-hydroxy-3-phenylpropionat mit unterschiedlichen Cyanobakterien. Biotransformationen mit **a)**  $7,72 \text{ g L}^{-1}$  *Synechococcus* PCC7924, **b)**  $10,86 \text{ g L}^{-1}$  *Nostoc muscorum* und **c)**  $8,76 \text{ g L}^{-1}$  *Anabaena variabilis*. Gebildeter S-Alkohol bei  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (●); gebildeter S-Alkohol bei  $26 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (○); Enantiomerenüberschuss bei  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (■); Enantiomerenüberschuss bei  $26 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (▣). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

Die gemessenen Enantiomerenüberschüsse lagen zwischen 86 % und 98,9 %. Die maximale Produktkonzentration wurde mit 2,3 mM S-Alkohol gemessen. Ein Einfluss von Licht kann bei Biotransformationen mit *Anabaena variabilis* beobachtet werden. Dieser äußert sich bei Substratkonzentrationen  $\geq 50$  mM durch durchschnittlich doppelt so hohe Produktkonzentrationen bei Lichtanwesenheit (Abbildung 7.3c). Die Biotransformation im Dunkeln von *Nostoc muscorum* wurde aufgrund eines defekten Analysesystems nicht gemessen.

#### 7.1.4 Synthese von (S)-1-(4-Chlorphenyl)-ethanol

Alle untersuchten Cyanobakterien reduzierten das Keton 4-Chloracetophenon zu seinem korrespondierenden S-Alkohol (S)-1-(4-Chlorphenyl)-ethanol mit maximalen Enantiomerenüberschüssen zwischen 91 % und  $\geq 99,8$  % (Abbildung 7.4).



**Abbildung 7.4:** Gebildete Konzentrationen an (S)-1-(4-Chlorphenyl)-ethanol mit unterschiedlichen Cyanobakterien. Biotransformationen mit **a)**  $7,72 \text{ g L}^{-1}$  *Synechococcus* PCC7942, **b)**  $10,86 \text{ g L}^{-1}$  *Nostoc muscorum* und **c)**  $8,76 \text{ g L}^{-1}$  *Anabaena variabilis*. Gebildeter S-Alkohol bei  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (●); gebildeter S-Alkohol bei  $26 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (○); Enantiomerenüberschuss bei  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (■); Enantiomerenüberschuss bei  $26 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (□). Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

Eine Steigerung der geringen Produktkonzentrationen von maximal 2 mM S-Alkohol konnte durch Erhöhung der Eduktkonzentration nicht erreicht werden. Ohne Licht verringerte sich der Enantiomerenüberschuss von Biotransformationen mit *Anabaena variabilis* abhängig von der Eduktkonzentration um bis zu 50 %.

### 7.1.5 Diskussion

Jeder Stamm der zufällig ausgesuchten Cyanobakterien mit unterschiedlicher Morphologie und Phototropie konnte die dargebotenen Substrate ohne Licht reduzieren. Eine Prozessführung in Rührkesselreaktoren ist daher generell mit Cyanobakterien möglich (Tabelle 7.1).

**Tabelle 7.1:** Bester Biokatalysator für einen bestimmten S-Alkohol bei unterschiedlichen Lichtbedingungen nach 48 h Reaktionszeit.

Produkt	% ee	Bedingung	Konzentration [mM]	Organismus
(S)-Pentafluor(phenyl)-ethanol	≥99,8	Licht	5,03	<i>Anabaena variabilis</i>
	≥99,8	Dunkel	3,87	
Ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutanoat	96,8	Licht	8,78	<i>Synechococcus PCC7942</i>
	96,2	Dunkel	5,85	
(S)-1-(4-Chlorphenyl)-ethanol	91,0	Licht	2,08	<i>Nostoc muscorum</i>
	99,0	Dunkel	1,77	
(+) -Ethyl (S)-3-hydroxy-3-phenylpropionat	99,0	Licht	2,27	<i>Anabaena variabilis</i>
	99,0	Dunkel	0,91	

Es konnte kein totipotenter Biokatalysator für alle Edukte bestimmt werden. Besonders halogenierte Acetophenone werden mit einem hohen Enantiomerenüberschuss reduziert. Asymmetrische Reduktionen von  $\beta$ -Ketoestern wie Ethylbenzoylacetat und Ethyl-4-chloracetoacetat erfolgen mit hohen Enantiomerenüberschüssen von > 97 % im Dunkeln.

Bei allen untersuchten Cyanobakterien wurden geringe Produktkonzentrationen < 10 mM festgestellt, die durch Steigerung der Substratkonzentration nicht erhöht werden konnten. Wurde der Biokatalysator auf ein Zehntel der Ausgangskonzentration verringert, so wurden gleiche Produktkonzentrationen erreicht (Daten nicht gezeigt). Werden die maximalen Produktkonzentrationen von *Synechococcus* PCC7942 für S-PFE von ca. 4 mM (Abbildung 6.9 und Kapitel 6.4.4) bei Zellkonzentrationen von 10,4 und 25 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> berücksichtigt, ist auf eine Inaktivierung des Biokatalysators durch das Substrat oder durch die vorherrschenden

Reaktionsbedingungen zu schließen. Wie bereits in Kapitel 6.3.2 diskutiert wird, könnte die intrazelluläre und freigesetzte extrazelluläre Konzentration an Acetat zur Lyse der Biokatalysatoren führen.

Der Vergleich der Produktbildungskapazitäten und Enantiomerenüberschüsse von Wildtyp-Cyanobakterien mit Produktionsorganismen zeigt deutlich, dass Cyanobakterien bessere oder gleich gute Ergebnisse liefern (Tabelle 7.2).

Eine lichtabhängige Produktsteigerung könnte auf eine lichtgetriebene Kofaktorregenerierung oder auf eine Interaktion des Ferredoxinpools mit der Elektronentransportkette der Photosynthese zurückzuführen sein. Letzteres hätte direkte Auswirkungen auf die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase, das zentrale Enzym von Acetatgärungen. Während bei den Biotransformationen überwiegend eine sehr hohe S-Spezifität festgestellt werden kann, zeigen *Nostoc muscorum* für Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat und *Anabaena variabilis* für (S)-1-(4-Chlorphenyl)-ethanol geringe Enantiomerenüberschüsse. Besonders die lichtabhängige Stereoselektivität von *Anabaena variabilis* spricht für zwei unabhängige Oxidoreduktasen, die je nach Stoffwechselweg unterschiedliche Aktivitäten aufweisen (Nakamura *et al.*, 2002b).

**Tabelle 7.2:** Vergleich spezifischer Produktbildungskapazitäten von Cyanobakterien mit heterotrophen Produktionsorganismen im Satzverfahren (Glukose als Kosubstrat)

Produkt	<i>S. cerevisiae</i> CBS 8066	<i>S. cerevisiae</i> CM 3260	<i>Lactobacillus</i> <i>kefir</i>	<i>Synechococcus</i> PCC7942	<i>Anabaena</i> <i>variabilis</i>	<i>Nostoc</i> <i>muscorum</i>	<i>Pichia</i> <i>pastoris</i>	
(S)-Pentafluor(phenyl)-ethanol		0,22 99,5	R-Spez.	2,59 ≥99,8	0,75 96,0	3,96 99,0		mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> %ee
Ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutanoat	0,2 44,0 <sub>[1]</sub>	2-4 77-88,0 <sub>[1]</sub>	1 ≥99,8 <sub>[2]</sub>	2,49 91,8			4,1 >98,0 <sub>[3]</sub>	mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> %ee
(S)-1-(4-Chlorphenyl)-ethanol			R-Spez. <sub>[4]</sub>			0,64 93,6		mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> %ee
(+)-Ethyl (S)-3-hydroxy-3-phenylpropionat	0,3 85,0 <sub>[1]</sub>	0,7 >97,0 <sub>[1]</sub>		1,59 97,5	0,65 96,2			mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> %ee

[1] Engelking *et al.*, 2006 [2] Amidjojo and Weuster-Botz, 2005 [3] Engelking *et al.*, 2004 [4] Pfruender *et al.*, 2004

Die erhaltenen niedrigen Konzentrationen an chiralen Alkoholen sind eine Konsequenz der Produktion der Biokatalysatoren. Wie Abbildung 5.19 entnommen werden kann, sinkt im 20 L –Rührkesselreaktor innerhalb der Anpassungsphase von 96 h die Produktbildungskapazität für S-PFE um 40 % auf 1,28 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> als Folge der abnehmenden zellinternen Kohlenhydrate. In Bezug auf die Zellernte muss daher ein Kompromiss zwischen produzierter Biomasse und verringerter Produktbildungskapazität

eingegangen werden. Da jedoch mit zunehmender Kultivierungszeit die Biomasse mit einem optimierten Lichtprofil exponentiell ansteigt, während die Produktbildungskapazität in diesem Zeitraum nur noch im geringen Maß absinkt, wäre ein Erntezeitpunkt zum spätesten Zeitpunkt als sinnvoll anzusehen bzw. ein Prozess mit kontinuierlicher Zellabtrennung in Erwägung zu ziehen.

### **7.2 Einsatz kommerzieller phototropher Mikroorganismen**

Eine wirtschaftliche Verwendung von Cyanobakterien als Ganzzellbiokatalysatoren ist nur möglich, wenn neben dem Einsatz konventioneller Rührkesselreaktoren der Biokatalysator aus einer externen Produktionsstätte bezogen wird. Dabei ist fraglich, ob herkömmlich formulierte Mikroalgen eine ausreichende spezifische Produktbildungskapazität aufweisen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse von Biotransformationen mit industriellen Chargen von *Chlorella vulgaris*, *Nostoc spp.* und im Labor hergestellter Lyophilisate präsentiert.

#### **7.2.1 Untersuchungen mit der Mikroalge *Chlorella vulgaris***

Die Mikroalge *Chlorella vulgaris* wird im jährlich im 130-150 t Maßstab hergestellt und als Lyophilisat formuliert. Die Biotransformation wurde zur Vergleichbarkeit im optimierten 14-VEGA Medium mit einer Biomasse von  $6,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  bei  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  im 100 mL Reaktor durchgeführt. Nach 48 h konnte in Reaktionsansätzen mit Glukose eine Produktbildungskapazität von  $0,018 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}$  mit einem Enantiomerenüberschuss von  $> 99,8 \%$  für S-PFE festgestellt werden.

#### **7.2.2 Untersuchungen mit *Nostoc spp.***

In Burma werden jährlich 60 t *Nostoc spp.* in Form von Flechten gesammelt und exportiert. Zur Biotransformation wurde eine Biomasse von  $20 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  in 100 mL gasdichten Reaktoren eingesetzt. Nach 24 h konnte eine Produktbildungskapazität von  $0,025 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$  mit einem Enantiomerenüberschuss von  $> 99,8 \%$  für S-PFE ohne Licht gemessen werden.

#### **7.2.3 Lagerstabilität gefriergetrockneter Zellen.**

Von den Organismen *Synechococcus* PCC7942, *Nostoc muscorum* und *Anabaena variabilis* wurden Lyophilisate der Zellen für die Fermentationsuntersuchungen (Kapitel 6.3) hergestellt und für 60 Tage bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die Aktivitäten dieser Zellen wurden analog den

Versuchen mit frischen Zellen durchgeführt. Die ermittelten Produktbildungskapazitäten sind Tabelle 7.3 zu entnehmen.

**Tabelle 7.3:** Produktbildungskapazitäten für S-PFE bei 20°C von lyophilisierten und frischen Zellen

Organismus	PBK lyophilisierte Zellen (mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> )	PBK frische Zellen (mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> )
<i>Synechococcus</i> PCC7942	0,035	0,43
<i>Anabaena variabilis</i>	0,010	0,13
<i>Nostoc muscorum</i>	0,035	0,25
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,018	
<i>Nostoc spp.</i>	0,025	

#### 7.2.4 Diskussion

Die Ergebnisse mit kommerziell formulierten Mikroalgen zeigen, dass prinzipiell eine Nutzung getrockneter bzw. gefriergetrockneter Zellen möglich ist. In Bezug auf die Produktbildungskapazitäten für S-PFE bei 20°C der eingesetzten Biokatalysatoren muss die Formulierungsmethode verbessert werden. Ein Vergleich der Produktbildungskapazitäten von *Synechococcus* PCC7942, *Anabaena variabilis* und *Nostoc muscorum* vor und nach einer gefriergetrockneten Lagerung verdeutlicht, dass die Gefrier Trocknung eine stammabhängige Einbuße der Produktbildungskapazität um zirka eine Zehnerpotenz verursacht (Tabelle 7.3). Die Produktbildungskapazitäten industriell formulierter, phototropher Mikroorganismen entsprechen der gleichen Größenordnung derjenigen lyophilisierter Laborstämme.

## 8 Identifikation der Oxidoreduktase in *Synechococcus* PCC7942

Zur genauen Charakterisierung der ketonreduzierenden Oxidoreduktase in *Synechococcus* PCC7942 und der Abschätzung einer Nutzung des Enzyms in heterologen Expressionssystemen musste das Enzym isoliert werden.

Vorversuchen zur Primärreinigung folgten die Isolation, Identifikation und *In-silico*-Analyse der gesuchten Oxidoreduktase.

### 8.1 Untersuchungen im Zellysat und Primärreinigung

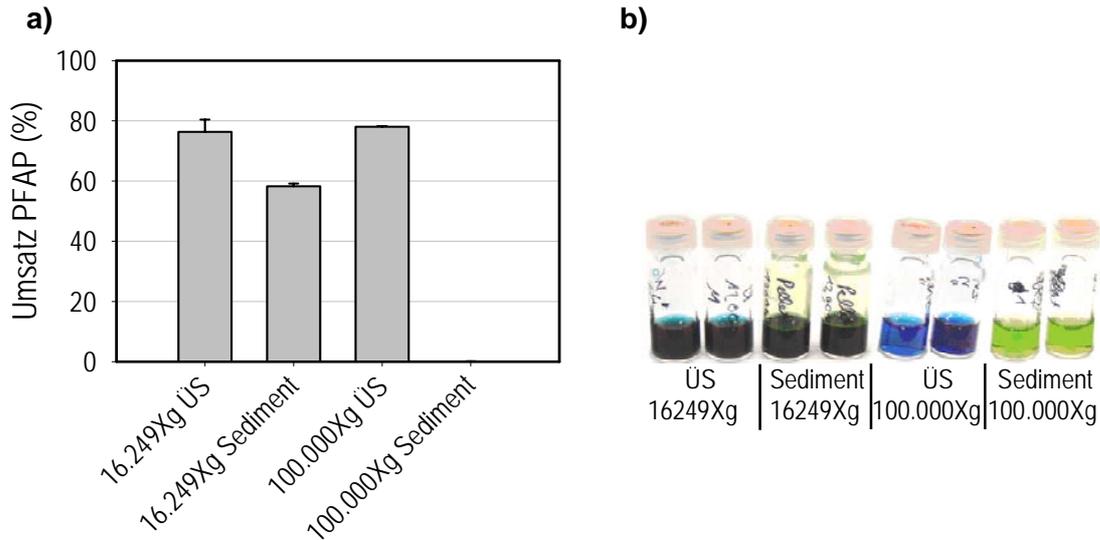
Untersuchungen im Zellysat gaben Aufschluss über die Lokalisation der Oxidoreduktase. Es war zu klären, ob es sich um ein lösliches oder membrangebundenes Protein handelt. Darauf aufbauend wurden Aufschlussverfahren zur Isolation der löslichen Oxidoreduktase entwickelt und ein geeignetes Material zur Primärreinigung bestimmt.

#### 8.1.1 Lokalisation der nativen Oxidoreduktase

Als Ausgangsmaterial dienten aufkonzentrierte, in 50 mM MES-Puffer (pH 6,5) resuspendierte Zellen, die mit einer Ultraschallnadel aufgeschlossen wurden. Das erhaltene Zellhomogenat wurde mittels Sedimentation in eine Zelltrümmer-Fraktion und einen löslichen Überstand aufgetrennt. Als Maß für die Aktivität der Oxidoreduktase wurde die Reduktion von PFAP über 24 h in der jeweiligen Fraktion gemessen. Alle Membranfraktionen reduzierten PFAP zu 95 %, während die lösliche Fraktion nur unter externer Zugabe von NADPH eine Umsetzung von maximal 10 % zeigte (Daten nicht gezeigt).

Untersuchungen in solubilisiertem Lyophilisat dieses Zellhomogenats zeigten, dass Gefriertrocknung das membrangebundene Protein freisetzt. Eine fraktionierte Sedimentation bei unterschiedlichen zentrifugalen Kräften machte deutlich, dass etwa 50 % des vorher gebundenen Proteins in löslicher Form freigesetzt wurden (Abbildung 8.1).

Die Beobachtung der Aktivitäten und der Farbe der Lösungen bestätigte, dass besonders aktive Zellhomogenate eine Blaufärbung aufwiesen.



**Abbildung 8.1:** Aktivitätsverteilung einer fraktionierten Sedimentation von Zellhomogenat. **a)** Umsetzung von 1,4 mM PFAP im Zellhomogenat; **b)** Bilder der Reaktionsansätze. 50 g L<sup>-1</sup> lyophilisiertes Zellhomogenat gelöst in 50 mM MES-Puffer (pH 6,5).

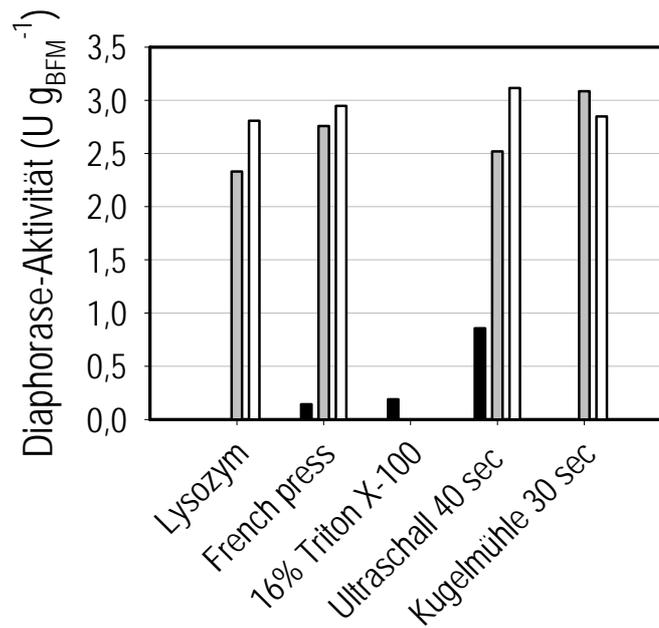
### 8.1.2 Freisetzung der Oxidoreduktase

Für die Freisetzung der Oxidoreduktase wurde die Effizienz unterschiedlicher Aufschlussmethoden untersucht. Da ein Membranprotein zu reinigen war, wurden auch membrandissoziierende Methoden eingesetzt. Die Quantifizierung einer Ketonreduktion dauerte über 24 h und verfügte nicht über die notwendige Sensibilität, um kinetische Inaktivierungen durch die Aufschlussmethode nachzuweisen. Folglich erfolgte die Quantifizierung der Aufschlusseffizienz anhand der Freisetzung des membranassoziierten Modellproteins FNR. Das Protein wurde über seine Diaphoraseaktivität nachgewiesen.

Membrangebundenes und lösliches Protein wurde durch Ultrazentrifugation unterschieden. Die besten Ergebnisse unterschiedlicher Aufschlussverfahren sind in Abbildung 8.2 zusammengefasst.

Ohne Lysozym zeigte die Ultraschallbehandlung eine deutlich höhere Aufschlusseffizienz als die *french press* und der Detergenzienaufschluss. Den Ergebnissen der Ultrazentrifugation ist zu entnehmen, dass jede Methode lösliches Protein liefert. Methoden wie Ultraschall und Kugelmühle inaktivierten jedoch die Oxidoreduktase nach 3 min (Daten nicht gezeigt).

Bei Konzentrationen von 0,5 g L<sup>-1</sup> Lysozym befand sich die erhaltene Proteinaktivität in der gleichen Größenordnung wie bei den physikalischen Aufschlussmethoden.



**Abbildung 8.2:** Zusammenfassung der besten Aufschlussresultate mit *Synechococcus* PCC7942. Zellhomogenat ohne Lysozymbehandlung (■), Zellhomogenat nach Vorbehandlung mit 0,5 g L<sup>-1</sup> Lysozym (▒), Aktivität des lysozymhaltigen Zellhomogenat nach Ultrazentrifugation (□).

### 8.1.3 Primärreinigung

Zum Primärreinigung wurden unterschiedliche Ionenausterschermaterialien verwendet. Eine Bindung der Oxidoreduktase konnte nur an Anionentauscher beobachtet werden. Die Freisetzung des Proteins wurde erfolglos mit einem pH-Gradienten versucht und schließlich mit einem Salzgradienten von 0,025-3 M NaCl erreicht. Ergebnisse einer Proteintrennung von Zellhomogenat im Ionenausterscher zeigten eine Trennung der Oxidoreduktase in distinkte Fraktionen (Abbildung 8.3).

Die *in-vitro*-Ketonreduktion der einzelnen Fraktionen korrelierte deutlich mit den Maxima der Diaphoraseaktivität. Dieses Verhalten wurde auch bei Versuchen der Ammoniumsulfatfällung beobachtet (Anhang 12.6.2). Ein erneuter Nebenbefund war die Blaufärbung von Oxidoreduktase enthaltenden Fraktionen (Daten nicht gezeigt).

Eine Beobachtung bei der Dialyse war, dass Membranen mit einer Molekulargewichts-Ausschlussgröße (MWCO) von 60 kDa das Protein effizient zurückhielten (Daten nicht gezeigt).

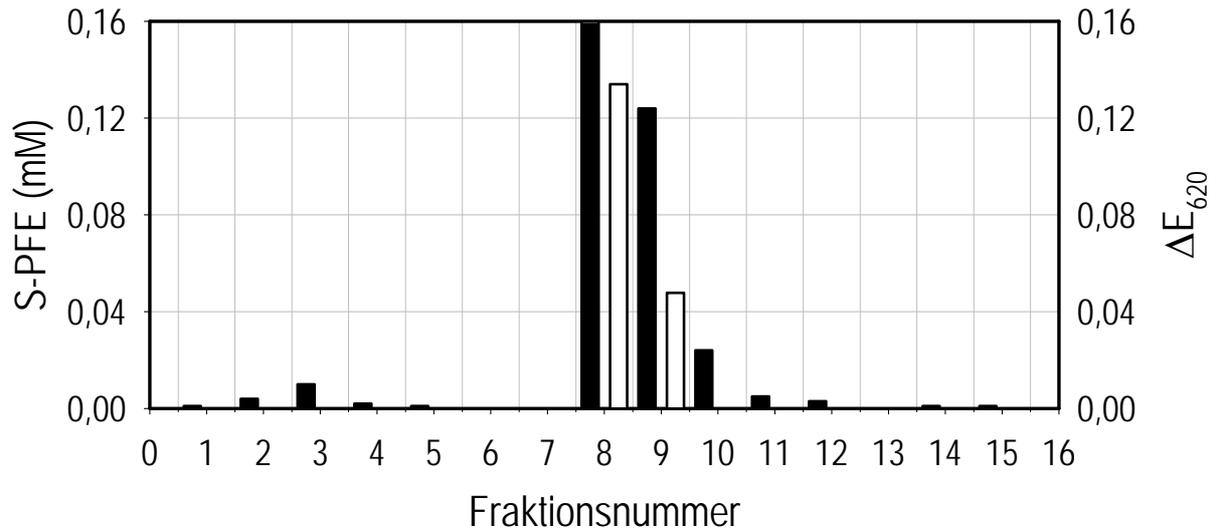


Abbildung 8.3: Aktivitäten der Oxidoreduktase in Fraktionen einer Anionentauscherchromatographie. Gebildete Konzentration an S-Alkohol (□); relative Diaphoraseaktivität (■).

#### 8.1.4 Diskussion

Die Freisetzung der Oxidoreduktase mittels Lyophilisieren nach dem Zellaufschluss spricht für ein nur schwach gebundenes Membranprotein. Nach einem Ultraschallaufschluss in Proteinpuffer (Tabelle 12.17) wird gegenüber einem Ultraschallaufschluss in MES-Puffer (pH 6,5) mehr Oxidoreduktase in der löslichen Fraktion nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dies erhärtet den Verdacht, dass es sich um ein extrinsisches Membranprotein handelt, da die Löslichkeitsvermittlung über die Ionenstärke des Aufschlusspuffers im Rahmen einer Ultraschallbehandlung charakteristisch für membranassoziierte Proteine ist (Scopes, 1994).

Phycocyanin, ein Antennenpigment der Phycobilisomen verursacht die deutliche Blaufärbung besonders aktiver Fraktionen. Die einzige publizierte Phycocyanin-assoziierte Oxidoreduktase ist die FNR, die über ihre Phycobilisomen-Linker-Polypeptid (CpcD)-ähnliche Domäne an Phycocyanin gebunden ist (Nakajima *et al.*, 2002).

Die Aufschlusseffizienz und damit die Freisetzung der löslichen FNR kann durch die Erhöhung der Konzentration an Lysozym erheblich verbessert werden. Daher wurde für alle weiteren biochemischen Experimente nach einer Behandlung mit 0,5 g L<sup>-1</sup> Lysozym mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Eine *in-silico*-Analyse des Proteoms von *Synechococcus* PCC6301 ergab, vorausgesetzt es handelt sich nicht um einen Proteinkomplex, dass keine Dehydrogenase in der Größenordnung > 60 kDa anwesend ist. Allein die FNR im Komplex mit Phycocyanin besitzt

eine Molekularmasse von 78 kDa. Die enge Korrelation zwischen der Diaphoraseaktivität als typischer Nachweis der FNR und der *in-vitro*-Ketonreduktion in blaugefärbten Proben könnte für die FNR als die gesuchte Oxidoreduktase sprechen.

Die FNR spielt eine wichtige Rolle in der Respiration (Scherer *et al.*, 1988) und ist daher ein Enzym, das sowohl in der Photobiokatalyse als auch in der Biokatalyse im Dunkeln aktiv ist. Neben ihrer Funktion in der Elektronentransportkette der Photosynthese führt die FNR eine Reihe von Reduktionen unter Verbrauch von NADPH durch (Forti, 1971; Shin 1971; Schautemeier *et al.*, 1985; Matthijs und Lubberding, 1988). Besonders die Elektronenübertragung auf Hydrochinone ist hervorzuheben, da diese strukturell Acetophenon ähnlich sind. Dieses Enzym muss folglich eine Bindungsstelle besitzen, welche die Reduktion zyklischer organischer Verbindungen ermöglicht. Sie könnte der Ort der Ketonreduktion sein. Eine Reduktion von größeren organischen Molekülen mit Keto-Gruppen ist daher durchaus denkbar.

Eine andere Erklärung für die beobachtete Korrelation der Diaphoraseaktivität, der *in-vitro*-Ketonreduktion sowie der Blaufärbung ist die Kopplung des Enzyms an die eigentliche Ketonreduktion. Es ist denkbar das die FNR in die Kofaktorregenerierung aufgrund Respiration oder als Ferredoxin-Oxidoreduktase in die Regulation des Metabolismus im Dunkeln involviert.

### **8.2 Die Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase als mögliche Oxidoreduktase**

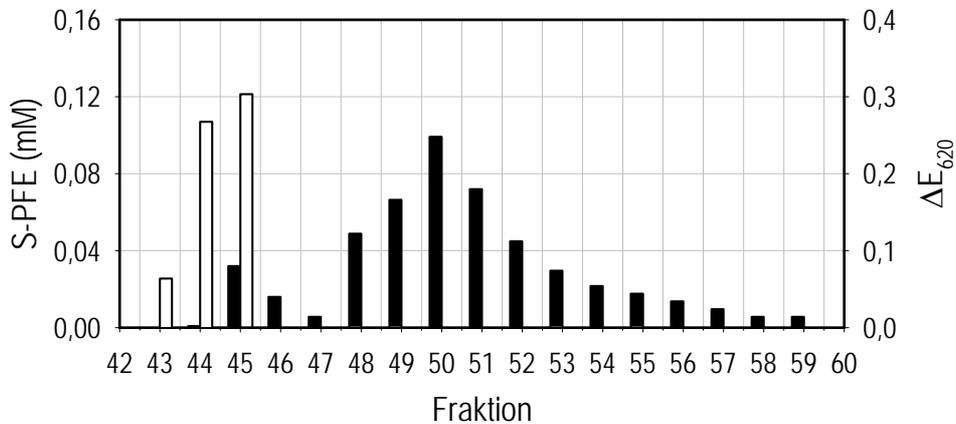
Den vorliegenden Daten zufolge war die FNR als potentielle Oxidoreduktase der Ketonreduktion in Betracht zu ziehen. Zur Bestätigung der Annahme musste mit dem isolierten Enzym eine *in-vitro*-Ketonreduktion nachgewiesen werden.

Parallel zur Proteinisolierung wurde ein reverser genetischer Ansatz gewählt, um die FNR aus *Synechococcus* PCC7942 verfügbar zu machen. Dazu wurde die bekannte Gen-Sequenz für die FNR aus isolierter genomischer DNA von *Synechococcus* PCC7942 amplifiziert und in *E.coli* in einem pET21a Expressionssystem transformiert. Nach der Expression in *E. coli* wäre eine zugewonnene Fähigkeit zur Ketonreduktion ein funktionaler Nachweis, dass die FNR die gesuchte Oxidoreduktase ist.

#### **8.2.1 Reinigung**

Nach dem Zellaufschluss und der Abtrennung von Membranbestandteilen mittels Ultrazentrifugation folgten eine Gelfiltration sowie eine Trennung über einen Ionentauscher. Dabei wurden die Fraktionen mit maximaler Diaphoraseaktivität und *in-vitro*-Ketonreduktion

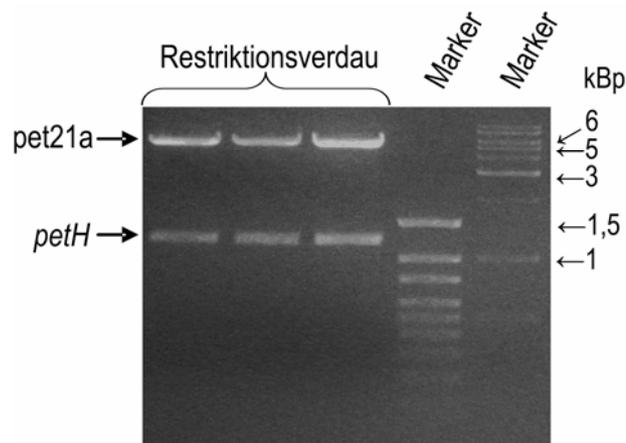
im Anionentauscher aufgetrennt (Abbildung 8.4). Fraktionen, die Oxidoreduktase enthielten (43-45), zeigten eine geringe Diaphoraseaktivität. Mit Fraktion 47 nahm die Diaphoraseaktivität deutlich zu.



**Abbildung 8.4:** Diaphoraseaktivität und in-vitro-Ketonreduktion nach Auftrennung über eine Anionentauscherchromatographie. Relative Diaphoraseaktivität (■), in-vitro-Ketonreduktion (□).

### 8.2.2 Klonierung

Das Gen der FNR (*petH*: 1,25 kB) wurde aus *Synechococcus* PCC7942 mittels PCR aus isolierter genomischer DNA amplifiziert (Kapitel 4.15). Zur Klonierung in einem pET21a-Vektor (5,44 kB) wurden die Schnittstellen *NdeI* und *EcoRI* eingefügt (Abbildung 8.5).



**Abbildung 8.5:** Restriktionsverdau des Expressionsplasmides mit dem Gen für die FNR. Als Schnittenzyme wurden *NdeI* und *EcoRI* verwendet. 1% Agarose-Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. **petH**: Gen der FNR aus *Synechococcus* PCC7942, **pet21**: Expressionsvektor pET21a.

Das Plasmid wurde anschließend in die *E. coli* Stämme BL21 (DE3) und JM109 (DE3) transformiert.

### **8.2.3 Expression**

Zur Expression wurden die *E. coli* Stämme BL21 (DE3) und JM109 (DE3) bei 37°C für 5,5 h kultiviert und bei einer  $OD_{660}=1$  mit 1 mM IPTG induziert. Die Diaphoraseaktivität und *in-vitro*-Ketonreduktion wurde über 12 h verfolgt.

Es konnte nur eine sehr schwache Diaphoraseaktivität und keine *in-vitro*-Ketonreduktion gemessen werden. Eine Analyse der Expression über SDS-PAGE bestätigte jedoch eine lösliche Expression des Proteins (Daten nicht gezeigt).

### **8.2.4 Diskussion**

Die Trennung der Diaphoraseaktivität von der *in-vitro*-Ketonreduktion beweist, dass es sich bei der FNR nicht um die gesuchte Oxidoreduktase handelt. Dennoch scheint die unbekannte Oxidoreduktase eine schwache Diaphoraseaktivität zu besitzen oder aktive Fragmente der FNR mit ihr zu eluieren.

Auch die Ergebnisse aus der Klonierung und Expression von *petH* sprechen deutlich gegen die FNR als die gesuchte Oxidoreduktase.

## **8.3 Identifikation der nativen Oxidoreduktase**

Mit dem Ausschluss der FNR als gesuchte Oxidoreduktase musste erneut eine ausreichende Menge an aufgereinigtem Protein isoliert werden, um eine Identifizierung durchzuführen. Ziel war die Menge an Fremdproteinen auf ein Maß abzureichern, dass eine Identifikation über einen Proteinfingerprint direkt aus einem SDS-Gel möglich wird.

### **8.3.1 Zellaufschluss und Vorklärung des Homogenats**

Die Zellpräparation für die Isolation der Oxidoreduktase erfolgte analog der Isolation der FNR mit Ultraschall und Ultrazentrifugation. Der geklärte Überstand (aus  $0,1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  Zellhomogenat) diente als Ausgangsmaterial für die präparative FPLC.

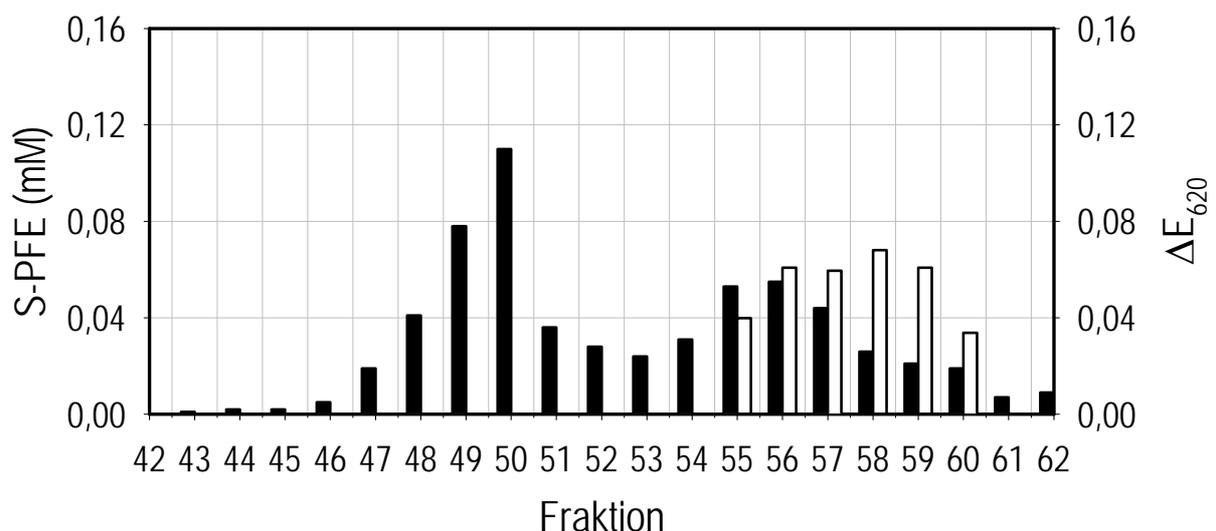
### 8.3.2 Präparative FPLC

Als Auftrag dienten 5 mL auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex-200®) mit einem Trennbereich zwischen 10-600 kDa. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 2 mL min<sup>-1</sup>. Der Diaphoraseaktivitätsnachweis hatte aufgrund der Ergebnisse aus der Reinigung der FNR nur noch dann Aussagekraft, wenn ein einziges Aktivitätsmaximum nachzuweisen war. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf Diaphoraseaktivität hin untersucht. Es wurde nur ein einziges Aktivitätsmaximum detektiert (Daten nicht gezeigt).

Entsprechende Fraktionen wurden vereinigt und über Anionenaustauschchromatographie getrennt. In den hieraus resultierenden Fraktionen trennte sich die Diaphoraseaktivität analog Abbildung 8.4 in zwei Maxima auf. Die *in-vitro*-Ketonreduktion konnte nur in einem distinkten relativen Maximum beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Nach einer weiteren Gelfiltration wurde eine Diaphoraseaktivität der FNR sowie eine geringere mit der *in-vitro*-Ketonreduktion gekoppelte Diaphoraseaktivität gemessen (Abbildung 8.6). Die aufgereinigten Fraktionen 55-60 wurden bis zum Proteinfingerprint in Stickstoff eingefroren.

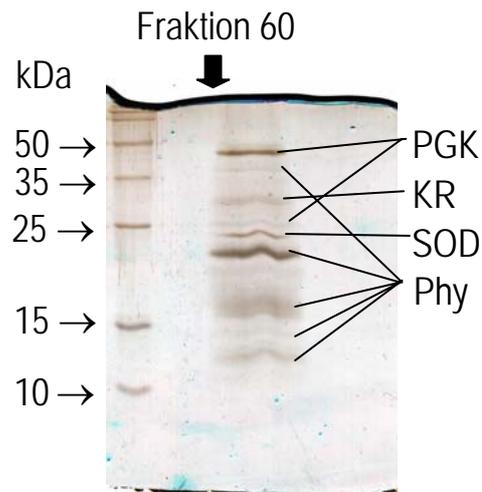
Die Korrelation mit Molekulargewichten von Eichproteinen ergab für die Elution des Maximums der *in-vitro*-Ketonreduktion ein mittleres Molekulargewicht von 47,9 kDa (Anhang 12.6.1).



**Abbildung 8.6:** Auftrennung der Aktivitäten nach dem zweiten Gelfiltrationsschritt. Relative Diaphoraseaktivität (■), *in-vitro*-Ketonreduktion (□).

### 8.3.3 Proteinfingerprint

Die Proben wurden im Acrylamidgel aufgetrennt und die Proteinbanden nach einem tryptischen Verdau in einem Massenspektrometer identifiziert. Jede Bande aus dem Gel konnte signifikant über einen Sequenzvergleich mit Proteindatenbanken erkannt werden. Neben der Superoxiddismutase und der Phosphofruktokinase war als einziges weiteres Enzym die 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase detektiert worden (Abbildung 8.7).



**Abbildung 8.7:** Identifizierte Banden im Proteinfingerprint. 15 % SDS-Page nach Silberfärbung. **PGK:** Phosphoglyceratkinase, **SOD:** Superoxiddismutase, **Phy:** Phycobilisomenstrukturprotein, **KR:** 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase.

Die Probe enthielt neben den drei Enzymen lediglich Fragmente des Lichtsammelkomplexes. Diese sind für die Blaufärbung der isolierten Fraktionen verantwortlich.

### 8.3.4 Diskussion

Die 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase (FabG) ist auch aufgrund ihrer natürlichen Katalysereaktion eine in Betracht zu ziehende Oxidoreduktase für Ketonreduktionen. In der Fettsäuresynthese ist sie für die Reduktion von 3-Ketoacyl-ACP zu 3-Hydroxyacyl-ACP unter Verbrauch von NADPH verantwortlich.

In Stämmen von *Anabaena* und *Nostoc* sind nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen (NRPS) und Polyketid-Synthetasen (PKS) nachgewiesen worden (Dittmann *et al.*, 2001). Diese können zur 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase homologe Enzyme enthalten, die Konkurrenzreaktionen zur gewünschten Ketonreduktion katalysieren. So würden sich die

geringen Enantiomerenüberschüsse für bestimmte Produkte der Biotransformationen mit Cyanobakterien erklären (siehe Kapitel 7.1.5).

Die Ermittlung der 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase als die ketonreduzierende Oxidoreduktase steht im Einklang mit allen gesammelten Ergebnissen. Als Enzym der Fettsäure-Synthetase ist sie in ihrer Aktivität von der Photosynthese entkoppelt. Die natürliche Funktion,  $\beta$ -Ketoester zu reduzieren (Stapleton und Jaworski, 1984), zeigt sich deutlich in der Reduktion von Ethyl-4-chloracetoacetat und Ethylbenzoylacetat. Dabei wird als einziger Kofaktor NADPH benötigt (Stapleton und Jaworski, 1984; Schujman und de Mendoza, 2005). Diese Ergebnisse werden sowohl durch eigene Messungen als auch durch Beobachtungen von Nakamura *et al.* (2002a) bestätigt.

Direkt nach der Ultrazentrifugation befindet sich die 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase noch im Komplex mit anderen Proteinkomponenten und eluiert in einem Maximum zusammen mit der FNR, die vermutlich im Komplex mit Bestandteilen der Phycobilisomen eluiert (Nakajima *et al.*, 2002). Daher wurde auch bei Dialysen das Molekulargewicht des Proteins auf > 60 kDa bestimmt. Ferner ist bekannt, dass die 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase häufig als Tetramer vorliegt (Shedon *et al.*, 1990; Shedon *et al.*, 1992; Veyron-Churlet *et al.*, 2004). Diese Struktur würde ohne ACP einer molekularen Masse von 102 kDa entsprechen. Im Anionentauscher werden die Proteinwechselwirkungen durch hohe Salzkonzentrationen geschwächt und es kommt zu einer Auftrennung von Protein-Komplexen. Die hervorgehenden Fraktionen mit *in-vitro*-Ketonreduktion enthalten noch ausreichend FNR-Bestandteile, um in der folgenden Gelfiltration erneut eine Auftrennung der Diaphoraseaktivität hervorzurufen. Da im Proteinfingerprint keine Bestandteile der FNR nachgewiesen werden können, ist die in den Proben gemessene Diaphoraseaktivität auf eine Aktivität der 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase zurückzuführen.

Das Enzym ist in allen Cyanobakterien vorhanden und aufgrund der dort vorliegenden Fettsäuresynthetase des Typs II (FAS II) so geartet, dass es neben seinem natürlichen Substrat auch andere Substrate nutzen kann (Stapleton und Jaworski, 1984).

Daher katalysieren auch Einzelkomponenten der FAS II, wie die 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase, im aufgereinigten Zustand die Ketonreduktionen. Ferner wurde berichtet, dass im Zellhomogenat ohne ACP durch die Zugabe von *E. coli*-ACP eine 20-fach gesteigerte Aktivität der Fettsäure-Synthetase gegenüber der Grundaktivität gemessen wird (Stapleton und Jaworski, 1984). Es ist daher gut möglich, dass die 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase auch heterolog exprimiert in Produktionsorganismen wie *E. coli* funktional sein könnte.

Die ausgeprägte S-Spezifität des Enzyms in *Synechococcus* PCC7942 muss eine spezielle Fähigkeit von Cyanobakterien sein, da homologe Enzyme in anderen Organismen eine deutlich R-orientierte Spezifität aufweisen (Ren *et al.*, 2000). Außerdem ist es bezüglich des

Substrates nicht nur auf eine bestimmte Fettsäurenkettenlänge festgelegt (Taguchi *et al.*, 1999).

Die Messungen zur *in-vitro*-Ketonreduktion (Kapitel 6.1.2) zeigten beste Aktivitäten bei Konzentrationen < 0,4 mM NADPH. Für *Anabaena variabilis* wurde eine Inhibierung der Fettsäure-Synthetase ab einer Konzentration von 0,5 mM NADPH beschrieben, welche im Einklang mit den Beobachtungen steht. Ferner wurde die FAS II von *Anabaena variabilis* ab einer Konzentration von 0,3 mM CoA zu 50 % inhibiert (Stapleton und Jaworski, 1984). Es gilt zu überprüfen, ob eine Anreicherung von CoA zur Inaktivierung der Reaktion führt.

Die schlechten Ergebnisse mit industriellen Chargen könnten die Folge der Verwendung ruhender Zellen sein. Aktivitäten der FAS II werden vor allem in wachsenden Zellen nachgewiesen (Schujman und de Mendoza, 2005). Sowohl Flechten als auch aufkonzentrierte Zellsuspensionen wachsen nicht und könnten daher durch die stringente Regulierung der FAS bis zur Formulierung an Aktivität verlieren. Ein Beweis hierfür ist jedoch schwer zu erbringen.

Während der Ketonreduktion kann die 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase nicht ihre Funktion in der Fettsäure-Synthetase erfüllen. Folglich verknappen die verfügbaren Fettsäuren in der Zelle. In der Konsequenz nimmt die Membranstabilität ab und könnte zu der beobachteten Lyse beitragen (siehe Kapitel 6.2.3-6.4.2).

#### 8.4 *In-silico* Analyse

Die ermittelte Proteinsequenz entspricht der 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase von *Synechococcus* PCC6301. *Synechococcus* PCC7942 ist eine Mutante dieses Stammes (persönliche Kommunikation mit dem Joint Genome Institute). Die Sequenz wurde unter der *Accession* Nummer YP\_399703 in der NCBI-Proteindatenbank durch das US DOE Joint Genome Institute eingereicht. Die Proteinsequenz ist in Tabelle 8.1 dargestellt.

Sie diene als Grundlage zur Ermittlung der Proteinstabilität, Faltung und für die Homologiesuche. Alle Daten wurden über mathematische Funktionen und Suchprogramme der ExPASy-Datenbank (siehe Kapitel 4.17) des Entrez-Servers erhoben.

**Tabelle 8.1:** Proteinsequenz der 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase

---

1	mtalpltdri alvtgasrgi graialelaa agakvavnnya ssagaadevv aaiaaaggea
61	favkadvsqe sevealfaav ierwgrldvl vnnagitrdt llirmkrddw qsvldlnlgg
121	vficsraaak imlkqrsgrl iniasvvgem gnpqqanysa akagvigltk tvakelasrg
181	tnavapgf iatdmtsela aekllevipl grygeaaeva gvvrfaadp aaayitgqvi
241	nidgglyvma

---

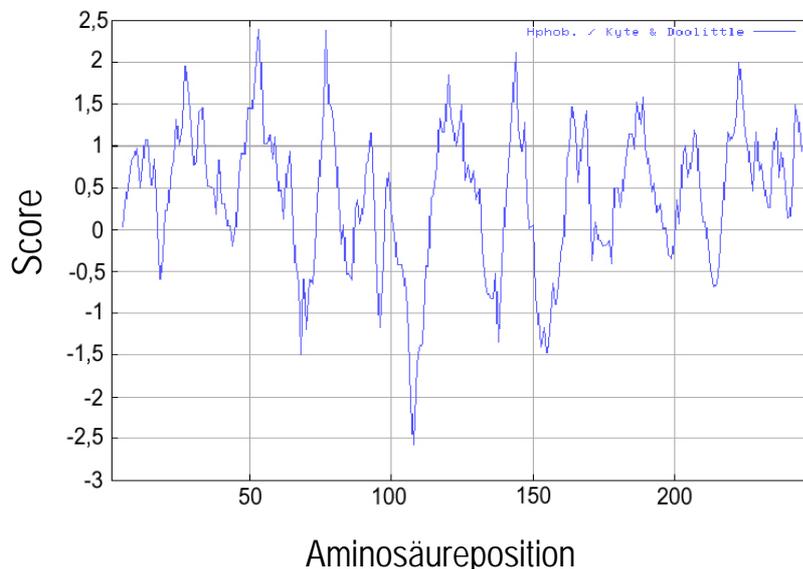
### 8.4.1 Proteinstabilität

Die *in-silico*-Analyse (ExpASy ProtParam-Tool) der 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase ergab, dass es sich bei diesem Enzym um ein stabiles Enzym handelt. Aufgrund der N-terminalen Sequenz mit Methionin wurde eine Halbwertszeit von > 10 h berechnet. Der aus der Aminosäure ermittelte Instabilitätsindex von 25,76 klassifiziert das Protein als stabil.

### 8.4.2 Proteinfaltung

Wie dem Hydropathie-Diagramm entnommen werden kann, existiert entlang der gesamten Aminosäuresequenz kein besonders hydrophober Bereich (Abbildung 8.8). Hingegen ist bei Position 110 ein ausgeprägt hydrophiler Bereich gegeben.

Die Aminosäuresequenz wurde auf die Ausbildung von Transmembranhelices mit den Programmen HMMTOP und SOSUI untersucht. Beide Programme konnten keinen Membrananker feststellen. SOSUI klassifizierte das Protein als löslich.



**Abbildung 8.8:** Hydropathie-Diagramm der 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase, berechnet nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982), erstellt mit dem Programm ProtScale.

### 8.4.3 Enzymkinetische Daten homologer Enzyme

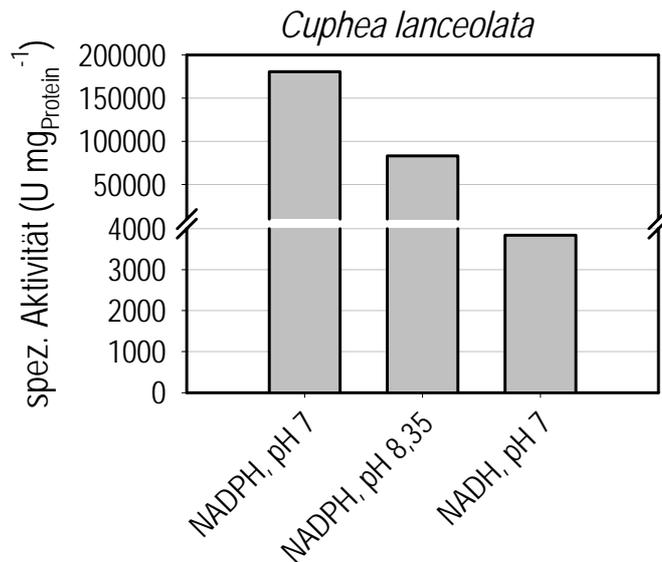
Mittels einer BLAST-Recherche wurde eine große Anzahl ähnlicher Sequenzen, vor allem bei phototrophen Organismen, entdeckt (Tabelle 8.2).

Die Aminosäuresequenz der 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase von *Synechococcus* PCC7942 besitzt einen konservierten Bereich, der besonders bei phototrophen Mikroorganismen anzutreffen ist. Auch höhere Pflanzen wie *Cuphea lanceolata* weisen deutliche Sequenzhomologien auf.

**Tabelle 8.2** Ergebnisse der Sequenzhomologie-Suche

Organismus	% Sequenzidentität	phototropher Mikroorganismus
<i>Anabaena sp. (strain PCC 7120)</i>	62	+
<i>Anabaena variabilis (strain ATCC 29413)</i>	61	+
<i>Synechococcus elongatus (Thermosynechococcus elongatus)</i>	62	+
<i>Synechocystis sp. (strain PCC 6803)</i>	59	+
<i>Synechococcus sp. (strain CC9605)</i>	61	+
<i>Synechococcus sp. (strain WH8102)</i>	59	+
<i>Crocospaera watsonii</i>	57	+
<i>Trichodesmium erythraeum IMS101</i>	58	+
<i>Synechococcus sp. (strain CC9902)</i>	60	+
<i>Prochlorococcus marinus (strain MIT 9313)</i>	57	+
<i>Prochlorococcus marinus (strain NATL2A)</i>	55	+
<i>Gloeobacter violaceus</i>	56	+
<i>Prochlorococcus marinus</i>	54	+
<i>Cuphea lanceolata</i>	54	-
<i>Heliobacillus mobilis</i>	54	+
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	53	+
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	52	-
<i>Chloroflexus aurantiacus J-10-fl</i>	52	+

Der breit gestreute Bereich der spezifischen Aktivitäten homologer Enzyme (Abbildung 8.9) lässt keine gesicherte Prognose bezüglich der spezifischen Aktivität des Enzyms aus *Synechococcus* PCC7942 zu. Die Aktivitäten bewegen sich zwischen 0,0032 U mg<sub>Protein</sub><sup>-1</sup> bei *E. coli* bis 180400 U mg<sub>Protein</sub><sup>-1</sup> bei *Cuphea lanceolata* (Köcherblümchen). Letztere zeigt eine 54 %ige Sequenzhomologie zur ermittelten Aminosäuresequenz des Enzyms aus *Synechococcus* PCC7942.



**Abbildung 8.9** Spezifischen Aktivitäten der 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase (Gluthation-S-Transferase-Fusionsenzym) von *Cuphea lanceolata*. Substrat: Acetoacetyl-CoA. (Klein *et al.*, 1992).

#### 8.4.4 Diskussion

Die ermittelte Aminosäuresequenz ergab bei Berechnungen der Hydropathie und Struktur, dass die 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase aus *Synechococcus* PCC7942 ein stabiles sowie lösliches Protein ohne Transmembranhelices ist. Daher könnte das Enzym heterolog in etablierten Expressionsorganismen hergestellt werden. Aufgrund der errechneten geringen Hydrophobizität sollte die Gefahr der Bildung von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) bei einer Expression minimal sein.

Eine Unbekannte ist die Bindungsstelle des Enzyms im Komplex der Fettsäure-Synthetase. Es ist nicht möglich vorherzusagen, ob aufgrund konservierter Bindungsmotive ein Einbau in die Fettsäure-Synthetase anderer Organismen stattfinden kann. Weder in *E. coli* noch in *S. cerevisiae* sind besondere Homologien zu dem Enzym vorhanden.

Die höchsten Sequenzübereinstimmungen von bis zu 62 % wurden bei phototrophen Mikroorganismen festgestellt.

Die in der Enzymdatenbank Brenda recherchierten Aktivitäten homologer Enzyme zeigen deutlich, dass für die Geschwindigkeit einer Biotransformation mit der 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase die Beschaffenheit des Substrates ausschlaggebend ist. Dies erklärt die unterschiedlichen Produktbildungskapazitäten bei verschiedenen Substraten.

Die hohen spezifischen Aktivitäten des Enzyms höherer Pflanzen lassen vermuten, dass sich unter den homologen Enzymen phototropher Organismen noch deutlich aktivere Enzyme als das von *Synechococcus* PCC7942 verbergen.

## 9 Zusammenfassung und Ausblick

Eine stereoselektive Herstellung chiraler Alkohole als Bausteine für Wirkstoffe in der Pharma-, Agro- und Nahrungsmittelindustrie ist mit phototrophen Mikroorganismen prinzipiell möglich. Die dabei verbrauchten Kofaktoren können mittels Photosynthese regeneriert werden. Die Etablierung eines industriellen Prozesses auf Basis von derartigen Photobiokatalysen ist aufgrund der Notwendigkeit von Photobioreaktoren, fehlender Modelle zur Maßstabsvergrößerung und der geringen Lichtpenetration in dichte Kulturen problematisch.

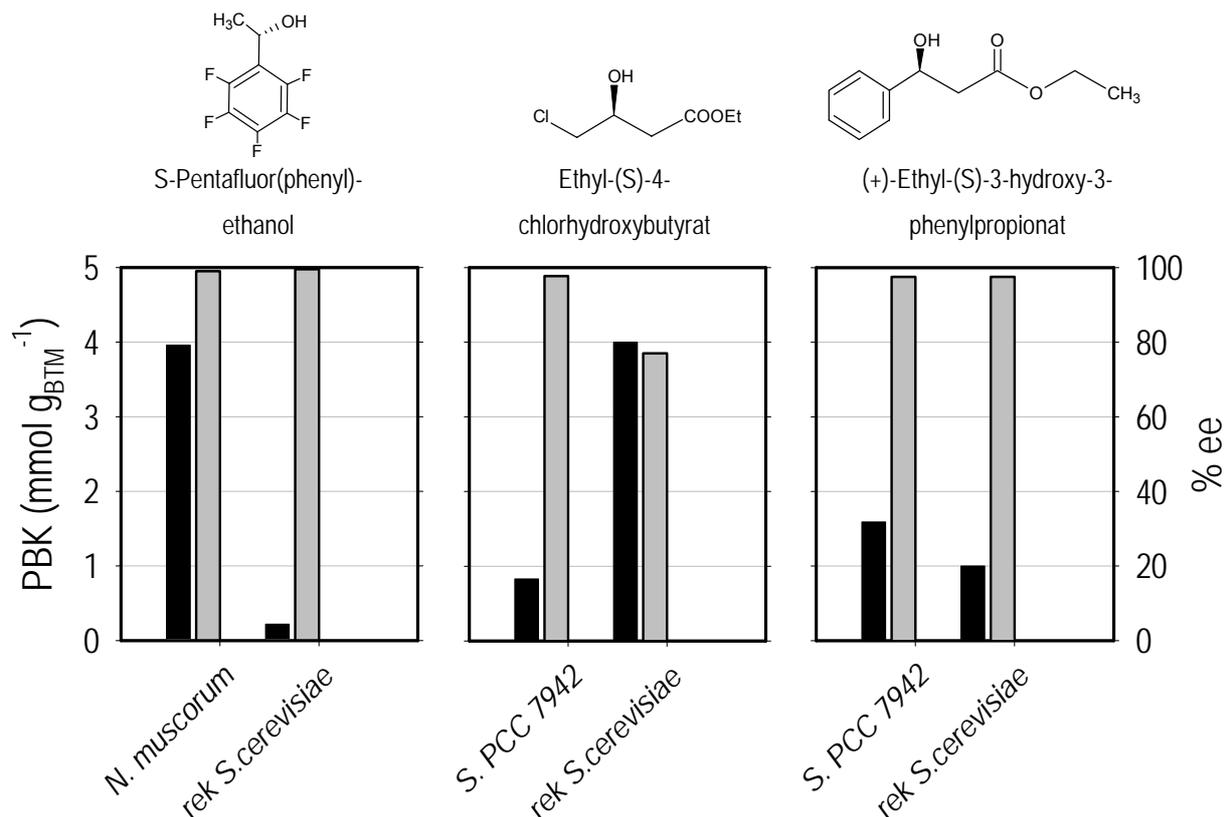
Um die Fähigkeit zur asymmetrischen Synthese von Cyanobakterien zu nutzen, war es Ziel dieser Arbeit Alternativen zur Kofaktorregenerierung mit Licht aufzuzeigen, das Potential ausgesuchter phototropher Mikroorganismen zur Ketonreduktion zu untersuchen und das Enzym zur asymmetrischen Synthese in *Synechococcus* PCC7942 rekombinant verfügbar zu machen.

Als Alternative zur Photobiokatalyse wurde eine asymmetrische Ketonreduktion von Cyanobakterien im Dunkeln reaktionstechnisch charakterisiert. Die Reduktion von 2'-3'-4'-5'-6'-Pentafluoracetophenon im Satzverfahren mit *Synechococcus* PCC7942 im Dunkeln lieferte mit 10 g L<sup>-1</sup> Glukose im Reaktionsmedium bei 20°C 1,82 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> S-Pentafluor(phenyl)-ethanol. Dieses Ergebnis liegt im gleichen Größenbereich wie von Photobiokatalysen mit 2 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>, wobei der Enantiomerenüberschuss unabhängig von Licht bei ≥99,8% lag. Diese asymmetrische Ketonreduktion ohne Licht wies eine deutliche Temperaturabhängigkeit auf. Die besten Ergebnisse wurden bei niedrigen Temperaturen von 20°C erzielt. Für die Reaktion im Dunkeln waren NADPH als einziger intrazellulärer Kofaktor sowie Glykogen als zellinterne Kohlenstoffquelle für die Energieerhaltung erforderlich.

Alle untersuchten Cyanobakterien zeigten ohne Licht asymmetrische Synthesen mit enantiomeren Überschüssen von ≥96,2-99,8% bei maximalen Produktkonzentrationen von 7,2 mM für (S)-Pentafluor(phenyl)-ethanol, 0,91 mM für (+)-Ethyl-(S)-3-hydroxy-3-phenylpropionat, 5,85 mM für Ethyl-(S)-4-chlor-hydroxybutyrat und 1,77 mM für (S)-1-(4-Chlorphenyl)-ethanol jeweils ausgehend von den korrespondierenden Ketonen. Die erreichten Produktbildungskapazitäten von 0,64-3,96 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> im Satzverfahren bei 20°C waren dabei substratabhängig und denjenigen typischer heterotropher Produktionsorganismen wie *L. kefir*, *S. cerevisiae* CBS 8066 und *S. cerevisiae* CM 3260 ebenbürtig bzw. konnten sie teilweise sogar übertreffen (Abbildung 9.1).

Die Regeneration der Kofaktoren bei der asymmetrischen Synthese von S-Pentafluor(phenyl)-ethanol lief, unabhängig von der Lichteinstrahlung, bei allen untersuchten Cyanobakterien unter Bildung von Acetat ab. Die bei dieser Biotransformation produzierte

Menge an Acetat von bis zu  $0,52 \text{ g L}^{-1}$  war stammabhängig und verursachte eine Änderung des pH von bis zu zwei Einheiten auf pH 5,3. Messungen mit dem Bac/Live®-Fluoreszenzfärbekit zur Detektion der Membranintegrität zeigten, dass die Biotransformation durch Desintegration der Zellmembran innerhalb von 10 h zum Erliegen kam. Glukose im Medium hatte hierbei einen deutlich stabilisierenden Effekt auf die Membranintegrität und bedingte folglich eine höhere von den Zellen erzeugte Produktkonzentration. Eine Metabolisierung der Glukose im Medium fand dabei nicht statt.



**Abbildung 9.1:** Vergleich der Produktbildungskapazitäten und Enantiomerenüberschüsse von Cyanobakterien mit der rekombinanten Hefe *S. cerevisiae* CM 3260 (Engelking *et al.*, 2006). Produktbildungskapazität (■); Enantiomerenüberschuss (▨).

Dieser Effekt der Membranperforation konnte durch den Einsatz von nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten, wie BMIM-PF<sub>6</sub>, als Extraktionsmittel für die Biotransformationsprodukte und –produkte für *Synechococcus* PCC7942 im Satzverfahren um >525 % verringert werden. Die in diesem 2-Phasensystem erhaltenen Produktkonzentrationen wiesen eine Biotransformation ohne Substrat- sowie Produktinhibierung nach und deckten eine Inaktivierung von *Synechococcus* PCC7942 bei einer gebildeten Produktkonzentration von 4 mM S-PFE auf.

Die Qualität des eingesetzten Biokatalysators *Synechococcus* PCC7942 konnte durch eine Medienoptimierung mit genetischen Algorithmen verbessert werden. Der Umsatz pro eingesetzte Biomassekonzentration wurde ausgehend vom Standardmedium BG-11 um den Faktor 5,6 auf 161,6 %  $\text{L g}_{\text{BTM}}^{-1}$  gesteigert. Ein Bezug phototropher Biokatalysatoren aus einer externen Produktionsstätte wäre jedoch selbst bei einer Erzeugung mit dem optimierten Medium problematisch, da ein geeignetes Konservierungsverfahren für die Organismen fehlt. Beispielsweise nahm bei der Verwendung von Gefriertrocknung die Produktbildungskapazität aller untersuchten Mikroorganismen um bis zu eine Zehnerpotenz ab.

Die reproduzierbare Herstellung des Biokatalysators *Synechococcus* PCC7942 konnte durch die Entwicklung eines modellgestützten Kultivierungsverfahrens in 250 mL Blasensäulen und in einem 20 L-Rührkesselreaktor im Satzverfahren unter externer artifizierter Beleuchtung erreicht werden.

Der entwickelte Prozess im 20 L-Rührkesselreaktor lieferte mit einem optimierten Lichtprofil nach 264 h eine Biotrockenmasse von 10 g. Die maximale Wachstumsrate von  $0,036 \text{ h}^{-1}$  überstieg bis zu 350 % die publizierten Wachstumsraten von *Synechococcus* PCC6301 bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Das entwickelte Anzuchtverfahren war auf andere phototrophe Mikroorganismen wie *Ananabaena variabilis* und *Nostoc muscorum* übertragbar.

Bei Kultivierungen von *Synechococcus* PCC7942 im Satzverfahren im 20 L-Rührkesselreaktor nahm mit zunehmender Zelldichte die verfügbare Lichtintensität für die Photosynthese ab. Folglich nahm der zellinterne Gehalt an Kohlenhydraten ausgehend von bis zu  $90 \text{ g L}^{-1}$  auf 0,5 % dieses Anfangsgehalts ab. Die Produktbildungskapazität von  $2,1 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$  verringerte sich aufgrund dessen in den nachfolgenden asymmetrischen Synthesen von S-PFE bei  $20^\circ\text{C}$  um  $1,23 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Da jedoch mit zunehmender Kultivierungszeit die Biomasse mit einem optimierten Lichtprofil exponentiell ansteigt, während die Produktbildungskapazität im gleichen Zeitraum nur in geringem Maß absinkt, wäre die Ernte zum spätest möglichen Zeitpunkt als sinnvoll anzusehen. Hierbei wären in der technischen Nutzung die Betriebskosten des Reaktors einzurechnen.

Eine Zellernte wäre folglich nach der letzten Erhöhung der Lichtintensität sinnvoll. Sie führt zu einem Kompromiss zwischen produzierter Biokatalysatormenge und dem Verlust der Produktbildungskapazität. Dieser Zeitpunkt wäre nach einer Kultivierungsdauer von 144 h bei einer mittleren Produktbildungskapazität für S-PFE von ca.  $1 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$  erreicht.

Um eine Alternative zur Ganzzellbiokatalyse mit phototrophen Mikroorganismen zu bieten, wurde die ketonreduzierende Oxidoreduktase aus *Synechococcus* PCC7942 isoliert. Nach einer Proteinreinigung mittels FPLC wurde sie über einen Proteinfingerprint als die 3-

Oxoacyl-(ACP)-Reduktase (FabG) [EC 1.1.1.100] identifiziert. Dieses Enzym ist Bestandteil der dissoziierten Fettsäure-Synthetase des Typs II. Sie ist in Bakterien und Pflanzen weit verbreitet und dient wie die nichtdissoziierte Fettsäuresynthetase des Typs I von tierischen Zellen, Hefen und Mycobakterien der *de novo* Synthese von Fettsäuren. Eine Homologierecherche ergab, dass die Sequenz der Oxidoreduktase von *Synechococcus* PCC7942 weitgehend nur Ähnlichkeiten mit Sequenzen phototropher Mikroorganismen aufweist.

Die *in-silico*-Analyse der Proteinsequenz ergab ein Enzym ohne Membrananker und ausgeprägten hydrophoben Regionen. Aufgrund dessen könnte es sich bei der 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase um ein potentiell heterolog exprimierbares Enzym handeln.

### **Ausblick**

Die Potentiale phototropher Mikroorganismen sind kaum ausgeschöpft, da bisher die Verwendung von Photobioreaktoren notwendig war. Die große Artenvielfalt dieser Mikroorganismen lässt auf noch viele unentdeckte Oxidoreduktasen schließen.

Es wäre daher konsequent weitere Stämme von Mikroalgen auf ihre Enzymaktivitäten mit unterschiedlichen Substraten sowie ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber Reaktionsbedingungen zu untersuchen. Ein rationelles Suchverfahren unter Zuhilfenahme der Sequenzdaten von Organismen mit hoher Aktivität könnte ein Sequenzmotiv liefern, das eine Vorauswahl potentieller Kandidaten erlaubt.

Für eine rekombinante Nutzung der 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase wäre es sinnvoll, die spezifische Aktivität des Enzyms unter optimalen Reaktionsbedingungen zu bestimmen. Einer erfolgreichen Expression in einem typischen Produktionsorganismus wie *E.coli* folgend, könnten die optimalen Reaktionsbedingungen (Pufferzusammensetzung, Temperatur, etc.) für die Enzymaktivität *in-vitro* angepasst werden. Basierend auf diesen Daten könnten alternative Produktionsorganismen ausfindig gemacht werden, die ein besseres *in-vivo* Reaktionsmilieu für das Enzym liefern.

Für eine technische Nutzung des isolierten Enzyms wäre es vorteilhaft, ein geeignetes Verfahren zur Rückfaltung des Proteins aus Einschlusskörpern zu entwickeln oder ein passendes Expressionssystem mit Sekretion ins Medium zu identifizieren. So könnte in Verbindung mit einem Marker (*tag*) bereits nach einer Einschrittreinigung ein technisch verwertbares Enzym gewonnen werden.

## 10 Literaturverzeichnis

**Acién Fernández FG**, Garcia Camacho F, Sanchez Perez JA, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E, (1997): A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnol Bioeng* 55, 701-714.

**Aiba S** (1982): Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 23, 85-156.

**Aiba S**, Shoda M, Nagatani M (1986): Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol Bioeng* 10, 845-864.

**Albertano P** (1991): Effects of monochromatic lights on four species of *Leptolyngbya*. *Algological Studies* 64, 199-214.

**Allen MM** (1968): Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. *J Phycol* 0, 1-4.

**Allen MM**, Smith AJ (1969): Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Arch Microbiol* 69, 114-120.

**Altenbach-Rehm J**, Nell C, Arnold M, Weuster-Botz D (1999): Parallel Bubble Columns with Fed-Batch Technique for Microbial Process Development on a Small Scale, *Chem. Eng. Technol.* 22, 1051-1058.

**Amato J** (1992): Looking glass chemistry. *Science* 256, 964-966.

**Amidjojo M**, Weuster-Botz D (2005): Asymmetric synthesis of the chiral synthon ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate using *Lactobacillus kefir*. *Tetrahedron: Asymmetry* 16, 899-901.

**Andrews JF** (1968): A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnol Bioeng* 10, 707-723.

**Angermann A**, Beuschel M, Rau M, Wohlfarth U (2003) „Matlab-Simulink-Stateflow“, Oldenbourg Verlag, München.

**Appel D**, Lutz-Wahl S, Fischer P, Schwaneberg U, Schmid RD (2001): A P450BM-3-mutant hydroxylates alkanes, cycloalkanes, arenas and heteroarenes. *J Biotechnol* 88, 167-171.

**Badger M** (2003): The roles of carbonic anhydrases in photosynthetic CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. *Photosynthesis Research* 77, 83-94.

**Bailey JE**, (1998): Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: Past accomplishments and future opportunities. *Biotechnol Prog* 14, 8-20.

- Bannister TT** (1979): Quantitative description of steady state, nutrient-saturated algal growth, including adaptation. *Limnol. Oceanogr.* 24 (1), 76–96.
- Bar R** (1986): Phase toxicity in multiphase biocatalysis. *Trends Biotechnol* 4 (7), 167-167.
- Barber J**, Andersson B, (1992): Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci* 17, 61-66.
- Barton JW**, Kuritz T, O'Connor LE, Ma CY, Maskarinec MP, Davison BH (2004): Reductive transformation of methyl parathion by the cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC7120. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 330-335.
- Becker T**, Liese A, Maskow T, Schippers A, Takors R, Ullber R (2005): in *Biotechnology 2020: From the Transparent Cell to the Custom-Designed Process: Large-scale biotechnology*. Bericht der europäischen Kommission, Ed. Krysa G, Marquardt R, DECHEMA e.V., Frankfurt, 52-57.
- Bertau M** (2002): Novel developments in biocatalytic organic chemistry. *Curr Org Chem* 6 (11), 987-1014.
- Bertau M**, Jörg G (2004): Saccharides as efficacious solubilisers for highly lipophilic compounds in aqueous media. *Bioorg Med Chem* 12 (11), 2973-2983.
- Bes MT**, Sancho J, Peleato ML, Medina M, Gómez-Moreno C, Fillat MF (2002): Purification of colored photosynthetic proteins for understanding protein isolation principles, *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31 (2), 119-122.
- Bishop RH** (1979): Regulatory characteristics of a fructose bisphosphatase from the blue-green bacterium *Anacystis nidulans*. *Arch Biochem Biophys* 196, 295-300.
- Bisswanger H** (2000): *Enzymkinetik: Theorie und Methoden* 3. neu bearbeitete Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 53-84.
- Blaschke G**, Kraft HP, Fickentscher K, Köhler F, (1979): Chromatographische Racemattrennung von Thalidomid und teratogene Wirkung der Enantiomere. *Arzneim Forsch* 29, 1640-1642.
- Bommarius AS**, Riebel BR (2004): *Biocatalysis*. Wiley-VCH, Weinheim, 1-14.
- Borodin VB**, Rao KK, Hall DO (2002): Manifestation of behavioural and physiological functions of *Synechococcus sp.* Miami BG 043511 in a photobioreactor. *Mar Biol* 140, 455-463.
- Borowitzka MA** (1995): Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J appl Phycol* 7, 3–15.

- Borowitzka MA**, Borowitzka LJ (1988): Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Brettel K** (1996): Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1318, 323-373.
- Breuer M**, Ditrich K, Habicher T, Hauer B, Keßler M, Stürmer R, Zelinski T (2004): Industrielle Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Zwischenprodukten. *Angew Chem* 116, 806-843.
- Bucciarelli M**, Forni A, Moretti I, Torre G (1983): Asymmetric Reduction of Trifluoromethyl and Methyl Ketons by Yeast; An Improved Method. *Synthesis*, 897-900.
- Carr NG**, Whitton BA (1973): The Biology Of Blue-Green Algae. Botanical Monographs Osney Mead, Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Carrillio N**, Vallejos RH (1983): The light-dependent modulation of photosynthetic electron transport. *Trends Biochem Sci* 8, 52-56
- Chang HN**, Lee WG, Kim BS, (1993): Cell retention culture with an internal filter module: Continuous ethanol fermentation. *Biotechnol Bioeng* 41, 677-681.
- Chen F** (1996): High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol* 14, 421-426.
- Chen F** (1999) High cell density culture of microalgae in bioreactor systems for the production of high-value products. Cyanobacterial and algal metabolism and environmental biotechnology. Tasneem Fatma New Dehli, India: Narosa publishing house, 73-80.
- Chênevert R.**, Fortier G, Rhalid RB (1992): Asymmetric Synthesis of Both Enantiomers of Fluoxetine via Microbial Reduction of Ethyl Benzoylacetate. *Tetrahedron* 48, 6769-6776.
- Chmiel H** (1991): Bioprozeßtechnik 1, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 86-114.
- Cohen Z** (1999): Chemicals from microalgae. Taylor & Francis, London.
- Cooper TG** (1981): Biochemische Arbeitsmethoden. De Gruyter, Berlin.
- Corey EJ**, Helal CJ (1998): Reduktion von Carbonylverbindungen mit chiralen Oxazaborolidin-Katalysatoren: eine neue enantioselektive Katalyse und leistungsfähige Synthesemethode. *Angew Chem* 110, 2092–2118.
- Cornet JF**, Dussap CG, Gros JB (1995): A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors. *Chem Eng Sci* 50, 1489-1500.

**Cornet JF**, Dussap CG, Gros JB (1998) in Scheper T, *Bioprocess and Algae Reactor Technology*. Apoptosis. Springer-Verlag, Berlin, 153-224.

**Cull SG**, Holbrey JD, Vargas-Mora V, Seddon KR, Lye GJ (2000): Roomtemperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. *Biotechnol Bioeng* 69 (2), 227-233.

**Cyanosite** (2002): [www-cyanosite.bio.purdue.edu/Protocols/cry.html](http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/Protocols/cry.html), stand 07.08.02

**D'Arrigo P**, Fuganti C, Pedrocchi G, Fantoni P, Servi S (1998): Extractive biocatalysis: A powerful tool in selectivity control in yeast biotransformation. *Tetrahedron* 54, 15017–15026.

**DECHEMA** (2004): Weiße Biotechnologie: Chancen für Deutschland. Positionspapier der DECHEMA e.V., Frankfurt.

**Dittmann E**, Christiansen G, Neilan BA, Fastner J, Rippka R, Börner T (1999): Peptide synthetase genes occur in various species of cyanobacteria. In: Peschek GA, Löffelhardt W, Schmetterer G: *The phototrophic prokaryotes*. Kluwer, New York, 615–621.

**Dittmann E**, Neilan BA, Börner T (2001): Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 57, 467-473.

**Dittmann E**, Neilan BA, Erhard M, Döhren H von, Börner T (1997): Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol Microbiol* 26, 779–784.

**Doyon JB**, Jain A (1999): The pattern of fluorine substitution affects binding affinity in a small library of fluoroaromatic inhibitors for carbonic anhydrase. *Org Lett* 1 (2), 183-185.

**Dwivedi ASK**, Rice KA, Bullerjahn GS (2000): Growth phase and metal-dependent regulation of the *dpsA* gene in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Arch Microbiol* 173, 352-357.

**Eckstein M**, Daußmann T, Kragl U (2004): Recent developments in NAD(P)H regeneration for enzymatic reductions in one- and two-phase systems. *Biocatal Biotransform* 22, 89-96.

**Eilers PHC**, Peeters JCH (1988): A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol Model* 42, 199-215.

**Eley JH** (1971): Effects of carbon dioxide on pigmentation in the blue-green algae *Anacystis nidulans*. *Plant Cell Physiol* 12, 311-316.

**Enders D** (1984): In *Asymmetric Synthesis* Bd. 3, Morrison JD, Academic Press, Orlando, 275–339.

- Engelking H**, Pfaller R, Wich G, Weuster-Botz D (2004): Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro acetoacetate with recombinant *Pichia pastoris*. *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 3591-3593.
- Engelking H**, Pfaller R, Wich G, Weuster-Botz D (2006): Reaction engineering studies on  $\beta$ -ketoester reduction with whole cells of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*." *Enzyme Microb Technol* 38, 536-544.
- EuropaBio** (2003): White Biotechnology: Gateway to a more sustainable future. EuropaBio, Lyon, April 2003.
- Faber K** (1997): Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook. Springer Verlag, Berlin, 1-24.
- Fairbanks G**, Steck TL, Wallach DF (1971): Electrophoretic analysis of major polypeptides p human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10, 2606-2617.
- Fewson CA**, Al-Hafidh M, Gibbs M. (1962) Role of aldolase in photosynthesis. I. Enzyme studies with photosynthetic organisms with special reference to blue-green algae. *Plant Physiol.* 37, 402-406.
- Fling SP**, Gregerson DS (1986): Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155, 83-88.
- Forti G** (1971): NADPH-cytochrome f reductase from spinach. *Methods Enzymol* 23, 447-451.
- Fredrickson AG**, McGee RD, Tsuchiya HM (1970): Mathematical models in fermentation processes. *Adv Appl Microbiol* 23, 419.
- Fujita Y**, Ohki K, Murakami A. (1985): Chromatic regulation of photosystem composition in the photosynthetic system of red and blue-green algae. *Plant Cell Physiol* 26, 1541-1548.
- Gasteiger E**, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2003): ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-3788.
- Gasteiger E**, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005): Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Walker JM: The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, Totowa, USA, 571-607.
- Gimmler H**, Degehardt B (2001): Alkaliphilic and alkali-tolerant algae, algal adaptation to environmental stresses. Rai LC, Gaur JP, Springer, Berlin Heidelberg New York.

- Glombitza KW**, Koch M (1989): Secondary metabolites of pharmaceutical potential. In Cresswell RC, Rees TAV, Shah H, Algal and Cyanobacterial Biotechnology. Longman Scientific, London, 161–238.
- Goméz-Lojero C**, Pérez-Gómez B, Shen G, Schluchter WM, Bryant DA (2003): Interaction of Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> Oxidoreductase with Phycobilisomes and Phycobilisome Substructures of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002, *Biochemistry* 42, 13800-13810.
- Greiner L**, Müller DH, Ban van den ECD, Wöltinger J, Wandrey C, Liese A (2003): Membrane aerated hydrogenation: Enzymatic and chemical homogenous catalysis. *Adv Synth Catal* 345, 679-683.
- Grobbelaar JU** (2000): Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *J Appl Phycol* 12, 201–206.
- Gröger H**, Hummerl W, Buchholz S, Drauz K, Nvan Nguyen T, Rollmann C, Hüsen H, Abokitse H (2003): Practical asymmetric enzymatic reduction through discovery of a dehydrogenase-compatible biphasic reaction media. *Org Lett* 5, 173-176.
- Haberland J**, Kriegesmann E, Wolfram E, Hummel W, Liese A (2002): Diastereoselective synthesis of optically active (2R,5R)-Hexanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 58, 595-599.
- Häder DP** (1999): Photosynthese. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. S. 171
- Hage A**, Petra DGI, Field JA, Schipper D, Wijnberg JBPA, Kamer PCJ, Reek JNH, van Leeuwen PWNM, Wever R, Schmoemaker HE, (2001): Asymmetric reduction of ketones via whole cell bioconversions and transfer hydrogenation: complementary approaches. *Tetrahedron: Asymmetry* 12, 1025-1034.
- Hahn T**, Botzenhart K (2001): Solvent-resistant microorganisms. Handbook of solvents Ed. Wypych G Toronto, New York: ChemTec Publishing, 865-871.
- Halling P** (1994): Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb Technol* 16, 178-206.
- Harano K**, Ishida H, Kittaka R, Inoue KKN, Tsukamoto M, Satoh R, Himeno M, Iwaki T, Wadano A (2003): Regulation of the Expression of ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase/oxygenase (EC 4.1.1.39) in a cyanobacterium, *Synechococcus* PCC7942. *Photosynth Res* 78, 59-65.
- Hedren RW**, Boch K (1980): Fatty acid synthetases from *Euglena gracilis*. Separation of component activities of the ACP-dependent fatty acid synthetase and partial purification of the beta-ketoacyl-ACP synthetase. *J Biol Chem* 255, 1504-1508.

- Heinemann M**, Kümmel A, Giesen R, Ansorga-Schumacher MB, Büchs J (2003): Experimental and theoretical analysis of phase equilibria in a two-phase system used for biocatalyzed esterifications. *Biocatal Biotransform* 21, 115-121.
- Heukeshofen J**, Dernik R (1988): Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit I. Staining of sodium dodecyl sulphate gels. *Elektrophoresis* 9, 28.
- Heyer H**, Stal LJ, Krumbein WE (1989): Simultaneous heterolactic and acetate fermentation in the marine cyanobacterium *Oscillatoria limosa* incubated anaerobically in the dark. *Arch Microbiol* 151, 558-564.
- Himeda Y**, Onozawa-Komatsuzaki N, Sugihara H, Arakawa H, Kasuga K (2003): Transfer hydrogenation of a variety of ketones catalyzed by rhodium complexes in aqueous solution and their application to asymmetric reduction using chiral Schiff base ligands. *J Mol Catal A-Chem* 195, 95-100.
- Hirokawa T**, Boon-Chieng S, Mitaku S (1998): SOSUI: classification and secondary prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14, 378-379.
- Hoare DS**, Ingram LO, Thurston EL, Walkup R (1971): Dark heterotrophic growth of an endophytic blue-green alga. *Arch Microbiol* 78, 310-321.
- Holland JH** (1975): Adaption in natural and artificial Systems. Ann Harbor: The University of Michigan Press.
- Hook IL**, Ryan S, Sheridan H (1999): Biotransformation of aromatic aldehydes by five species of marine microalgae. *Phytochemistry* 51, 621-627.
- Howarth J**, James P, Dai JF (2001): Immobilized baker's yeast reduction of ketones in an ionic liquid, [bmim] PF<sub>6</sub> and water mix. *Tetrahedron Lett* 42 (42), 7517-7519.
- Hummel W** (1990): Reduction of acetophenone to R(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Appl Microbiol Biotechnol* 34 (1), 15-19.
- Hummel W**, Abokitse K, Drauz K, Rollmann C, Gröger H (2003): Towards a Large-Scale Asymmetric Reduction Process with Isolated Enzymes: Expression of an (S)-Alcohol Dehydrogenase in *E. coli* and Studies on the Synthetic Potential of this Biocatalyst. *Adv Synth Catal* 345, 153-159.
- Jüttner F**, Hans R (1986): The reducing capacities of cyanobacteria for aldehydes and ketones. *Appl Microbiol Biotechnol* 25, 52-54.

- Kataoka M**, Kita K, Wada M, Yasohara Y, Hasegawa J, Shimizu S (2003): Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* 62, 437-445.
- Kawamura M**, Mimuro M, Fujita Y (1979): Quantitative relationship between two reaction centers in the photosynthetic system of blue-green algae. *Plant Cell Physiol* 20, 697-705.
- Kirk JTO** (1968): Studies on the dependence of chlorophyll synthesis on protein synthesis in *Euglena gracilis*, together with a nomogram for determination of chlorophyll concentration. *Planta* 78, 200-207.
- Kirk JTO** (1994): Light and photosynthesis in aquatic systems. Cambridge University Press, Cambridge.
- Klein B**, Pawlowski K, Köricke-Grandpierre C, Schell J, Töpfer R (1992): Isolation and characterization of a cDNA from *Cuphea lanceolata* encoding a  $\beta$ -ketoacyl-ACP reductase. *Mol Gen Genet* 233, 122-128.
- Kleinkauf H**, Döhren H von (1996): A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur J Biochem* 236,335–351.
- Kodani S**, Ishida K, Murakami M (1998): Dehydroradiosumin, a trypsin inhibitor from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J Nat Prod* 61, 854–856.
- Kometani T**, Yoshii H, Matsuno R (1996): Large-scale production of chiral alcohols with bakers' yeast. *J Mol Catal B-Enzym* 1 (2), 45-52.
- Kondo T**, Mori T, Lebedeva NV, Aoki S, Ishiura M, Golden SS (1997): Circadian rhythms in rapidly dividing cyanobacteria. *Science* 275, 224-227.
- Koolman J**, Röhm KH (2003): Taschenatlas der Biochemie 3. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 128-129.
- Kragl U**, Eckstein M, Kaftzik N (2002): Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr Opin Biotechnol* 13, 565-571.
- Krüger GHJ**, Eloff JN (1981): in Grobbelaar JU, Soeder CJ, Toerien DF, Wastewater for Aquaculture. University of Orange Free State Publication, Series C (no.3), Bloemfontein, South Africa, 16-23.
- Kruse O** (2001): Light-induced short-term adaptation mechanisms under redox control in the PS II-LHCII supercomplex: LHC II state transitions and PS II repair cycle. *Naturwissenschaften* 88, 284-292.
- Kyte J**, Doolittle RF (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132.

- Lagarias JC**, Reeds JA, Wright MH, Wright PE (1998): Convergence Properties of the Nelder-Mead Simplex Method in Low Dimensions. *SIAM J. Optim.* 9, 1, 112-147.
- Lau RH**, McKenzie MM, Doolittle WF (1977): Phycocyanin synthesis and degradation in the blue-green bacterium *Anacystis nidulans*. *J Bacteriol* 132, 771-778.
- Laws EA**, Terry KL, Wichman J, Chalup MS, (1983): A simple algal production system designed to utilize the flashing light effect. *Biotechnol Bioeng* 25, 2319-2335.
- Leach CK**, Carr NG (1970): Electron transport and oxidative phosphorylation in the blue-green algae *Anabaena variabilis*. *J Gen Microbiol* 64, 55-70.
- León R**, Fernandes P, Pinheiro HM, Cabral JMS (1998): Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb Technol* 23 (7-8), 483-500.
- León R**, Garbayo I, Hernández R, Vígara J, Vilchez C (2001): Organic solvent toxicity in photoautotrophic unicellular microorganisms. *Enzyme Microb Technol* 29 173-180.
- Lepp PW**, Schmidt TM (1998): Nucleic acid content of *Synechococcus spp.* during growth in continuous light and light/dark cycles. *Arch Microbiol* 170, 201-207.
- Liese A**, Seelbach K, Wandrey C (2000): Industrial Biotransformations. Wiley VCH, Weinheim, 58-63, 98-171.
- Lottspeich F**, Zorbas H (1998): Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Lorraine K**, King S, Greasham R, Chartrain M (1996): Asymmetric bioreduction of a ketosulfone to the corresponding trans-hydroxysulfone by the yeast *Rhodotorula rubra* MY 2169. *Enzyme Microb Technol* 19 (4), 250-255.
- Lu YJ**, Zhang YM, Rock CO (2004): Product diversity and regulation of type II fatty acid synthases. *Biochem Cell Biol* 82, 145-155.
- Luo HP**, Kemoun A, Al-Dahhan MH, Fernández Sevilla JM, Garcia Sánchez JL, Garcia Camacho F, Molina Grima E (2003): Analysis of photobioreactors for culturing high-value microalgae and cyanobacteria via an advanced diagnostic technique: CARPT. *Chem Eng Sci* 58, 2519-2527.
- Marahiel MA**, Stachelhaus T, Mootz HD (1997): Modular peptide synthetases involved in peptide synthesis. *Chem Rev* 97, 26511–26573
- Margheri MC**, Allotta G (1993): Homoacetic fermentation in the cyanobacterium *Nostoc sp.* strain Cc from *Cycas circinalis*. *FEMS Microbiol Lett* 111, 213-218.
- Margolin AL** (1996): Novel crystalline catalysts. *Trends Biotechnol* 14, 223-230.

- Märkl H** (1980): Modeling of algal production systems. Amsterdam, Elsevier. 361-383.
- Matsuda T**, Nakajima Y, Harada T, Nakamura K (2002): Asymmetric reduction of simple aromatic ketones with dried cells of *Geotrichium candidum*. *Tetrahedron: Asymmetry* 13, 971–974.
- Matsumoto M**, Isken S, De Bont JAM (2001): Organic solvents in microbial production processes. Handbook of solvents. Wypych G Toronto, New York: ChemTec Publishing, 856-880.
- Matthijs HCP**, Lubberding HJ (1988): Dark respiration in cyanobacteria. In: Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria. Rogers, LJ, Gallon, JR, Clarendon Press, Oxford. 131-145.
- Mauerer SC**, Schulze H, Schmid RD, Urlacher V (2003): Immobilisation of P 450 BM-3 and NADP<sup>+</sup> cofactor recycling system: towards technical application of heme-containing monooxygenases in fine chemical synthesis. *Adv Synth Catal* 345, 802-810.
- Merchuk JC**, Ronen M, Giris S, Arad S (1998): Light/Dark cycles in the growth of red microalgae *Phorphyridium Sp.* *Biotechnol Bioeng* 59 (6), 705-713.
- Mertens R**, Geiner L, Ban van den ECD, Haaker HBCM, Liese A (2003): Practical applications of hydrogenase I from *Pyrococcus furiosus* for NADPH generation and regeneration. *J Mol Catal B-Enzymatic* 24-25, 39-52.
- Metting B**, Pyne JW (1986): Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb Technol* 8: 386–394.
- Michal G** (1999): Biochemical Pathways. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 198-200.
- Mitaku S**, Hirokawa T (1999): Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins: hydrophobicity of helical segments and protein length. *Protein Eng* 12, 953-957.
- Mitaku S**, Hirokawa T, Tsuji T (2002): Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane-water interfaces. *Bioinformatics* 18, 608-616.
- Moezelaar R**, Bijvank SM, Stal LJ (1996): Fermentation and sulfur reduction in the mat-building cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Appl Environ Microbiol* 62, 1752-1758.
- Moezelaar R**, Stal LJ (1994): Fermentation in the unicellular cyanobacterium *Microcystis PCC7806*. *Arch Microbiol* 162, 63-69.

- Moezelaar R**, Stal LJ (1997): A comparison of fermentation in the cyanobacterium *Microcystis* PCC7806 grown under a light-dark cycle and continuous light. *Eur J Phycol* 32, 373-378.
- Molina Grima E**, Ación Fernández FG, Garcia Camacho F, Chisti Y (1999): Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *J Biotechnol* 70, 231-247.
- Mörschel E**, Wehrmeyer W, Koller KP (1980): Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea*. Elektron microscopical and biochemical analysis of B-phycoerythrin and B-phycoerythrin-C-phycoerythrin aggregates. *Eur J Cell Biol* 21, 319-327.
- Muller-Feuga A**, Moal J, Kaas R (2003): The microalgae for aquaculture. In: Stottrup JG, McEvoy LA Life feeds in marine aquaculture. Blackwell, Oxford.
- Nakajima M**, Sakamoto T, Wada K (2002): The Complete Purification and Characterization of Three Forms of Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Oxidoreductase from a Thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Plant Cell Physiol.* 43 (5), 484-493.
- Nakamura K**, Kawai Y, Nakajima N, Ohno AJ (1991): Stereochemical control of microbial reductions. 17. A method for controlling the enantioselectivity of reductions with bakers' yeast. *J Org Chem* 56, 4778-4783.
- Nakamura K**, Yamanaka R, Tohi K, Hamada H (2000): Cyanobacterium-catalyzed asymmetric reduction of ketones. *Tetrahedron Lett* 41, 6799-6802.
- Nakamura K**, Yamanaka R (2002a): Light mediated cofactor recycling system in biocatalytic asymmetric reduction of ketone. *Chem Commun*, 1782-1783.
- Nakamura K**, Yamanaka R (2002b): Light-mediated regulation of asymmetric reduction of ketones by a cyanobacterium. *Tetrahedron: Asymmetry* 16, 2529-2533.
- Nakamura K**, Yamanaka R, Matsuda T, Harada T (2003): Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry* 14 (18), 2659-2681.
- Nishiwaki T**, Iwasaki H, Ishiura M, Kondo T (2000): Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (1), 495-499.
- Noma Y**, Asakawa Y (1992): Enantio- and stereoselectivity in the biotransformation of carveols by *Euglena gracilis* Z. *Phytochemistry* 31 (6), 2009-2011.
- Nultsch W** (1996): Allgemeine Botanik 10. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.85-345.
- Ogawa T**, Kaplan A. (2003): Inorganic Carbon Acquisition Systems in Cyanobacteria. *Photosynthesis Research* 77, 105-115.

- Ogbonna JC**, Tanaka H (2000): Light requirement and photosynthetic cell cultivation: development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *J Appl Phycol* 12, 207-218.
- Ohkuma T**, Koizumi M, Muniz K, Hilt K, Kabuto C, Noyori R (2002): trans-RuH( $\eta^1$ -BH<sub>4</sub>)(binap)(1,2-diamine): A Catalyst for Asymmetric Hydrogenation of Simple Ketones under Base-Free Conditions. *J Am Chem Soc* 124, 6508-6509.
- Oren A**, Shilo M (1979): Anaerobic heterotrophic dark metabolism in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*: sulfur respiration and lactate fermentation. *Arch Microbiol* 122, 77-84.
- Panda D**, DeLuca K, Williams D, Jordan MA, Wilson L (1998): Antiproliferative mechanism of action of cryptophycin-52: kinetic stabilization of microtubule dynamics by high-affinity binding to microtubule ends. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9313–9318.
- Pandey R**, Chauhan S, Singhal GS, Kale RK (2000): Spectral Light Quality Affects Protein Profile of *Synechococcus* sp. PCC 7942: A Comparative 2-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DGE) Analysis. *Curr Microbiol* 40, 297-301.
- Patel RN** (2002): Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme Microb Technol* 31 (6), 804-826.
- Pearce J**, Carr NG (1969) The incorporation and metabolism of glucose by *Anabaena variabilis*. *J Gen Microbiol* 54, 451-462.
- Pelroy RA**, Rippka R, Stanier RY (1972): Metabolism of glucose by unicellular blue-green algae. *Arch Microbiol* 87, 303-322.
- Pereira RS** (1998): The Use of Baker's Yeast in the Generation of Asymmetric Centers to Produce Chiral Drugs and Other Compounds. *Crit Rev Biotechnol* 18, 25-64.
- Peschek GA**, Schmetterer GA (1982): Evidence for Plastoquinol-cytochrome f/b-563 reductase as a common electron donor to P700 and cytochrome oxidase in cyanobacteria. *Biochem Biophys Res Commun* 108, 1188-1195.
- Pfruender H**, Amidjojo M, Kragl U, Weuster-Botz D.(2004): Efficient Whole-Cell Biotransformation in a Biphasic Ionic Liquid/Water System. *Angew Chem Int Ed* 43, 4529-4531.
- Pons A**, Roca P, Aguiló C, Garcia FJ, Alemany M, Palou A, (1981), A Method for the simultaneous Determination of total carbohydrate and glycerol in biological samples with the anthrone reagent, *J Biochem Biophys Methods* 4, 227-231
- Pulz O** (2001): Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 57, 287-293.

**Pulz O**, Gross W, (2004): Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65 (6), 635-648.

**Pulz O**, Scheibenbogen K (1998): Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. Scheper T: Bioprocess and algae reactor technology, apoptosis. (Advances in biochemical engineering/biotechnology, 59) Springer, Berlin Heidelberg New York, 123-151.

**Rantwijk van F**, Lau RM, Sheldon RA (2003): Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends Biotechnol* 21, 131-138.

**Rautenstrauch V**, Hoang-Cong X, Churlaud R, Abdur-Rashid K, Morris RH (2003): Hydrogenation versus Transfer Hydrogenation of Ketones: Two Established Ruthenium Systems Catalyze Both. *Chem-Eur J* 9 (20), 4954-4967.

**Raven JA** (2003): Inorganic carbon concentrating mechanisms in relation to the biology of algae." *Photosynth Res* 77, 155-171.

**Rechenberg I** (1973): Evolutionsstrategie. Friedrich Fromman Verlag, Stuttgart.

**Ren Q**, Sierro N, Withold, Kessler B (2000): FabG, an NADPH-Dependent 3-Ketoacyl Reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, Provides Precursors for Medium-Chain-Length Poly-3-Hydroxyalkanoate Biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182 2978-2981.

**Richter G** (1998): Stoffwechselfysiologie der Pflanzen, 6. Aufl., Thieme, Stuttgart. 159-194

**Rippka R (2002)**: persönliche Kommunikation

**Rippka R**, Herdman M, Stanier RY (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111 (2), 1-61.

**Robertson DE**, Steer BA (2004): Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. *Curr Opin Chem Biol* 8 (2), 141-149.

**Rotthaus O**, Krüger D, Demuth M, Schaffner K (1997): Reductions of keto esters with bakers' yeast in organic solvents – a comparison with the results in water. *Tetrahedron* 53, 935–938

**Rubio FC**, Camacho FG, Sevilla JMF, Christ Y, Molina Grima E, (2003): A Mechanistical Model of Photosynthesis in Microalgae. *Biotechnol Bioeng* 81 (4), 459-473.

**Saeki K** (2004): Electron transport to Nitrogenase: diverse routes for a common destination. Klipp W, Masepohl B, Gallon JR, Newton WE, Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. 271f

- Sakai M**, Ogawa T, Matsuoka M, Fukuda H (1997): Photosynthetic Conversion of Carbon Dioxide to Ethylene by the Recombinant Cyanobacterium, *Synechococcus sp.* PCC 7942, Which Harbors a Gene for the Ethylene-Forming Enzyme of *Pseudomonas syringae*. *J Ferment Bioeng* 84 (5), 434-443.
- Sánchez Miron A**, Garcia MC, Camacho FG, Molina Grima E, Chisti Y 31 (2002): Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture." *Enzyme Microb Technol* 31, 1015-1023.
- Sancho J**, Peleato ML, Gomez-Moreno C, Edmondson DE (1988): Purification and properties of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena variabilis*. *Arch Biochem Biophys* 260, 200-207.
- Sandes JM**, Ringstad T, Wenn D, Heyerdahl PH, Källqvist T, Gíslérud HR (2006): Real-time monitoring and automatic density control of large-scale microalgal cultures using near infrared (NIR) optical density sensors." *J Biotechnol* 122 (2), 209-215.
- Sardesai YN**, Bhosle S (2004): Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. *Biotechnol Prog* 20 (3), 655-660.
- Sauer J**, Görl M, Forchhammer K (1999): Nitrogen starvation in *Synechococcus* PCC 7942: involvement of glutamine synthetase and NtcA in phycobiliprotein degradation and survival. *Arch Microbiol* 172, 247-255.
- Scanlan DJ**, Sundaram S, Newman J, Mann NH, Carr NG (1995): Characterization of a zwf Mutant of *Synechococcus sp.* Strain PCC 7942." *J Bacteriol* 177 (9), 2550-2553.
- Schäfer H**, Nau K, Sickmann A, Erdman R, Meyer HE (2001): Identification of peroxisomal membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Elektrophoresis* 22, 2955-2968.
- Scherer S**, Alpes I, Sadowski H, Böger P (1988): Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase is the respiratory NADPH dehydrogenase of the cyanobakterium *Anabaena variabilis*. *Arch Biochem Biophys* 267, 288-235.
- Schlegel HG** (1992): Allgemeine Mikrobiologie. New York: Thieme Verlag Stuttgart. 134-142, 397-425.
- Schmid A**, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B (2001): Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409 (6817), 258-268.
- Schomburg I**, Chang A, Ebeling C, Gremse M, Heldt C, Huhn G, Schomburg D (2004): BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. *Nucleic Acids Res* 32, D431-D433.

- Schmetterer G**, (1994): Cyanobacterial Respiration. In: *Advances in Photosynthesis: The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Ed. Donald A. Bryant, 409-434.
- Schrautemeier B**, Böhme H, Böger P (1985): Reconstitution of a light-dependent nitrogen-fixing and transhydrogenase system with heterocyst thylakoids. *Biochim Biophys Acta* 807, 147-154.
- Schujman GE**, De Mendoza D. (2005): Transcriptional control of membrane lipid synthesis in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 8, 149-153.
- Scopes RK** (1994): *Protein Purification principles and practice*, 3. Auflage, Springer Verlag, New York, S. 39ff, 76-85, 146f, 294ff.
- Seelbach K**, Riebel B, Hummel W, Kula M, Tishkov VI, Egerov AM, Wandrey C, Kragl U (1996): A Novel, Efficient Regenerating Method of NADPH Using a New Formate Dehydrogenase. *Tetrahedron Lett* 37 (9), 1377-1380.
- Shay LK**, Hunt HR, Wegner GH, (1987): High-productivity fermentation process for cultivating industrial microorganisms. *J. Ind. Microbiol* 2, 79-85.
- Sheldon PS**, Kekwick RGO, Sidebottom C, Smith CG, Slabas AR (1990): 3-Oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase from avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. *Biochem J* 271, 713-720.
- Sheldon PS**, Kekwick RGO, Smith CG, Sidebottom C, Slabas AR (1992): 3-Oxoacyl-[ACP] reductase from oil seed rape (*brassica napus*). *Biochim Biophys Acta* 1130, 151-159.
- Shimoda K**, Kubota N, Hamada H, Kajib M, Hirata T (2004): Asymmetric reduction of enones with *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 1677-1679.
- Shin M** (1971): Ferredoxin-NADP reductase from spinach. *Meth Enzymology* 23, 440-447.
- Singh IP**, Milligan KE, Gerwick WH (1999): Tanikolide, a toxic and antifungal lactone from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J Nat Prod* 62, 1333-1335.
- Singh M**, Sharma R, Banerjee UC (2002): Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv* 20(5-6), 341-359.
- Sivonen K**, Jones G (1999): Cyanobacterial toxins. Chorus I, Bertram J, *Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health significance, monitoring and management*. Spon, Lonon, 41-111.
- Slusarczyk H**, Felber S, Kula MR, Pohl M (2000): Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Eur J Biochem* 267, 1280-1289.

- Smith AJ** (1982): Modes of cyanobacterial carbon metabolism. *The Biology of Cyanobacteria*. Carr NG, Whitton BA, Blackwell Scientific, Oxford, 47-85.
- Stal LJ** (1992): Poly(hydroxyalkanoate) in cyanobacteria: an overview. *FEMS Microbiol Rev* 103, 169-180.
- Stal LJ**, Moezelaar R (1997): Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 21, 179-211.
- Stapleton SR**, Jaworski JG (1984): Characterization of fatty acid biosynthesis in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Biochim Biophys Acta* 794, 249-255.
- Steele JH** (1977): In: Lapidus, L, Amundson NR, *Microbial Kinetics and Dynamics in Chemical Reactor Theory*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 405–483.
- Storhas W** (2003): Bioverfahrensentwicklung, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, S. 37
- Straathof AJJ**, Panke S, Schmid A (2002): The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* 13 (6), 548-556.
- Straka F**, Doucha J, Crha J, Livanský K (2000): Flue-gas CO<sub>2</sub> as a source of carbon in closed cycle with solar culture of microalgae. Abstracts of the 4th European workshop on biotechnology of microalgae. Bergholz-Rehbrücke, Germany
- Stryer L** (1996): *Biochemie*, 4.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin, S. 48f
- Suh S**, Lee SB (2001): Cultivation of a cyanobacterium in an internally radiating air-lift photobioreactor. *J Appl Phycol* 13, 381-388.
- Suh S**, Lee SB (2003): A light distribution model for an internally radiating air-lift photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 82, 180-189.
- Sulkberg OM** (2000): Microalgae as a source of bioactive molecules –experience from cyanophyte research. *J Appl Phycol* 12, 341-348.
- Suye SI**, Kamiya K, Kawamoto K, Tanaka A (2002): Efficient repeated use of alcohol dehydrogenase with NAD<sup>+</sup> regeneration in an aqueous-organic two-phase system. *Biocatal Biotrans* 20, 23-28.
- Taguchi K**, Aoyagi Y, Matsusaki H, Fukui T, Doi Y (1999): Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain. *FEMS Microbiol Lett* 176, 183-190.
- Tamaki H**, Kita H, Kobayashi S (1996): Multi-objective optimization by genetic algorithms: A review. *Evolutionary Computation, Proc IEEE Comput Soc Bioinform Conf*, 517-522

- Trebst A**, Harth E (1970): On a new inhibitor of photosynthetic electron-transport in isolated chloroplasts. *Z Naturforsch* 25b, 1157-1159.
- Tredici MR** (1999): Bioreactors, photo. Encyclopedia of bioprocess technology: Fermentation, Biocatalysis and bioseparation. Flickinger MC, Drew SW, New York: Wiley, 395-419.
- Tredici MR**, Materassi R (1992): From open pond to alveolar panel: the Italian experience. *J Appl Phycol* 4, 221.
- Tsoglin L**, Gabel B (2000): The technology of production of biomass labeled with stable isotopes. Abstracts of the 4<sup>th</sup> European workshop on biotechnology of microalgae. Bergholz-Rehbrücke, Germany
- Tusnády GE**, Simon I (1998): Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: Application to topology prediction. *J Mol Biol*, 489-506.
- Tusnády GE**, Simon I (2001): The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17, 849-850.
- Urlacher V**, Schmid RD (2002): Biotransformations using prokaryotic P 450 monooxygenases. *Curr Opin Biotechnol* 13, 557-564.
- Van der Oost J**, Bulthuis BA, Feitz S, Krab K, Kraayenhof R (1989): Fermentation metabolism of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7822. *Arch Microbiol* 152, 415-419.
- Van Liere L**, Mur LR (1979): Growth kinetics of *Oscillatoria agardhii* Gomont in continuous culture, limited in its growth by the light energy supply. *J Gen Microbiol* 115, 153-160.
- Van Oorschot JLP** (1955). Conversion of light energy in algal cultures. Wageningen, H Veenman. 225–277.
- Veyron-Churlet R**, Guerrini O, Mourey L, Daffé M, Zerbib D (2004): Protein-protein interactions within the fatty acid synthetase-II system of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for mycobacterial viability. *Mol Microbiol* 54 (4), 1161-1172.
- Wang J**, Araki T, Ogawa T, Matsuoka M, Fukuda H (1999): A Method of Graphically Analyzing Substrate-Inhibition Kinetics. *Biotechnol Bioeng* 62, 402-411.
- Wehrmeyer W** (1983): Organization and composition of cyanobacterial and rhodophycean phycobilisomes. Photosynthetic Prokaryotes: Cell Differentiation and Function G.C: Papageorgiou, C. Packer, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. 1-22.
- Westgate S**, Vaidya AM, Bell G, Halling PJ (1998): High specific activity of whole cells in an aqueous-organic two-phase membrane bioreactor. *Enzyme Microb Technol* 22 (7), 575-577.

- Weuster-Botz D** (1999): Die Rolle der Reaktionskinetik in der mikrobiellen Verfahrenstechnik. Weuster-Botz, Schriften der Forschungszentrum Jülich, Reihe Lebenswissenschaften, Band 2. 1-46
- Widmer A** (2003): Breites Angebot erleichtert Marktzugang. *Chemische Rundschau* 14, 32.
- Wills M**, Hannedouche M (2002): New methodology for the asymmetric reduction of ketones. *Current Opin Drug Discov Devel* 5 (6), 881-891.
- Wolberg M**, Hummel W, Wandrey C, Müller M (2000): Highly regio- and enantioselective reduction of 3,5-dioxo-carboxylase. *Angew Chem* 112, 4476-4478.
- Wong CH**, Drucekhammer DG (1985): Enzymatic synthesis of chiral hydroxyl compounds using immobilized glucose dehydrogenase from *Bacillus cereus* for NAD(P)H regeneration. *Biotechnology (N Y)* 3, 649-651.
- Wu X**, Zarka A, Boussiba S (2000): A Simplified Protocol for Preparing DNA from Filamentous Cyanobacteria. *PI Mol Biol Rep* 18, 385-392.
- Yamanaka G**, Glazer AN, Williams RC (1978): Cyanobacterial Phycobilisomes – Characterization of the phycobilisomes of *Synechococcus Sp.* 6301, *J Biol Chem* 253 (22) 8303-8310.
- Yasohara Y**, Kizaki Y, Hasegawa J, Wada M, Kataoka M, Shimizu S (2001): Stereoselective reduction of alkyl 3-oxobutanoate by carbonyl reductase *Candida magnoliae*. *Tetrahedron: Asymmetry* 12, 1713-1718.
- Yee L**, Blanch HW, (1993): Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 41, 781-790
- Zietzler E**, Laumanns M, Bleuler S (2004): A Tutorial on Evolutionary Multiobjective Optimization. Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich, Computer Engineering and Networks Laboratory (TIK),
- Zietzler E**, Thiele L (1999): Multiobjective evolutionary algorithms: A comparative case study and the strength pareto approach. Transaction on evolutionary computation, *Proc IEEE Comput Soc Bioinform Conf* 3 (4), 257-271.

## 11 Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 11.1:** Abkürzung chemischer Formeln, Namen etc.

Abkürzung	Begriff
[BMIM] <sup>+</sup>	1-n-Butyl-methylimidazolium
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Acetophenon
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BFM	Biofeuchtmasse
BTM	Biotrockenmasse
C	Kohlenstoff
CCM	<i>carbon concentration mechanism</i>
4-Cl-ACE	Ethyl-4-chloracetoacetat
4-Cl-AP	4-Chloracetophenon
S-CHBE	Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat
4-Cl-PE	S-1-(4-Chlorphenyl)-ethanol
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
DCPIP	2,6-Dichlorphenol-indophenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EBA	Ethylbenzoylacetat
EDTA	Ethylen
[E3FAP] <sup>-</sup>	Tris(pentafluorethyl)trifluorophosphat
EtOH	Ethanol
FabG	3-Oxoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
FAS I / II	Fettsäure-Synthetase Typ I / Typ II
Fd	Ferredoxin
FNR	Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> -Oxidoreduktase
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>

---

GC	Gaschromatographie
HCl	Salzsäure
HPPE	(+)-Ethyl-(S)-hydroxy-3-phenylpropionat
$I_c$	Lichtkompensationspunkt
$I_c$	inhibierenden Lichtintensität
$I_s$	Sättigungsintensität
IPTG	Isopropylthiogalactosid
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
Nadoc	Natriumdesoxycholat
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
NRPS	nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen
[NTF]	Bis(trifluormethylsulfonyl)imid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD <sub>730</sub>	Optische Dichte bei 730nm
PAR	<i>Photosynthetic active radiance</i>
<i>PBK</i>	Spezifische Produktbildungskapazität
PCR	Polymerasenkettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PFAP	2'-3'-4'-5'-6'-Pentafluoracetophenon
Pi-Puffer	Phosphat-Puffer
[PF <sub>6</sub> ]	Hexafluorophosphat
<i>Ph</i>	Photosyntheserate
PKS	Polyketid-Synthetasen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS I / II	Photosystem I / II
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPEA	<i>Strength Pareto Evolutionary Algorithm</i>
S-PFE	(S)-Pentafluor(phenyl)-ethanol
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

---

Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
ü.N.	Über Nacht
VEGA	<i>Vector Evaluated Gentic Algorithm</i>
VE-H <sub>2</sub> O	Vollentionisiertes Wasser
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent auf Volumen bezogen (1 % = 10 g L <sup>-1</sup> )
$X_1$	Ruhender Zustand
$X_2$	Aktivierter Zustand
$X_3$	Inhibierter Zustand

**Tabelle 11.2:** Prozessgrößen der Ganzzellbiokatalyse, Biochemie und des mikrobiellen Wachstums

Abkürzung/Symbol	Einheit	Begriff
$\alpha I^*, \beta I^*$	h <sup>-1</sup>	Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der integralen Lichtintensität
$A$	m <sup>2</sup>	Fläche
$c$	g L <sup>-1</sup> oder mM	Konzentration
$\gamma, \delta$	h <sup>-1</sup>	Geschwindigkeitskonstanten
$D$	m	Durchmesser der Streulichtbarriere
$d$	m	Durchmesser des einzelnen Loches
$\varepsilon$	L cm <sup>-1</sup> g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup>	Absorptionskoeffizient
ee	%	Enantiomerenüberschuss
$f_X$	g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup>	Korrelationsfaktor
$I$	μE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Lichtintensität
k	-	Geschwindigkeitskonstante
$K_m$	mM	Halbsättigungskonstante (enzymkinetisch)
$K_i$	μE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Lichtinhibierungskonstante
$K_I$	g L <sup>-1</sup>	Inhibierungskonstante
$K_S$	g L <sup>-1</sup> oder μE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Halbsättigungskonstante
$L$	cm	Lichtweg im Medium
$m_X$	g <sub>BTM</sub>	Biomasse

MW	kDa	Molekulargewicht
MWCO	kDa	Molekulare Ausschlussgröße von Dialysemembranen
$n$	mol	Menge eines Stoffes
$n_X$	-	Zellzahl
$\mu$	$\text{h}^{-1}$	Wachstumsrate
P	mM	Produktkonzentration
<i>PBK</i>	$\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$	Produktbildungskapazität
$q_S$	$\text{g g}_{\text{BTM}} \text{h}^{-1}$	spezifische Substrataufnahmerate
$q_{S,m}$	$\text{g g}_{\text{BTM}} \text{h}^{-1}$	Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel
$q_{I_0}$	$\mu\text{E}^{-1} \text{m}^2\text{s}$	relative Quantenausbeute
$RZA_X$	$\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$	Raum-Zeit-Ausbeute
$t$	h	Reaktions- oder Kultivierungszeit
$t_d$	h	Verdoppelungszeit
$\tau$	h	Dämpfungszahl
V	L	Reaktionsvolumen (oder Verweilzeit)
$v$	$\text{min}^{-1}$	Produktbildungsrate
$Y_{XS,\mu}$	$\text{g}_{\text{BTM}} \text{g}^{-1}$	Ertragskoeffizient
$z$	-	Anzahl der Zellteilungen

**Tabelle 11.3:** Indizes von Prozessgrößen der Ganzzellbiokatalyse, Biochemie und des mikrobiellen Wachstums

Index	Begriff
*	Integral
0	Ausgangszustand
<i>ave</i>	Durchschnitt
BTM	Biotrockenmasse
E	Edukt
I	Inhibitor
max	Maximalwert unter bestimmten Bedingungen
<i>opt</i>	Optimal

P	Produkt
(R)	R-Enantiomer
R	Reaktion
(S)	S-Enantiomer
S	Substrat
t	Zum Zeitpunkt t
T	Temperatur
X	Biomasse

**Tabelle 11. 4:** Besonderheiten der verwendeten Einheiten

Einheit	Umrechnung	Molekulargewicht
cm		In der biotechnologischen Fachliteratur werden als Längenmaß für Absorptionswege cm verwendet. Die Einheit Meter hat im Bereich der Biotechnologie für die Absorption von Flüssigkeiten mit streuenden Partikeln und Farbstoffen keine Relevanz.
kBp	$10^3$ Bp	In der biotechnologischen Fachliteratur wird die Länge eines Gens üblicherweise in Basenpaaren angegeben.
kDa	1 kDa = $1,66 \times 10^{-21}$ g	In der biotechnologischen Fachliteratur wird die Molekularmasse eines Proteins üblicherweise in kDa angegeben.
L		In der biotechnologischen Fachliteratur wird die Einheit Liter mit großem L geschrieben z.B. mL ( $10^{-3}$ L) oder $\mu$ L ( $10^{-6}$ L), um Verwechslungen mit der Zahl 1 in manchen Schrifttypen zu vermeiden. Volumina und Konzentrationen werden üblicherweise in der Bezugsgröße Liter statt Kubikmeter angegeben.
log <sub>D</sub>	-	In der biotechnologischen und chemischen Fachliteratur wird der Verteilungskoeffizient für einen Stoff zwischen einer organischen und einer wässrigen Phase in Form des dekadischen Logarithmus des Nerstischen Verteilungskoeffizienten angegeben.
M	mol L <sup>-1</sup>	In der biotechnologischen und chemischen Fachliteratur wird die Konzentration eines Stoffes üblicherweise in der Einheit M (Molarität) oder mM angegeben.
U	$\mu$ mol <sub>Substrat</sub> min <sup>-1</sup>	In der biotechnologischen Fachliteratur und in Datenbanken wird Enzymaktivität in der Einheit Units angegeben.
g	$9,81 \text{ ms}^{-2}$	In der biotechnologischen Fachliteratur werden aus Gründen der Übertragbarkeit von Laborverfahren Sedimentationsbeschleunigungen in einem vielfachem der

---

Erdbeschleunigung angegeben

---

## 12 Anhang

### 12.1 Geräte, Chemikalien, Puffer, Kultivierungsmedien

#### 12.1.1 Allgemeine Laborgeräte

**Tabelle 12.1:** Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Analytische Waage Explorer 10 mg-210 g	Ohaus, Gießen
Analytische Waage Explorer 5 g-32 kg	Ohaus, Gießen
Dialyseschläuche Cellutrans	Roth, Karlsruhe
Einstrahlphotospektrometer Spectronic Genesys 20	Thermo Electron, Dreieich
Fluoreszenz-Mikrotiterplattenphotometer Fluostar Galaxy	BMG Labtechnologies, Offenburg
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz
Glasperlen 0,01-0,04 mm	B. Braun Biotech, Melsungen
Horizontal Midi-Gellaufapparatur MGU 402T	CBS Scientific, Del Mar, USA
Kontinuierliche Zentrifuge Contifuge 17 RS	Kendro-Heraeus, Langenselbold
Kühlbrutschrank KB 400	Binder, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Biofuge Stratos	Kendro-Heraeus, Langenselbold
Mehrfachrührplatz Multipoint 15	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Mikrotiterplattenphotometer EL 808	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Mikroskop Axiolab	Carl Zeiss, Jena
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott, Mainz
pH-Elektrode N6000A	Schott, Mainz
pH-Meter CG 843	Schott, Mainz
Photospektrometer Genesys 20	Thermo Spectronic, Neuss
Photospektrometer Biomate 3	Thermo Spectronic, Neuss
Quantumsensoren LI-190SZ mit Datenlogger LI-189	LI-COR, Lincoln, USA
Reagenzglasschüttler Reax Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Spektroradiometer LI-1800	LI-COR, Lincoln, USA
Schüttelinkubator Multitron	Infors, Einsbach
Schwingarmmühle MM200	Retsch, Haan
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen

Standzentrifuge RC5C	Kendro, Langenselbold
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Trockenschrank E 28	Binder, Tuttlingen
Ultrazentrifuge Beckman XLA mit SW 40 Ti Rotor	Beckmann Coulter, Krefeld
Ultraschall Sonotrode: Sonifier B-12	Brandson Company, Danbury, UK
Vivaspin 20 mL Concentrator	Viva Science AG, Hannover
Vibrogen Zelmühle vi 3	Johann Bachofer Laborgeräte, Reutlingen-Betz
Wasserbad W15 C15	Thermo Haake, Karlsruhe

**Tabelle 12.2:** Vollautomatisierte FPLC-Anlage (System Sykam)

Gerät	Hersteller
Fluoreszenz-Spectrophotometer F-1050	Merck Hitachi, Tokio, Japan
Fluoreszenz-Spectrophotometer F-1050	Merck Hitachi, Tokio, Japan
HPLC-Controler S 2000	Sykam, Fürstenfeldbruck
Motorventil	Knauer, Bad Homburg
Kollektor RediFrac	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Schreiber SE 460 BBC Goerz Metrawalt	GMC Instruments, Nürnberg
Solvent delivery system S 1110	Sykam, Fürstenfeldbruck
UV-Spectrophotometer LKB Uvicord S II206 nm Filter	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

**Tabelle 12.3:** Programmierung der für DEAE 52-Säule

Equilibrieren der DEAE52 Säule	Flussrate: 0,5mL/min, t= 390min (entsprach 3 Säulenvolumina)
Auftrag der Proteinprobe	Flussrate: 0,5mL min <sup>-1</sup> , Gleichung 12.1: $t = 2 \cdot \frac{V_{Probe[mL]}}{mL}$
Spülen der Säule	Flussrate: 0,5mL min <sup>-1</sup> , t= 230 min (entspricht 2 Säulenvolumina)
Elution	Flussrate: 0,5mL min <sup>-1</sup> , auf Fraktionskollektor 0,1min entspricht 0 % Hochsalzpuffer mit 3M NaCl 260min entspricht 20 % Hochsalzpuffer mit 3 M NaCl 390min 100 % Hochsalzpuffer mit 3M NaCl

**Tabelle 12.4:** FPLC-Anlage mit manuellem Probeauftrag (System Amersham)

Pumpe P50	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
GradiFrac FPLC-Einheit	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
IV-7 Manuelle Probenauftragspumpe	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HiLoad 26/60 Superdex-200 <sup>®</sup> - Säule	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
UV-Spectrophotometer LKB Uvicord S II 206 nm Filter	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

**Tabelle 12.5:** Gaschromatograph

Gaschromatograph CP-3800	Varian, Darmstadt
Injektor 1079 PTV	Temperaturprogrammierbar, standardmäßig 250°C
Splitregelung	Elektronische Flusskontrolle (EFC), standardmäßig Splitreduktion auf 5 vor 0,01 und nach 0,5 min
FID-Detektor	Standardmäßig 250°, Brenngase Wasserstoff und Luft, Make-up-Gas Helium (=Trägergas)
Software Star version 5.51	Varian, Darmstadt
Probengeber CombiPal	CTC Analytics, Zwingen, Schweiz BGB Analytik, Schlossböckelheim
Trennsäule BGB-174	Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm Macherey Nagel, Düren
Trennsäule Lipodex E	Länge 25 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Varian, Darmstadt
Trennsäule CP-Sil 8 CB-MS	Länge 30 m, Innendurchmesser 0,32 mm, Filmdicke 1 µm
Helium 99,999 % v/v	Air Liquide, Krefeld
Wasserstoff 99,999 % v/v	Air Liquide, Krefeld
Luft (gefiltert)	Druckluft-Hausleitung

### 12.1.2 SDS-Page

Die Herstellung des Trenngels erfolgte durch Mischung von 10 mL Trenngelpuffer mit 10 mL Acrylamid (Tabelle 12.6) und 20 mL bidestilliertem Wasser. Die Polymerisation für zwei Gele (15 mL Trenngel) wurde mit 100 µL APS und 10 µL TEMED eingeleitet. 6 mL Trenngel wurden pro Gel zwischen eine Glasplatte und Alu-Platte gefüllt und mit 50 % Butanol-Wasser Gemisch überschichtet. Das 5 %ige Sammelgel setzte sich aus 20 mL Sammelgelpuffer, 5 mL 40 % Acrylamid und 15 mL bidestilliertem Wasser zusammen. Die Polymerisation wurde mit 100 µL APS und 10 µL TEMED gestartet.

### Trennung

Die Auftrennung der hitzedenaturierten Probe erfolgte in 10 %igen Acrylamidgelen (9 cm X 8,5 cm X 0,8 mm) mit Trenn- und Sammelgelen nach einer modifizierten Methode nach Fling und Gregerson (1986) in einer kühlbaren vertikalen Laufapparatur (Tabelle 12.6) bei 25-30 mA per Gel in einem Tris-Glycin-Laufpuffer für 1 h 30 min.

**Tabelle 12.6:** Gelelektrophoresesystem

<i>Elektrophoresekammer P8DS</i>	Owl, Portsmouth, USA
Elektrophorese-Stromquelle E 802	Consort, Fournhout, Belgien
Heizblock Standard	Henry Troemner LLC, Thorofare, NJ, USA
Mikrowelle	BOSCH, Stuttgart
Roti <sup>R</sup> -Load 1 (Lämmli-Puffer (4x))	Roth
Rotiphorese Gel 40 Acrylamid (40 % w/v), Acrylamid/Bisacrylamid= 38:2	Roth
Sammelgelpuffer SG (2x): 0,4 % SDS, 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8	
Trenngelpuffer TG (4x): 0,8 % SDS, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	
Ammoniumperoxodisulfat (APS) (10 % w/v)	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin TEMED	Roth
Rotiphorese 10x Laufpuffer: 0,25 M Tris HCl pH 8,8, 2 M Glycin, 1 % (w/v) SDS	Roth
Roti <sup>R</sup> -Mark 10-150	Roth
Roti <sup>R</sup> -Mark Standard	Roth
Rotimark Prestained	Roth
Gel dry-Lösung 10 % Glycerin, 20 % Ethanol	

**Tabelle 12.7:** Coomassie-Mischfärbung

Fixierung 2 h	40 % (v/v) EtOH (p.a.) 10 % (v/v) Eisessig (p.a.) in VE-H <sub>2</sub> O
Fixierung 30 min	25 % (v/v) EtOH (p.a.) 8 % (v/v) Eisessig (p.a.) in VE-H <sub>2</sub> O
Coomassiefärbung	0,2 g L <sup>-1</sup> Coomassie brilliant blue R250 0,2 g L <sup>-1</sup> Coomassie brilliant blue G250 45 % (v/v) EtOH (p.a.) 10 % (v/v) Eisessig (p.a.) in VE-H <sub>2</sub> O
Waschen 10 min, 30 min, 1 h	25 % (v/v) EtOH (p.a.) 8 % (v/v) Eisessig (p.a.) in VE-H <sub>2</sub> O
Waschen 1 h	6,25 % (v/v) EtOH (p.a.) 2 % (v/v) Eisessig (p.a.) in VE-H <sub>2</sub> O
Waschen ü.N.	1 % (v/v) Eisessig

**Tabelle 12.8:** Enzyme

Enzyme	Hersteller
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin rekombinant	Promega, Madison, WI, USA
Proteinase K	Promega, Madison, WI, USA
Eco RI (20,000 U mL <sup>-1</sup> )	New England Biolabs, Frankfurt
Nde I (20,000 U mL <sup>-1</sup> )	New England Biolabs, Frankfurt
T4 Ligase (3000 U mL <sup>-1</sup> )	Promega, Madison, WI, USA

Alkalische Phosphatase (1000 U mL<sup>-1</sup>)

Promega, Madison, WI, USA

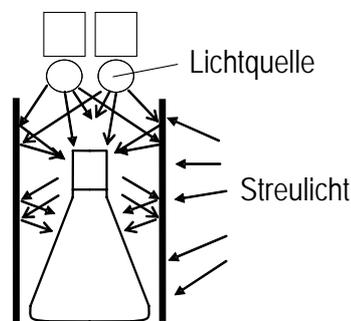
Taq DNA Polymerase (5000 U mL<sup>-1</sup>)

GenScript, Piscataway, USA

### 12.1.3 Parallelisiertes Kultivierungssystem für 100 mL Reaktoren

#### Versuchsaufbau

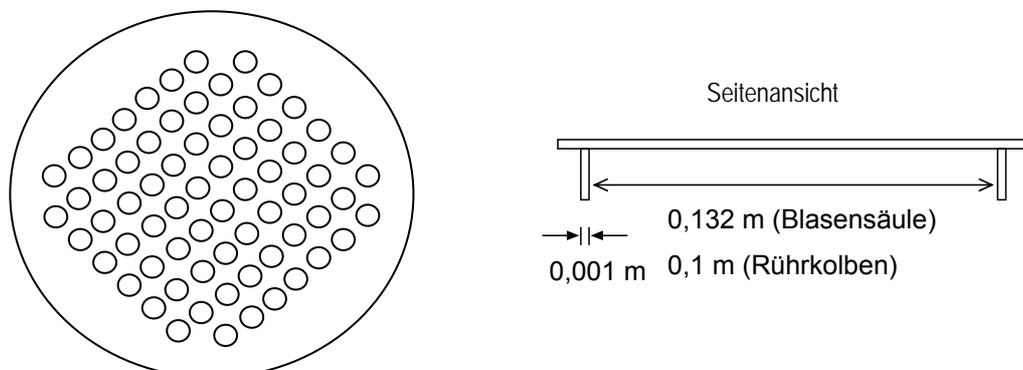
Zur Vermeidung von Streulicht wurden spezielle Streulichtzylinder konzipiert, die eine optimale Raumnutzung der Lichtanlage ermöglichten und der gezielten gleichmäßigen Bestrahlung der 100 mL Reaktoren dienten (Abbildung 12.1).



**Abbildung 12.1:** Anordnung von 100 mL Reaktoren mit Streulichtbarrieren unter der Lichtquelle

#### Lochblenden

Der Einsatz von Lochblenden mit unterschiedlichen Lochgrößen am Kopfende der Streulichtbarriere ermöglicht die Einstellung einer beliebigen Beleuchtungsstärke bis zu einer maximalen Lichtintensität von 102  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .



**Abbildung 12.2:** Ausführungsbeispiel für einen eingesetzten Intensitätsfilter aus 1mm Stahlblech.

Das einfache Wechseln der Lochblenden ermöglicht es, zu jeder Zeit ein Beleuchtungsprofil in einem Prozess zu testen.

Die Lichtdurchlässigkeit der Intensitätsfilter, wird wie folgt berechnet:

Gleichung 12.2: 
$$A_{Filter} = \frac{\pi \cdot D^2}{4}$$

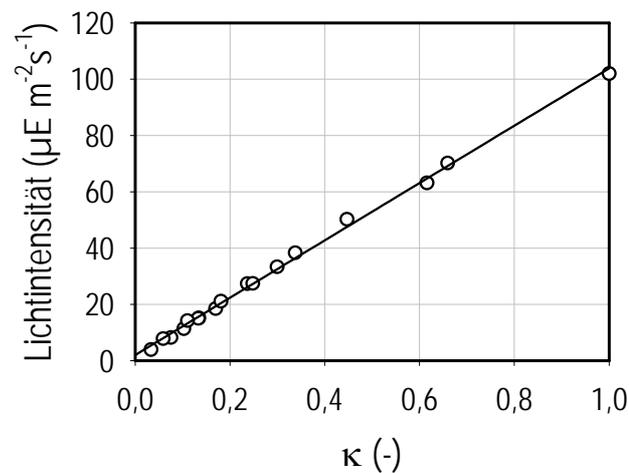
Gleichung 12.3: 
$$A_{Loch} = \sum \frac{\pi \cdot d_i^2}{4}$$

Gleichung 12.4: 
$$\kappa = \frac{A_{Loch}}{A_{Filter}}$$

Gleichung 12.5: 
$$I = I_0 \cdot \kappa$$

Mit	$\kappa$	Optische Porosität, -
	$A_{Filter}$	Fläche des Blendenmaterials, m <sup>2</sup>
	$D$	Durchmesser der Streulichtbarriere, m
	$A_{Loch}$	Freie Lochfläche in der Blende, m <sup>2</sup>
	$d$	Durchmesser des einzelnen Loches, m

Die optische Porosität ist das Verhältnis der freien Lochfläche in der Blende zur gesamten Blendenfläche über der Zylinderöffnung. Abbildung 12.3 zeigt die Korrelation der optischen Porosität mit der resultierenden Lichtintensität.



**Abbildung 12.3:** Zusammenhang zwischen der Lichtintensität und der optischen Porosität der entworfenen Intensitätsfilter

### 12.1.4 Paralleles Blasensäulenreaktorsystem

Die Profors-Anlage (Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz) dient der Kultivierung von Zellen in parallelen Blasensäulenreaktoren (Tabelle 12.9).

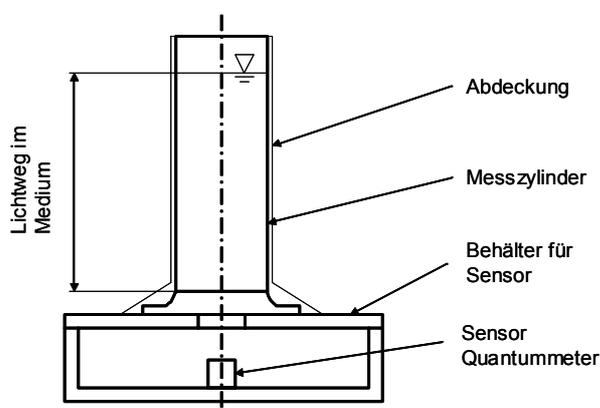
Es war möglich die Begasungsrate (0-60 NL h<sup>-1</sup>) für jeden Reaktor individuell zu regeln. Der CO<sub>2</sub> Gehalt der Luft ließ sich extern regeln (0-5 %). Zusätzlich wurde die Anlage über ein externes Kühlbad temperiert. Um Streulicht zu verhindern wurden analog Kapitel 12.1.3 spezielle Streulichtzylinder ( $\varnothing=0,132$  m) und Lochblenden konzipiert. Darüber hinaus wurden für Versuche Mullgewebe in definierten Lagen und Papierfilter verwendet.

**Tabelle 12.9:** Komponenten des parallelen Blasensäulensystems

Komponente	Hersteller
Brooks Massflowmeter E5850	Westphal, Ottobrunn
Gasmischsystem WMR 4000	Westphal, Ottobrunn
Glassinterplatten Vitrapor 4 10-16 $\mu$ m Poren	Robu Glasfiltergeräte, Hattert
Lasergebohrte Stahlplatten 60 $\mu$ m Poren	
Polyestertrenngewebe, Nr. 13420	Sartorius AG, Göttingen
Profors-Blasensäule 250 mL	Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz
Profors-Inkubator	Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz
Sterilfilter PTFE, 0,2 $\mu$ m	Sartorius AG, Göttingen

### Absorptionsmessungen

Alle Lichtintensitäten im Profors-Inkubator wurden mit einem Quantumsensor an jeder der 16 Positionen im Inkubator in den leeren Basensäulen gemessen. Zur Simulation der Absorption in Kulturen wurde die Messanordnung nach Abbildung 12.4 verwendet.



**Abbildung 12.4:** Messvorrichtung zur Ermittlung der Absorption in Blasensäulen

### 12.1.5 20 L-Rührkesselreaktor

Tabelle 12.10: Komponenten des 20 L-Rührkesselreaktors

Komponente	Hersteller
25 L-Labor-Pilot-Fermenter CF 3000	Chemap AG, Volketswil, Schweiz
Brooks Massflowmeter E5850	Westphal, Ottobrunn
Gasmischsystem WMR 4000	Westphal, Ottobrunn
Glaszylinder Typ G	Chemap AG, Volketswil, Schweiz
Leuchtstoffröhre Fluora L77 40W	Osram, München
Leuchtstoffröhre SunGlo 40W	Hagen, Holm
pH-Elektrode InFit 764-50	Mettler-Toledo, Gießen

#### Versuchsaufbau

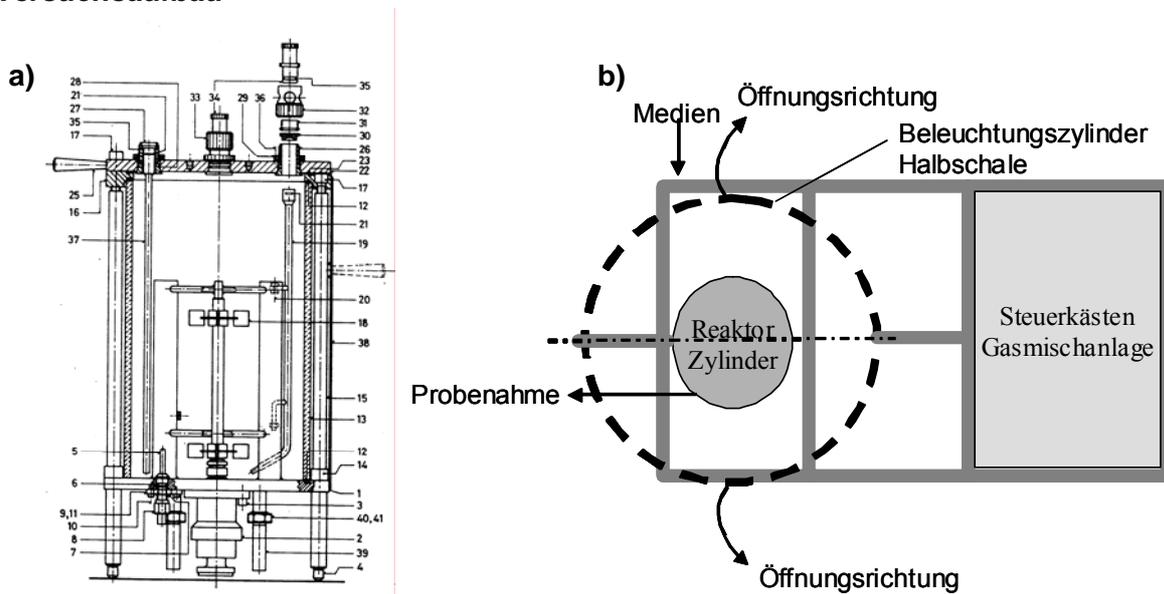


Abbildung 12.5: Schematischer Versuchsaufbau. a) Reaktorskizze b) Reaktor mit Peripherie (Aufsicht)

#### Absorptionsmessungen im Rührkesselreaktor

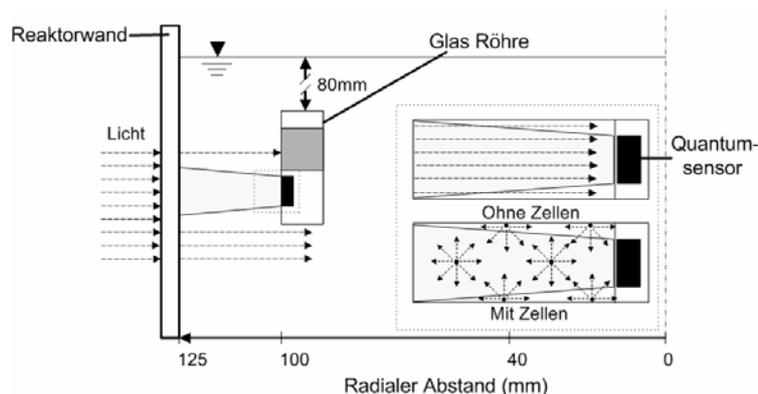
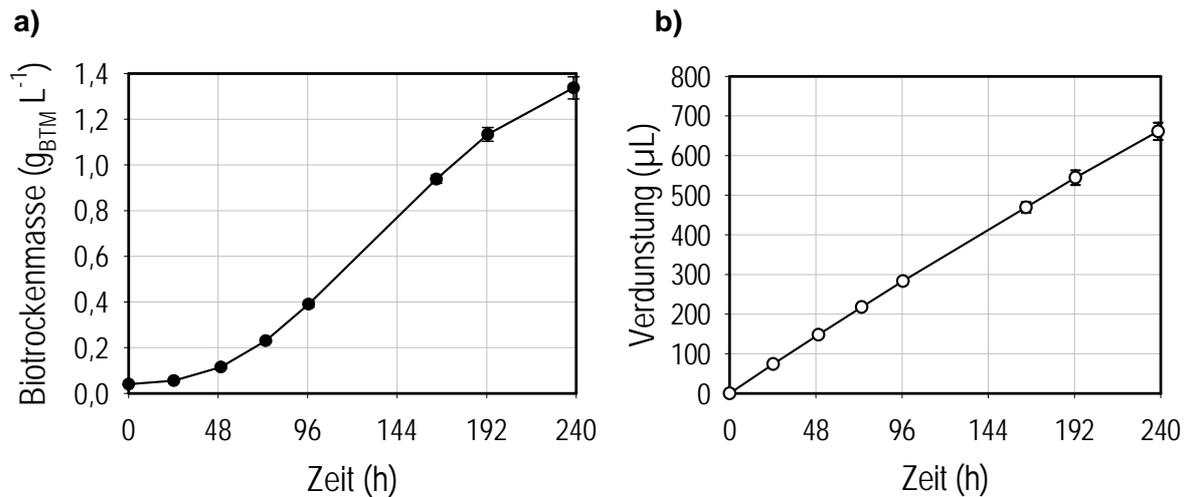


Abbildung 12.6: Vermessungsaufbau zur Absorptionsmessung im Rührkesselreaktor

### 12.1.6 1 mL Reaktorsystem



**Abbildung 12.7:** Reproduzierbarkeit der Kultivierung von *Synechococcus* PCC7942 in 1 mL Reaktoren. **a)** Biomassekonzentration und **b)** Verdunstung von 4 Reaktoren bei 20°C, 42 µE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 600 min<sup>-1</sup> in BG-11-Medium. Verbindungslinien dienen der Visualisierung.

### 12.1.7 Chemikalien

**Tabelle 12.11:** Allgemeine Laborchemikalien

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
Acetophenon	> 98 %	Merck	800028
Adenosintriphosphat (ATP)		Sigma-Aldrich	A2,620-9
Agar-Agar		Roth	5210.2
Agarose	DNA Grade	Cambrex Bioscience	438792U
Ammoniumeisen(III)-citrat (18 % Eisen)		Merck	103762
Ammoniumsulfat	99,5 %	Merck	101217
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	98 %	Merck	103762
Ampicillin Natriumsalz	99 %	Roth	K029.1
Anthron	> 95 %	Merck	801461
Borsäure	99,8 %	Merck	100165
Bromphenolblau		Merck	108122
Calciumchlorid*2 H <sub>2</sub> O	> 99,5 %	Merck	102382
Casein-Pepton	unb.	Merck	102239
Clerol FBA265	unb.	Cognis	
Cobaltdinitrat*6 H <sub>2</sub> O	> 99 %	Merck	102536

---

Coomassie G250		Roth	9598
Coomassie R250		Roth	3862
2,6-Dichlorphenol-Indophenol (DCPIP)	> 98 %	Merck	103028
Dimethylsulfoxid (DMSO)	> 99 %	Merck	802912
EDTA	> 99 %	Sigma	E 5513
Essigsäure 100 %	> 99,8 %	Merck	100056
Ethanol	> 99,8 %	Merck	100983
Ethidiumbromid 1 % Lösung		Roth	2218.2
Formaldehyd 37 %		Merck	104002
D-Glukose*H <sub>2</sub> O	unb.	Merck	108342
Glutaraldehyd 25 %		Fluka	49630
Glycerin	98 %	Merck	818709
Glycin	> 99,7	Merck	104169
Hefeextrakt (mikrobiol.)	unb.	Merck	111926
Isopropanol	> 99 %	Merck	818766
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	> 99 %	Roth	CN08
Kaliumcarbonat	99,5 %	Merck	104924
Kaliumdihydrogenphosphat	99 %	Roth	3907
di-Kaliumhydrogenphosphat	99 %	Roth	P749.2
Kupfer(II)sulfat*5H <sub>2</sub> O	99 %	Merck	102790
Magnesiumsulfat*7 H <sub>2</sub> O	99,5 %	Merck	105886
Mangan(II)Chlorid*4 H <sub>2</sub> O	> 99 %	Merck	105927
Methanol	99,9	Roth	7342.1
Natriumacetat	> 99,5 %	Merck	116100
Dinatriumphosphat	> 99 %	Merck	106586
Natriumdihydrogenphosphat	> 99 %	Merck	106346
2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat (MES)	> 99 %	Merck	106126
Natriumdesoxycholat (Nadoc)	unb.	Merck	106504
Natriumcarbonat	> 99 %	Merck	106392
Di-Natriummolybdat*2 H <sub>2</sub> O	> 99,5	Merck	106521
NADP <sup>+</sup> (Natriumsalz)	unb.	Calbiochem	481971
NADPH (Tetranatriumsalz)	unb.	Calbiochem	481973
N-Laurylsarcosin	> 95 %	Merck	814715
Natriumchlorid	99 %	Roth	P029

---

Natriumdodecylsulfat (SDS)	> 85 %	Merck	817034
Natriumhydroxid	> 98 %	Merck	106482
Natriumnitrat	99 %	Roth	A136.1
Natriumthiosulfat	> 97 %	Merck	106512
N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	≥98,5 %	Roth	2367.2
Perchlorsäure 70 %		Merck	100519
Pepton	unb.	Merck	102239
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	≥99 %	Roth	6267.1
Roti-Load1		Roth	K928.1
Rotiphorese Gel 40		Roth	3030.1
Rotiphorese 10X Laufpuffer		Roth	3060.1
Salzsäure 32 %		Merck	100319
Schwefelsäure 95 %		Merck	100731
Silbernitrat	> 99,8 %	Merck	101512
Trichloressigsäure TCA	99,5 %	Merck	100807
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	99,9 %	Roth	4855.2
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	99 %	Roth	9090
Triton X 100	unb.	Roth	3051
Zinksulfat*7H <sub>2</sub> O	99,5 %	Merck	108883
Zitronensäure-Monohydrat	99,5	Roth	5110.1

**Tabelle 12.12:** Edukte und Produkte der Biokatalysen

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
Ethyl-4-chloracetoacetat	> 98 %	Merck	818571
4-Chloracetophenon	> 98 %	Merck	802605
(R,S)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol (RS-4- Cl-PE)	> 97 %	Merck	814834
Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat (S- CHBE)	96 %	Aldrich	460524
Ethylbenzoylacetat (EBA)	~ 93 %	Merck	801808
(R)-3-Hydroxy-3-phenylpropionat (HPPE)	99 %	Fluka	56187

2'-3'-4'-5'-6'-Pentafluoracetophenon	97 %	Interchim	32258
(R,S)-Penta(fluorphenyl)ethanol	> 97 %	Fluka	76748
(S)- Penta(fluorphenyl)ethanol (S-PFE)	unb.	Interchim	858330

**Tabelle 12.13:** Lösungsmittel

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
<i>n</i> -Butylacetat	> 99,5 %	Merck	109652
Ethylacetat	> 99,5 %	Merck	109623
<i>n</i> -Hexan	> 96 %	Merck	822280
Methy- <i>tert</i> -butylether	> 99,5 %	Merck	101849

**Tabelle 12.14:** Ionische Flüssigkeiten von Merck

Bezeichnung	Chemikalie	Produktnummer
[BMIM][PF6]	1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorosphat	EQ406250
[HMIM][PF6]	1-Hexyl-3-methylimidazolium hexafluorosphat	EQ504565
[BMIM][NTF]	1-Butyl-3-methylimidazolium bis(trifluormethylsulfonyl)imid	EQ519692
[HMIM][NTF]	1-Hexyl-3-methylimidazolium bis(trifluormethylsulfonyl)imid	EQ500631
[BMPL][NTF]	1-Butyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluormethylsulfonyl)imid	EQ407046
[HMPL][NTF]	1-Hexyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluormethylsulfonyl)imid	EQ514700
[BMPL][E3FAP]	1-Butyl-1-methylpyrrolidinium tris(pentafluorethyl)trifluorosphat	EQ201284
[HMIM][E3FAP]	1-Hexyl-3-methylimidazolium tris(pentafluorethyl)trifluorosphat	EQ501978
[EWTMG][E3FAP]	N,N,N',N'-Tetramethyl-N"-ethylguanidinium tris(pentafluorethyl)trifluorosphat	EQ526929

### 12.1.8 Kultivierungsmedien

**Tabelle 12.15:** BG-11-Medium (Allen, 1968) und Suchraum für die Medienoptimierung

Komponente	Konzentration (g L <sup>-1</sup> )	Suchraum bei Medienoptimierung (g L <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	1,5	0,15-15
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,031	0,0031-0,31
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,075	0,0075-0,75
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,037	0,0037-0,37
Zitronensäure	0,006	0,0006-0,06
Ammoniumeisen(III)-citrat (ca.18 % Eisen)	0,006	0,0006-0,06
EDTA	0,001	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,04	0,004-0,4
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00286	0,000286-0,0286
MnCl <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	0,00181	0,000181-0,0181
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,000222	0,0000222-0,00222
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,00039	0,000039-0,0039
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0,000079	0,0000079-0,00079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0,0000494	0,00000494-0,000494

Alle Komponenten wurden aus 1000-fach aufkonzentrierten Vorratslösungen in einem Volumen von 950 mL unter ständigem Rühren gelöst und anschließend mit VE-H<sub>2</sub>O auf 1000 mL aufgefüllt. Das Medium wurde autoklaviert und sodann im noch heißen Zustand, zum Lösen von ausgefallenen Salzen, unter Rühren abgekühlt.

**Tabelle 12.16** LB<sub>0</sub>-Medium

Komponente	Konzentration (g L <sup>-1</sup> )
Hefeextrakt	10
NaCl	5
Pepton	5

Mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt und autoklaviert

Für Selektionsmedien wurde dem Medium  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  Ampicillin (sterilfiltriert) zugegeben.

### 12.1.9 Puffer

**Tabelle 12.17:** Proteinpuffer

<b>Salz</b>	<b>Konzentration</b>
Tris-HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	1 mM
PMSF	0,1 mM

**Tabelle 12.18:** Hochsalzpuffer für Anionentauscher

<b>Salz</b>	<b>Konzentration</b>
Tris-HCl pH 8,0	20 mM
EDTA	1 mM
NaCl	3 M
PMSF	0,1 mM

**Tabelle 12.19** Gelfiltrationspuffer

<b>Salz</b>	<b>Konzentration</b>
Tris-HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM

## 12.2 Molekularbiologie

### 12.2.1 Isolation genomischer DNA

**Tabelle 12.20:** Isolation von genomischer DNA von Cyanobakterien modifiziert nach Wu *et al.*, (2000)

50 mL Zellen aus Blasensäule sedimentiert (6500 Xg, 3 min, 4°C). Zellen nach weiteren 10 min bei RT weiter präpariert.	
100 mM Tris, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8	10 mL
10 % (w/v) N-Laurylsarcosin	100 µL
Inkubation bei RT für 60 min anschließend sedimentiert (6500 Xg, 3 min, 4°C) und Überstand verworfen.	
50 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl,	20 mL
Ansatz sedimentiert (6500 Xg, 3 min, 4°C) und Überstand verworfen.	
50 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl,	2,5 mL
Lysozym (12,5 mg mL <sup>-1</sup> )	125 µL
Inkubation im Thermomixer (450 min <sup>-1</sup> , 30 min 37°C)	
SDS (100 mg mL <sup>-1</sup> )	30 µL
Inkubation bei RT für 10 min	
Alkalische Lyse Proteinase K	10 µL
Inkubation bei RT für 60 min. Anschließend 1:1 Phenol-Chloroform Extraktion (Rotiphenol, Roth) und Klärung bei 4°C ü.N. Klarer Überstand wurde abgenommen und in ein 15 mL Proberöhrchen überführt	
5 M NaCl	2/3 Volumen
mischen	
Isopropanol	1 Volumen
Mischen. DNA fällt sichtbar aus und wird mit einer Glaspipette in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 70 % EtOH überführt, absedimentiert (16000 Xg, 5 min, RT) und getrocknet. Die DNA wird in 50µl VE-H <sub>2</sub> O gelöst und bei -20°C gelagert.	

### 12.2.2 PCR

Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) (Tabelle 12.21) wurde mittels einem *Hot-Start* begonnen. Es galten folgende Betriebsparametern:

**Tabelle 12.21:** PCR-Ansatz

Komponente	Volumen
10X PCR Puffer	5 µL
dNTP-Mix	1 µL
genomische DNA	1 µL
forward Primer	0,5 µL
backward Primer	0,5 µL
H <sub>2</sub> O	41,5 µL
Taq-Polymerase	0,5 µL

Temperatur	Zeit (min)
94°C	2:00
94°C	0:30
69,5°C     Temperaturrampe R:3°/s	1:50
72°C	5:00
4°C	stop

### 12.2.3 Restriktion

**Tabelle 12.22:** Restriktion der PCR-Produkte und Vektor-DNA

Komponente	Vektor	PCR-Produkt
DNA	2 µL (0,5µg µL <sup>-1</sup> )	10 µL
Restriktionsenzym NdeI	1 µL	1 µL
Restriktionsenzym EcoRI	1 µL	1 µL
10X NEB-Puffer 4 (New England Biolabs, Frankfurt)	5 µL	1,5 µL
H <sub>2</sub> O	41 µL	1,5 µL

Beide Ansätze wurden bei 37°C für 3 h inkubiert. Die Deaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte durch Erhitzen der Probe auf 60°C.

Der Vektor-Reaktionsansatz wird anschließend mit 2 µL alkalischer Phosphatase und dem entsprechenden Puffer in einem Volumen von 70 µL bei 37°C für 30 min in zwei Durchgängen dephosphoryliert. Die Entfernung der alkalischen Phosphatase wurde in einem Reinigungsschritt mittels des QIAquick PCR Purification Kit® (Quiagen, Hilden) erreicht.

### 12.2.4 Ligation

Mittels Ligase wurden geschnittene PCR-Fragment in korrekter Orientierung über die Schnittstellen in die *multiple-cloning-site* des pET21a Vektors (Novagen, Madison, USA) eingebaut. Der Reaktionsansatz setzte sich nach Tabelle 12.23 zusammen.

**Tabelle 12.23:** Ligationsansatz

Lösung	Volumen
geschnittene Vektor DNA pet21a	2 $\mu$ L
geschnittenes PCR-Produkt	1 $\mu$ L
Ligase	0,5 $\mu$ L
Ligase-Puffer	1,5 $\mu$ L
Steriles VE-H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ L

Der Reaktionsansatz wurde bei 4°C für 8 h inkubiert.

### 12.2.5 Transformation

Das erhaltene Konstrukt wurde mittels DNA-Aufnahme über Hitzeschock in *E. coli* XL-GOLD ultrakompetente Zellen transformiert. 45  $\mu$ L Zellen wurden hierfür auf Eis aufgetaut, mit 8  $\mu$ L Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 42°C für 60 sec wurden die Zellen mit 1 mL LB-Medium versetzt und für 4 h bei 37°C bei 300 Upm in einem sterilen 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß inkubiert. Die erhaltenen Zellen wurden durch Sedimentation (5000 Xg, RT, 5 min) isoliert, in 50  $\mu$ L frischem Medium aufgenommen, auf ampicillinhaltigem LB<sub>0</sub>-Festmedium zur Selektion ausplattiert und für 12 h bei 37°C kultiviert.

### 12.2.6 Expression in *E. coli*

Die Zellen wurden steril von Ampicillin-Agarplatten in eine 50ml Flüssigkultur (Ampicillin-LB<sub>0</sub>-Medium mit 10 g L<sup>-1</sup> Glukose) überführt. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C in 1 L Kolben bei 250 min<sup>-1</sup> bis eine OD<sub>660</sub> von 1 erreicht wurde. Die Produktion der FNR wurde mittels Zugabe von sterilfiltriertem 1 mM IPTG erreicht.

### 12.2.7 Agarosegelelektrophorese

DNA wurde in einer 1%igen Agarosegelelektrophorese in einer horizontalen Midi-Gellaufapparatur MGU 402T aufgetrennt.

Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose in 100 mL TAE-Puffer (400mM Tris/Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA) durch aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Bei Erreichen von ca. 45°C wurde dem Gel 5 µL Ethidiumbromid (1 % (w/v)) beigemischt und das Gel gegossen.

10 µL der zu analysierende DNA wurden mit 2 µL 6X Ladepuffer (Roti-load DNA, Roth) gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Zur Korrelation der DNA-Länge dienten 5 µL DNA-Längenstandard (KB-Ladder M1010-1+M102R-1, GenScript, Piscataway, USA). Die Proben wurden im Gel bei einer konstanten Stromstärke von 120 mA für 30 min aufgetrennt.

### 12.2.8 Plasmidisolierung

Positive Klone wurden zur Plasmidvermehrung mit ampicillinhaltigem Medium bis zu einer optischen Dichte (660nm) von 1 angezogen und die Plasmide gemäß dem QIAquick Plasmid purification Kit® (Quiagen, Hilden) isoliert. Die so gewonnenen Expressionsplasmide konnten in jedem gewünschten Expressionsstamm über Transformation eingesetzt werden.

## 12.3 Enzymatische Tests

### 12.3.1 Glukose-Kit

Die zellhaltige Probe wurde vor der Messung sedimentiert (16000 Xg, RT, 5 min). Der zellfreie Überstand wurde anschließend entsprechend Tabelle 12.24 (D-Glukose-Enzymkit Nr. 10716251035, Fa. Boehringer Mannheim/R-Biopharm) analysiert.

**Tabelle 12.24:** Glukose-Kit

Komponente	Kalibrierung	Blindprobe	Probe
Kofaktorlösung (ATP + NADP <sup>+</sup> )	50 µL	50 µL	50 µL
Probelösung	20 µL		20 µL
VE-H <sub>2</sub> O	60 µL	80 µL	60 µL
Mischen, nach 3 min Absorption der Lösung messen (E <sub>1</sub> ). Starten der Reaktion durch Zugabe von:			
Enzymlösung	20 µL	20 µL	20 µL
Mischen, Stillstand der Reaktion abwarten (15 min) und Absorption der Lösung messen (E <sub>2</sub> )			

Die Reaktionsansätze wurden im temperierten Photometer bei 30°C inkubiert und nach Gleichung 12.6 ausgewertet werden.

Die resultierende Glukosekonzentration wurde schließlich über eine parallel aufgenommene Eichgerade mit Glukose-Standards (0,025 g L<sup>-1</sup>; 0,050 g L<sup>-1</sup>; 0,075 g L<sup>-1</sup>; 0,100 g L<sup>-1</sup>; 0,125 g L<sup>-1</sup> gelöst in VE-H<sub>2</sub>O) korreliert.

Gleichung 12.6: 
$$c_{Glu} = ((E_2 - E_1) - (E_{2B} - E_{1B})) \cdot m_{Glu}$$

- mit  $E_1$  Absorption der Probe vor der Enzymreaktion  
 $E_2$  Absorption der Probe nach Beendigung der Enzymreaktion  
 $E_{1B}$  Absorption der Blindprobe vor der Enzymreaktion  
 $E_{2B}$  Absorption der Blindprobe nach Beendigung der Enzymreaktion  
 $m_{Glu}$  Steigung der Korrelationskurve, g L<sup>-1</sup>

### 12.3.2 Acetat-Kit

Die zellhaltige Probe wurde vor der Messung sedimentiert (16000 Xg, RT, 5 min). Der zellfreie Überstand konnte anschließend entsprechend Tabelle 12.25 analysiert und nach Gleichung 12.7 ausgewertet werden. Die Reaktionsansätze wurden im temperierten Photometer bei 30°C inkubiert.

Die resultierende Acetatkonzentration wurde schließlich über eine parallel aufgenommene Eichgerade mit Acetat-Standards (0,0296 g L<sup>-1</sup>; 0,0148 g L<sup>-1</sup>; 0,0074 g L<sup>-1</sup>; 0,00296 g L<sup>-1</sup>; 0,00148 g L<sup>-1</sup>; 0,000296 g L<sup>-1</sup>, gelöst in VE-H<sub>2</sub>O) korreliert (Essigsäure-Enzymkit Nr. 10148261035, Fa. Boehringer Mannheim/R-Biopharm).

**Tabelle 12.25:** Acetat-Kit

Komponente	Kalibrierung	Blindprobe	Probe
Lösung 1	50 µL	50 µL	50 µL
Lösung 2	10 µL	10 µL	10 µL
Probe	50 µL	50 µL VE-H <sub>2</sub> O	50 µL
Mischen, Absorption der Lösung messen (E <sub>0</sub> ).			
Lösung 3: Enzymlösung 1:50 verdünnt	25 µL	25 µL	25 µL
Mischen, Absorption der Lösung nach 3 min messen (E <sub>1</sub> ).			
Lösung 4: Enzymlösung in 6,25 mL VE-H <sub>2</sub> O gelöst	25 µL	25 µL	25 µL
Mischen, Absorption der Lösung nach 3 min messen (E <sub>2</sub> ).			

$$\text{Gleichung 12.7: } c_{Ac} = \left[ \left( (E_2 - E_0) - \frac{(E_1 - E_0)}{E_2 - E_0} \right)_{\text{Probe}} - \left( (E_2 - E_0) - \frac{(E_1 - E_0)}{E_2 - E_0} \right)_{\text{Leerwert}} \right] \cdot m_{Ac}$$

- mit  $E_0$  Absorption der Probe vor der Enzymreaktion
- $E_1$  Absorption nach der Reaktion der Citrat-Synthetase
- $E_2$  Absorption der Probe nach der Enzymreaktion der Acetyl-CoA-Synthetase
- $m_{Ac}$  Steigung der Korrelationskurve, g L<sup>-1</sup>

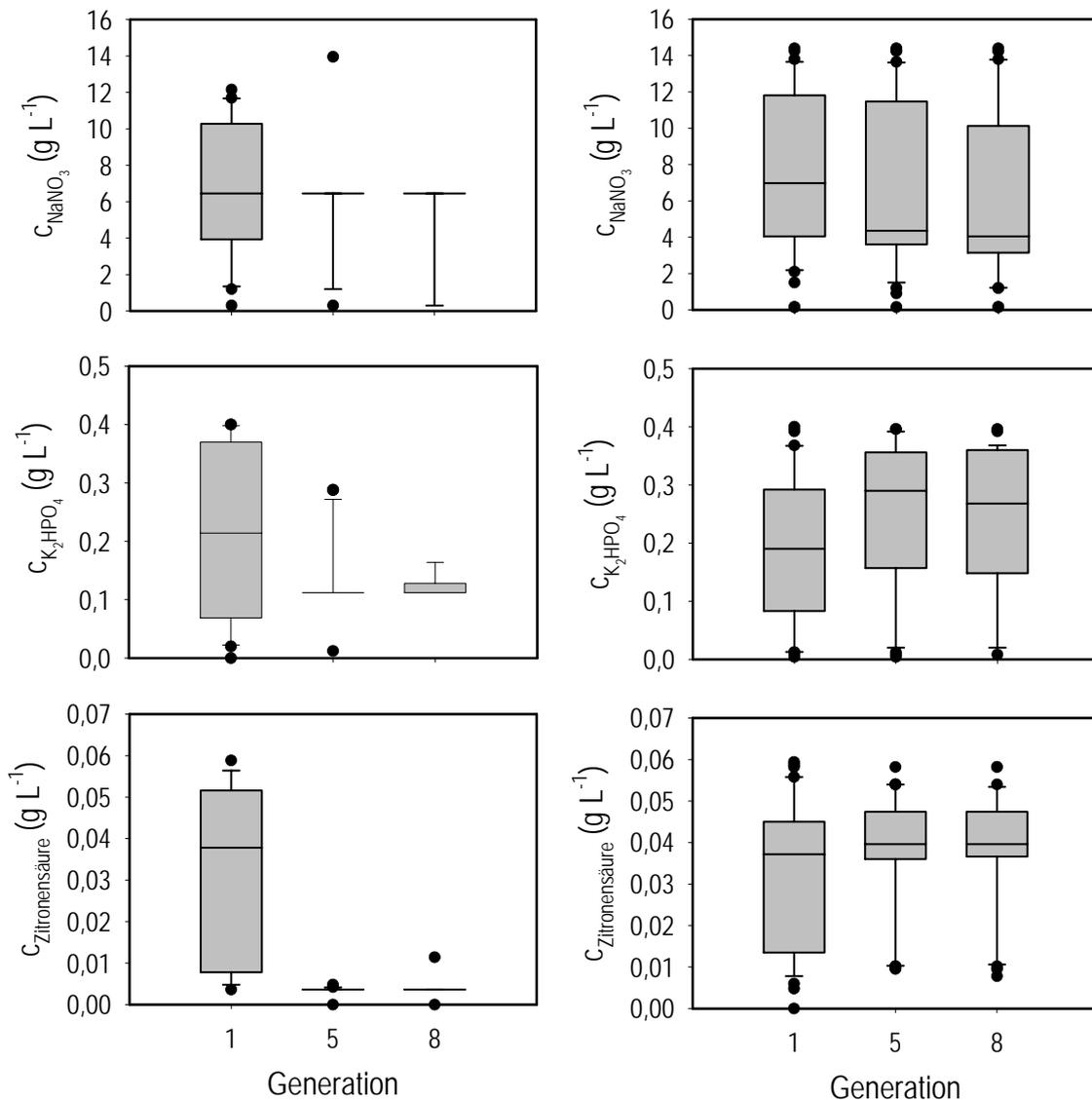
### 12.3.3 Anthronreaktion

**Tabelle 12.26:** Anthron-Methode (modifiziert nach Pons *et al.*, 1981)

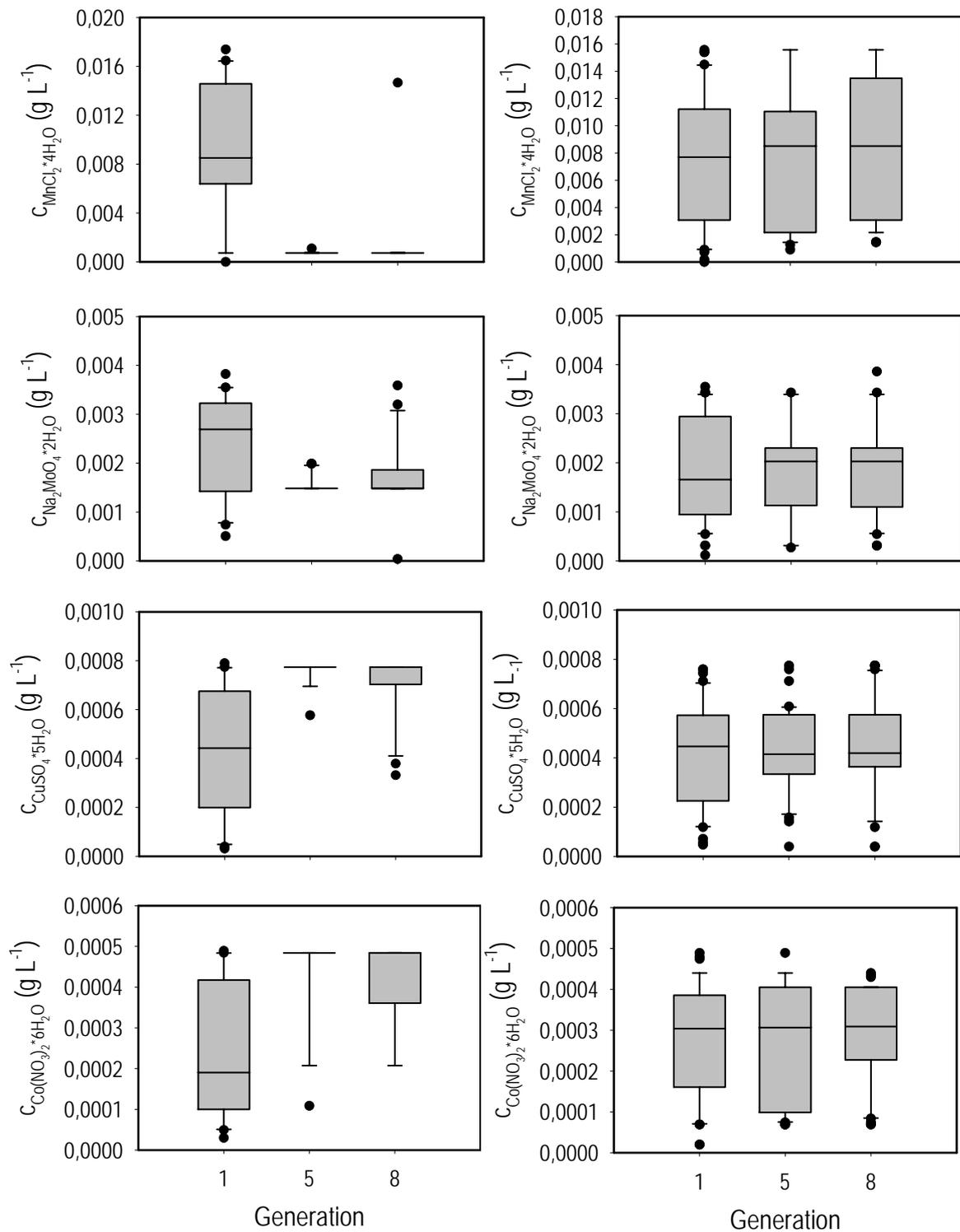
Komponente	Volumen
Zellsuspension	1 mL
Gasperlen	500 µL
Aufschluss in Schwingmühle (1800 min <sup>-1</sup> 30 min)	
Überstand	500 µL
20 % (v/v) HClO <sub>4</sub> -Lösung	500 µL
Inkubation 24h, nach Auftauen sedimentation (10000 Xg, RT, 10 min) der Probe	
Überstand	100 µL
72 % (v/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,74 g L <sup>-1</sup> Anthron, 10 g L <sup>-1</sup> Thioharnstoff (frisch hergestellt)	900 µL
15 min 100°C im Wasserbad, anschließend 5 min im Eisbad, Absorptionsmessung bei 620 nm	

## 12.4 Ergebnisse der Medienoptimierung

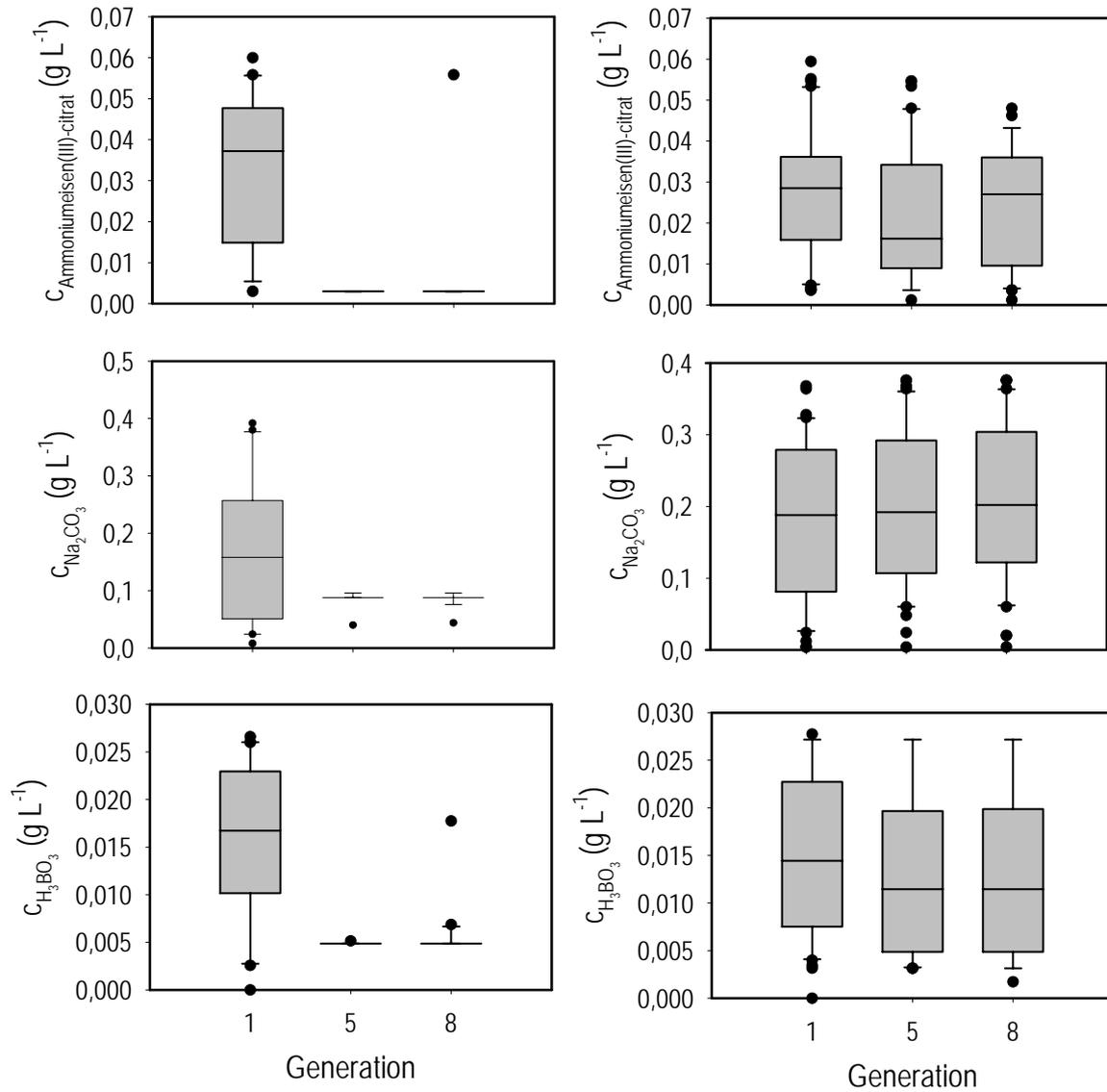
Im Folgenden sind die Konvergenzen der untersuchten Medienbestandteile der Generationen 1, 5 und 8 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen dass der SPEA bereits nach der dritten Generation konvergiert und den Suchraum eingeschränkt hat (Abbildung 12.8, 12.9 und 12.10). Der VEGA hingegen zeigt bis auf die Konzentrationen an Zitronensäure, Natriummolibdat und Kupfersulfat kaum eine Konvergenz.



**Abbildung 12.8:** Darstellung der Konvergenzen unterschiedlicher Medienkomponenten der beiden genetischen Algorithmen. **Links:** SPEA, **rechts:** VEGA.



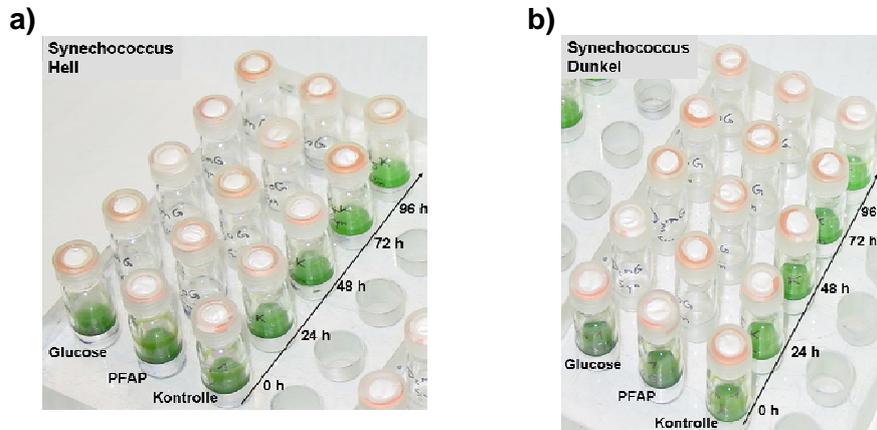
**Abbildung 12.9:** Darstellung der Konvergenzen unterschiedlicher Medienkomponenten der beiden genetischen Algorithmen. **Links:** SPEA, **rechts:** VEGA.



**Abbildung 12.10:** Darstellung der Konvergenzen unterschiedlicher Medienkomponenten der beiden genetischen Algorithmen. **Links:** SPEA, **rechts:** VEGA.

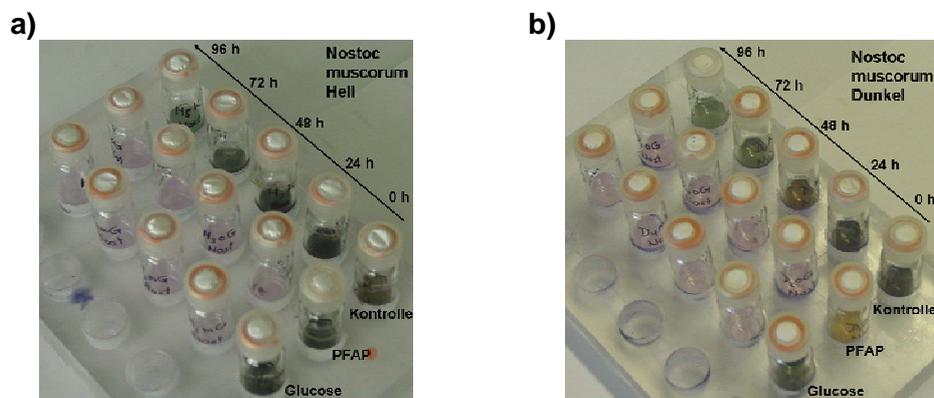
## 12.5 Ergebnisse der metabolischen Untersuchungen

### 12.5.1 Teilungsfähigkeit von *Synechococcus* PCC7942 bei Biotransformationen



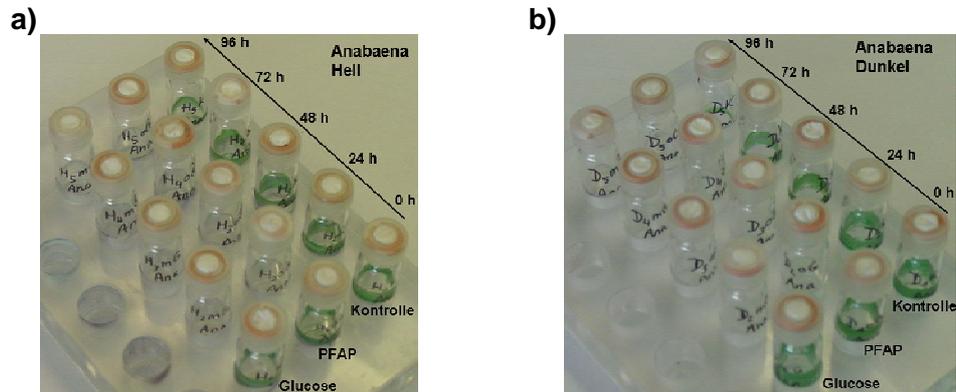
**Abbildung 12.11:** Teilungsfähigkeit von *Synechococcus* PCC7942 bei Biotransformation bei **a)**  $42 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  und **b)**  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . **Glukose:** Reaktionsansatz mit 10 mM PFAP mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  Glukose; **PFAP:** Reaktionsansatz mit 10 mM PFAP.

### 12.5.2 Teilungsfähigkeit von *Nostoc muscorum* bei Biotransformationen



**Abbildung 12.12:** Teilungsfähigkeit von *Nostoc muscorum* bei Biotransformation bei **a)**  $42 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  und **b)**  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . **Glukose:** Reaktionsansatz mit 10 mM PFAP mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  Glukose; **PFAP:** Reaktionsansatz mit 10 mM PFAP.

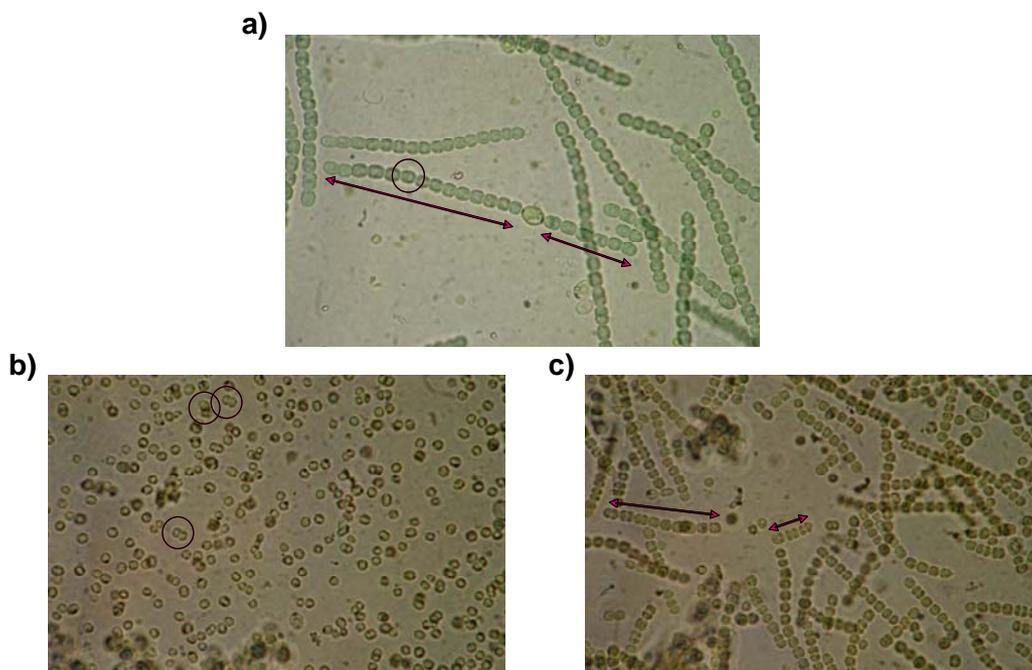
### 12.5.3 Teilungsfähigkeit von *Anabaena variabilis* bei Biotransformationen



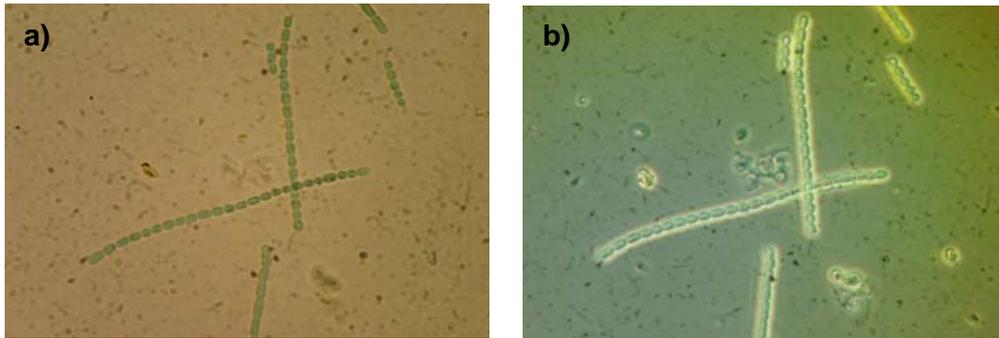
**Abbildung 12.13:** Teilungsfähigkeit von *Anabaena variabilis* bei Biotransformation bei **a)**  $42 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  und **b)**  $0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . **Glukose:** Reaktionsansatz mit 10 mM PFAP mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  Glukose; **PFAP:** Reaktionsansatz mit 10 mM PFAP.

### 12.5.4 Morphologie von Cyanobakterien nach Biotransformationen

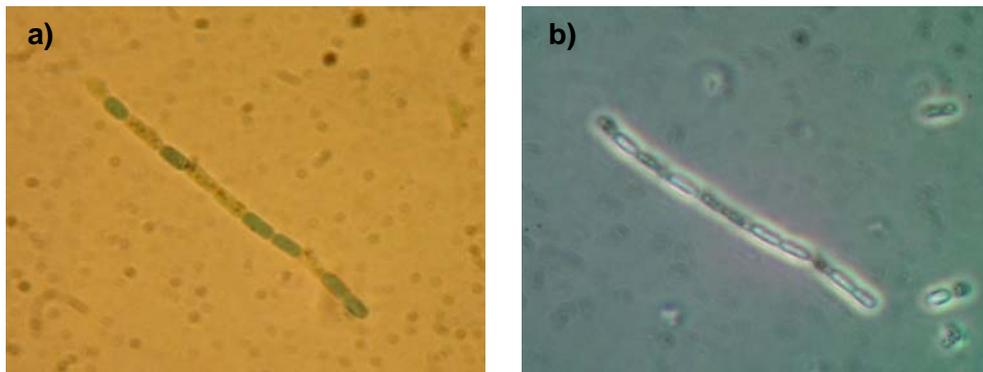
Der Einfluss der fermentativen Umsetzung auf Cyanobakterien zeigt sich in mikroskopischen Aufnahmen (Abbildungen 12.14, 12.15 und 12.16).



**Abbildung 12.14:** Fermentationsbilder von *Nostoc muscorum* (Hellfeld 1000X Vergrößerung). **a)** Kontrolle, **b)** Fermentation ohne Glukose, **c)** Fermentation mit Glukose. Pfeile und Kreise markieren ähnliche Zellverbände und Zellen.



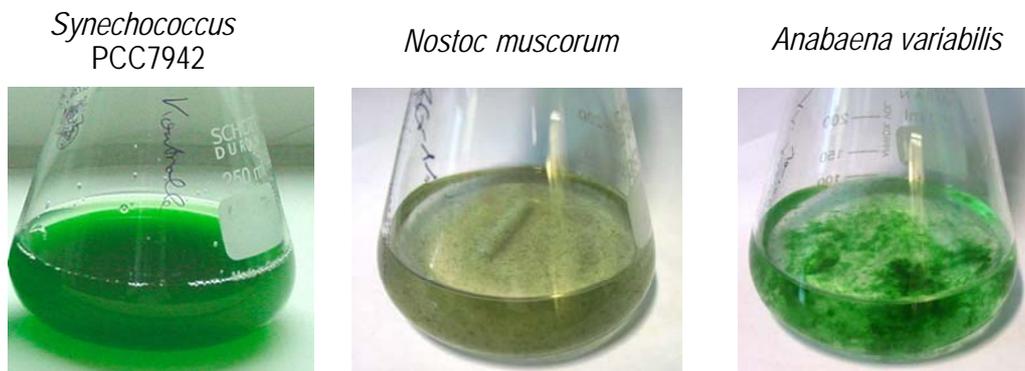
**Abbildung 12.15:** *Anabaena variabilis* Kontrolle **a)** Hellfeld **b)** Phasenkontrast (1000X Vergrößerung),  $10 \text{ g L}^{-1}$  Glukose,  $0 \text{ } \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$



**Abbildung 12.16:** *Anabaena variabilis* nach Biotransformation **a)** Hellfeld **b)** Phasenkontrast (2000X Vergrößerung),  $10 \text{ mM PFAP}$ ,  $10 \text{ g L}^{-1}$  Glukose,  $0 \text{ } \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Es wurde beobachtet, dass *Anabaena variabilis* und *Nostoc muscorum* bei Anwesenheit von PFAP lysieren.

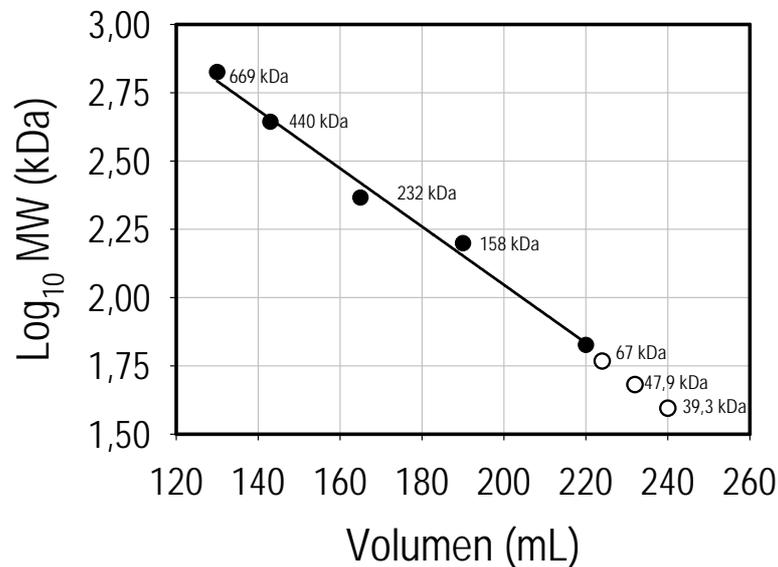
### 12.5.5 Morphologie von Flüssigkulturen mit Cyanobakterien



**Abbildung 12.17:** Bilder von gerührten Kolbenkulturen mit unterschiedlichen Cyanobakterienstämmen nach 168 h Kultivierung in BG-11-Medium.

## 12.6. Ergebnisse der Proteinreinigung

### 12.6.1 Molekulargewichtsbestimmung mit Gelfiltration



**Abbildung 12.18:** Eichgerade nach Gleichung 12.8 der Superdex 200 Säule mit Eichproteinen. Eichproteine (●), Fraktionen mit *in-vitro*-Ketonreduktion (○). Flussrate: 2mL min<sup>-1</sup>, 4°C.

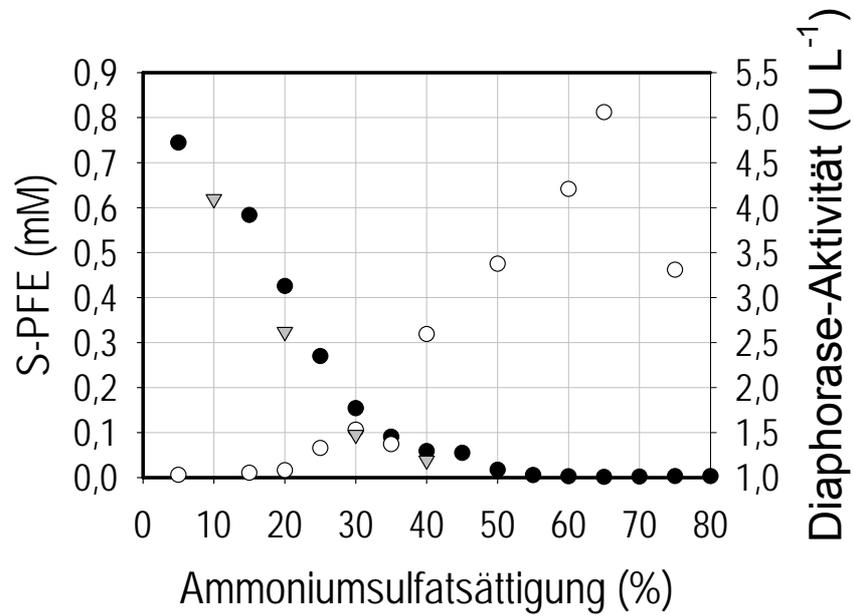
Gleichung 12.8:  $\lg MW = -0,0108 \text{kDaL}^{-1} \cdot V_{\text{Elution}} + 4,1865 \text{kDa}$

Mit  $MW$  Molekulargewicht, kDa  
 $V_{\text{Elution}}$  Elutionsvolumen, mL

### 12.6.2 Ammoniumsulfatfällung

Zur ersten Reinigung des Proteingemisches sollte die Ammoniumsulfatfällung untersucht werden. Das durch Sedimentation vorgeklärte Zellhomogenat wurde bei 4°C unter rühren mit unterschiedlichen Sättigungen an Ammoniumsulfat versetzt. Nach erfolgter Fällung wurde die Aktivität des Niederschlages und Überstandes gemessen. Es konnte eine deutliche Abreicherung der Oxidoreduktase im Überstand festgestellt werden, die sich im Pellet wiederfand (Abbildung 12.19)

Bei 30 % Sättigung wurde eine zunehmende Wiederfindungslücke festgestellt. Die Aktivität im Sediment nimmt bis 65 % Sättigung zu. Die Diaphoraseaktivität der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung korrelierte gut mit dem Verlauf der gebildeten Produktkonzentrationen an S-Alkohol.



**Abbildung 12.19:** Einfluss der Ammoniumsulfatsättigung auf die Aktivität der Oxidoreduktase. S-PFE gebildet durch den Fällungs-Überstand (●) und des resuspendierten Pellets (○). Diaphoraseaktivität des dialysierten Überstandes einer fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (▼).