

**Entwicklung und Anwendung von Optimierungsstrategien
in der Marinen Biotechnologie
unter besonderer Berücksichtigung der Charakterisierung
einer Tryptophan-5-Halogenase**

Vom Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik
der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Chem. Kai Muffler
aus Bremen

Tag der mündlichen Prüfung:	11. Juli 2007
Dekan:	Prof. Dr.-Ing. J. C. Aurich
Vorsitzender:	Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. habil. H.-J. Bart
Referenten:	Prof. Dr. rer. nat. R. Ulber Prof. Dr. rer. nat. T. Scheper

Kaiserslautern, 2007
D 386

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover und im Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Kaiserslautern unter der Leitung von Prof. Dr. Roland Ulber durchgeführt. Ihm danke ich für die interessante Themenstellung, seinen Anregungen bei vielen aufgetretenen Problemen und seine unkonventionelle Geldverwaltung in Zeiten von Haushaltssperren. Auch gelang es ihm, mir den Kontakt zur „Marine Community“ durch zahlreiche Kongressbesuche zu ermöglichen.

Für die Übernahme des Korreferates möchte ich mich an dieser Stelle bei Prof. Dr. Thomas Scheper bedanken.

Besonderer Dank gilt auch denjenigen, die durch ihre wissenschaftlichen Untersuchungen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben: Daranee Weewong, Claudia Wendt, Öznur Kökpinar, Marc Bouillon und Marco Retzlaff.

Dr. Rüdiger Pukall (DSMZ, Braunschweig) und Dr. Doris Akkermann (AG König, Universität Bonn) danke ich für die gute Kooperation im Forschungsprojekt „Wettbewerb auf Oberflächen“ und die Bereitstellung von marinen Bakterienstämmen und Bryozoenextrakten.

Unserem Projektpartner Prof. Dr. Karl-Heinz van Pée (TU Dresden) sowie seinem Arbeitskreis danke ich für die Bereitstellung rekombinanter Halogenaseproduzenten.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie der Uni Hannover für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, angeregte Diskussionen und gute Zusammenarbeit. Hervorzuheben im „Tech-Team“ ist hier Martina Weiß, ohne deren Hilfe ich bei den HPLC-Messungen sicherlich geringere „Raum-Zeit-Ausbeuten“ erhalten hätte.

Zudem sei an dieser Stelle den ehemaligen hannöverschen Kollegen sowie den „neuen“ pfälzer Kollegen gedankt, ohne die der Alltag an den jeweiligen Hochschulen und einige Abende sicherlich trister aber vermutlich auch „gesünder“ verlaufen wären.

Für das Korrekturlesen bin ich meinen Kollegen Nils Tippkötter und Svenja Kelly sowie meiner Mutter zu enormen Dank verpflichtet! Ohne ihre Unterstützung wäre sicherlich ein anderes syntaktisches Gesamtwerk herausgekommen.

Nur numerisch an letzter Stelle danke ich Anja für ihre unendliche Geduld während der „heißen“ Phase des Zusammenschreibens und dafür, dass sie mir liebevoll den Rücken für die Prüfungsvorbereitung frei gehalten hat.

Kurzzusammenfassung

Die enorme Nachfrage nach neuartigen Naturstoffen sowie Leitstrukturen für die (Teil-)Synthese pharmazeutischer Produkte verlangt ständig nach neuen Innovationen. Ein bedeutender Impuls ist dabei von der Marinen Biotechnologie zu erwarten, die seit einigen Jahren versucht, die sich bietenden medizinischen Potentiale auszuschöpfen. So können neuartige Wirkstoffe bzw. die für deren Produktion verantwortlichen Organismen und Enzyme isoliert und bereitgestellt werden. Häufig ist das Wachstum der Organismen jedoch stark limitiert sowie eine Produktion der Ziel-Metabolite nur unter bestimmten Bedingungen möglich, weshalb ein enormes Interesse an neuen Optimierungsmethoden zur Lösung des Problems besteht. Neuartige Lösungsansätze sollten daher im Rahmen dieser Arbeit verfolgt werden.

Untersucht wurde eine „biochemische“ Wachstums- und Produktionsoptimierung mariner Bakterien durch einen Zusatz von Homoserinlactonen zum Kultivierungsmedium. Dabei konnte neben einem verbesserten Wachstum diverser Prokaryonten eine leichte Variation im Metabolitspektrum ermittelt sowie eine geringfügig erhöhte Produktion biologisch aktiver Substanzen detektiert werden.

Soll das Wachstum von (marinen) Mikroorganismen optimiert werden, wird vom Anwender häufig eine unstrukturierte one-factor-at-a-time-Methode angewendet. Da diese in der Regel keine Beeinflussung der zu optimierenden variablen Parameter beachtet, wurden in dieser Arbeit alternativ rechnergestützte Optimierungen zur Umgehung dieses Problems durchgeführt. Zum Einsatz kam dabei eine Kombination aus einem Genetischen Algorithmus, welcher die Identifikation des globalen Optimums erlaubt und einem Simplex-Algorithmus, der zur Verfeinerung des bereits aufgefundenen Optimums dient. Hiermit konnte die Produktion einer marinen L-Serindehydratase im Rahmen einer Nährmediumsoptimierung um mehr als 50 % im Vergleich zum Referenzmedium gesteigert werden. Des Weiteren wurde ein im Polyketidscreening positiv aufgefallenes Bakterium (*Halomonas marina*) als Modellorganismus für ein neuartiges rechnergestütztes Verfahren eingesetzt, welches eine schnelle Identifizierung der Güte von Wachstumsparametern erlaubt und dabei eine repetitiv geführte Batch-Betriebsweise von Bioreaktoren nutzt.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Charakterisierung einer rekombinant exprimierten Tryptophan-5-Halogenase. Hierbei konnte nach der Identifizierung des Aktivitätsoptimums hinsichtlich des einzustellenden pH-Werts sowie der Temperatur die Halbwertszeit des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen bestimmt und mittels 2-D-Gelelektrophorese der pI-Wert des Enzyms erstmalig determiniert werden. Ein Fokus dieser Untersuchungen lag auf der Optimierung der Enzymkinetik. Dabei konnte insgesamt eine Verbesserung der Ausbeute um den Faktor 1,6 erzielt werden.

Schlagnworte: Marine Biotechnologie, Quorum Sensing, Repeated-Batch, Kultivierung, Genetische Algorithmen, Simplex-Algorithmus, Halogenasen

Abstract

Pharmaceutical research programmes demand for new pharmaceutical leads as well as novel biologically active natural products and enzymes which are responsible for their production. Hereby, marine biotechnology can act as supplying technology platform to fulfill these special requirements. However, a couple of organisms, enzymes and pharmaceutically interesting secondary metabolites can be supplied by marine biotechnologists. Unfortunately, rates of growth and production are usually low. Therefore an increasing request for new techniques and methods exists to circumvent this situation. One part of this work focuses on a “biochemical” optimization of growth and active natural metabolite production by supplementation of well known autoinducer substances (different homoserine lactones) to the fermentation medium. By this, some prokaryotes were cultivated with increased growth rates and additionally a variation in natural product synthesis was detected.

The provided optimization techniques and methods by process engineers are manifold. Nevertheless the frequently applied procedure for optimization is the classical one-factor-at-a-time-method with all its taints. Meaningful is the non-observance of influences which different parameters can have on each other in relation to the target function. To accomplish a more structured process this work focuses on computer aided methods as well. For this strategy a combination of two algorithms was used, during the first step an identification of the global optimum is intended to be accomplished by a genetic algorithm and the subsequently application of a simplex algorithm is meant to refine the already found conditions. By such an approach the composition of the fermentation medium for production of a L-serine dehydratase was optimized and the objective function could be enhanced of more than 50 % compared to the reference composition. Furthermore, a marine bacterium *Halomonas marina*, which was formerly identified as a potential producing organism of a polyketide synthase, was used as a test organism in a novel computer-aided fermentation approach. By this repetitive fermentation modus of a batch reactor the assessment of the adjusted cultivation parameters could be performed within a minimum of time.

Another central aspect of this work deals with the characterization of a recombinantly produced FADH₂-dependent tryptophan-5-halogenase. In the first instance the optimal pH and temperature were identified, thus the half-time of the enzyme could be determined for different temperatures. The application of a two-dimensional SDS-PAGE allowed the determination of the enzyme's pI for the first time. A focal point was the optimization of the enzyme's kinetic. In comparison with formerly studies the product formation was enhanced by the factor 1.6.

Keywords: marine biotechnology, quorum sensing, repeated batch cultivation, genetic algorithms, simplex algorithm

Abkürzungs- und Formelverzeichnis

λ	Wellenlänge
ε	Extinktionskoeffizient
μ_{\max}	maximale Wachstumsrate
5-Cl-Trp	5-Chlortryptophan
5-Br-Trp	5-Bromtryptophan
7-Cl-Trp	7-Chlortryptophan
A	präexponentieller Faktor
Abb.	Abbildung
ACP	Acyl-Carrier Protein
AS	Aminosäure
BFM	Biofeuchtmasse
BSA	Bovines Serum Albumin
BTM	Biotrockenmasse
c	Konzentration
D	Diffusionskoeffizient
DCPIP	2,6-Dichlorphenol-Indophenol-Natrium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E_A	Aktivierungsenergie
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigester, Ethylacetat
Em	Emission
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
EtOH	Ethanol
Ex	Exzitation
FAD	Flavinadenindinukleotid
FLR	Flavinreduktase

FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GA	Genetischer Algorithmus
GF	Gelfiltration
GMP	Good Manufacturing Practice
HNB	Hefe-Nähr-Bouillon
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSL	Homoserinlacton
HTS	High-Throughput-Screening
(I)MAC	(Immobilisierte) Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie
IPG	immobilisierter pH-Gradient
k	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
k. A.	keine Angabe
kat	Katal
kDa	kilo-Dalton
kHz	Kilohertz
K_M	Michaelis-Konstante
KPP	Kaliumphosphat
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LB-Plot	Lineweaver-Burk-Plot
Lsg.	Lösung
M	Molar
MB	Marine Broth
MCE	Mercaptoethanol
MeOH	Methanol
mL	Milliliter
MTA	Methylthioadenosin
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NAD	Nicotinadenindinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinadenindinucleotid
OD	Optische Dichte
OPA	o-Phtaldialdehyd

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
RE	Rohextrakt
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rws	roulette wheel selection
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionin
SwBasal	Seawater Basal Medium
SSM	Synthetic Seawater Medium
SUS	stochastic universal sampling
<i>t</i>	Zeit
Tab.	Tabelle
TBT	Tributylzinn
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
THF	Tetrahydrofuran
TGS-Puffer	Tris-Glycin-SDS-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Trp-5-Hal	Tryptophan-5-Halogenase
Trp-6-Hal	Tryptophan-6-Halogenase
Trp-7-Hal	Tryptophan-7-Halogenase
U	Unit(s)
W	Watt
<i>X</i>	Biomassekonzentration

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Aufgabenstellung	5
3	Optimierung durch biochemische Induktion.....	7
3.1	Theoretische Grundlagen der bakteriellen Kommunikation.....	9
3.2	Technische Einsatzfelder für Quorum Sensing	12
3.3	QS-vermittelte Untersuchungen am marinen Bakterium A011 (<i>Halomonas marina</i>).....	13
3.3.1	Isolierung, Einordnung und Klassifizierung des Stammes A011	13
3.3.2	Klassische Strategien zur Optimierung des Bakterienwachstums	16
3.3.2.1	Optimierung der Wachstumstemperatur.....	16
3.3.2.2	Optimierung des pH-Wertes	18
3.3.2.3	Einfluss verschiedener Ausgangskonzentrationen des Marine Broth Mediums auf das Wachstum von <i>Halomonas marina</i>	19
3.3.3	QS-Untersuchungen an <i>Halomonas marina</i>	21
3.4	Untersuchung eines QS-Stimulus auf <i>Flustra</i> -assoziierte marine Bakterienstämme	25
3.4.1	Isolierung, Extraktion und Wirkstoffproduktion <i>Flustra</i> -assoziiierter Bakterienstämme..	25
3.4.2	Einfluss eines QS-Stimulus auf die Gesamtzahl isolierbarer Mikroorganismen von <i>Flustra foliacea</i>	33
3.5	Synopsis	36
4	Rechnergestützte Optimierung von Bioprozessen	39
4.1	Theoretischer Hintergrund der verwendeten mathematischen Lösungsverfahren.....	41
4.1.1	Simplex-Algorithmus.....	41
4.1.2	Genetische Algorithmen	45
4.2	Einsatz von Simplex- und Genetischem Algorithmus zur Optimierung von Bioprozessen - Stand der Technik	52
4.3	Optimierung der L-Serindehydrataseexpression von <i>Paracoccus seriniphilus</i>	55
4.3.1	L-Serindehydratase	55
4.3.2	<i>Paracoccus seriniphilus</i> als L-Serindehydratase-Expressionsorganismus – Zusammenfassung von Vorarbeiten	56
4.3.3	Eingesetzte Strategie zur Optimierung der L-Serindehydrataseexpression unter Anwendung der Algorithmen	58

4.3.4	Optimierung der L-Serindehydratase-Produktion von <i>P. seriniphilus</i> mit Hilfe des Genetischen Algorithmus.....	61
4.3.5	Folgeoptimierung mit einem Simplex-Algorithmus	68
4.3.6	Synopsis	70
4.4	Entwicklung eines repetitiv geführten Batch-Verfahrens zur Optimierung von Wachstumsbedingungen.....	71
4.4.1	Vorüberlegungen zur Kultivierung im repetitiven Batch-Modus.....	71
4.4.2	Repetitiver Batch-Prozess – Stand der Technik	81
4.4.3	Parameteroptimierung mittels Simplex-Algorithmus einer <i>E. coli</i> -Fermentation.....	82
4.4.4	Optimierung des Wachstums am Beispiel des marinen Bakteriums <i>Halomonas marina</i> .	86
4.4.4.1	Anwendung eines Simplex-Algorithmus zur Optimierung der Wachstumsrate	86
4.4.4.2	Anwendung eines Genetischen Algorithmus zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen von <i>Halomonas marina</i>	91
4.4.4.3	Folgeoptimierung mit einem Simplex-Algorithmus	94
4.4.5	Synopsis	96
4.5	Enzymatische Halogenierung.....	97
4.5.1	Halogenierende Enzyme in der Übersicht.....	97
4.5.2	Aufreinigung einer NAD(P)H Flavin-Oxidoreduktase aus <i>E. coli</i> JM 109 (DE) pEE 1001 JRL1	106
4.5.3	Aufreinigung einer FADH ₂ -abhängigen Trp-5-Halogenase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> BL 915 + pSZexM2	110
4.5.4	Charakterisierung der Tryptophan-5-Halogenase	118
4.5.4.1	Vergleich der Chlorierung und Bromierung von Tryptophan.....	119
4.5.4.2	Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Halogenierung	120
4.5.4.3	Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Halogenase	122
4.5.4.4	Untersuchung der Halbwertszeit der Halogenase bei verschiedenen Temperaturen	123
4.5.4.5	Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Tryptophan-5-Halogenase.....	126
4.5.4.6	Charakterisierung der Halogenase mit Hilfe der 2-D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	127
4.5.4.7	Untersuchung der Halogenaseexpression im Schüttelkolben und Bioreaktor.....	131
4.5.5	Anwendung eines Genetischen Algorithmus zur Optimierung der Zusammensetzung des Halogenase-Assays	136
4.5.6	Kinetische Untersuchungen der Tryptophan-5-Halogenase.....	144
4.5.6.1	Einfluss der Substratkonzentration auf die Enzymaktivität	144
4.5.6.2	Untersuchung des Umsatz-Zeit-Verhaltens der Trp-5-Halogenase	147
4.5.6.3	Untersuchung des Umsatz-Zeit-Verhaltens bei gepulster Zugabe des Substrats	150
4.5.7	Ganzzelltransformation	153

4.5.8	Synopsis.....	155
5	Zusammenfassung und Ausblick	158
6	Anhang	163
6.1	Zusammensetzung der Kultivierungsmedien.....	163
6.1.1	Marine Broth 2216.....	163
6.1.2	Marine Broth 2216 Varianten	164
6.1.3	Artificial Seawater	164
6.1.4	Seawater Basal Medium	164
6.1.5	Synthetic Seawater Medium (SSM).....	165
6.1.6	Yeast Extract Malt Agar (YMA) Medium	165
6.1.7	Pepton-Hefeextrakt-Medium	166
6.1.8	Hefe-Nähr-Bouillon (HNB) Medium.....	166
6.1.9	Luria Broth (LB)-Medium zur Kultivierung rekombinanter <i>E. coli</i> -Stämme	167
6.2	Sonstige Lösungen.....	167
6.2.1	Saline	168
6.2.2	Kaliumphosphat-Puffer (KPP-Puffer).....	168
6.2.3	Stammlösung acylierter Homoserinlactone	168
6.2.4	Tris-EDTA-Puffer.....	169
6.3	Konservierung von Mikroorganismen	169
6.3.1	Stammhaltung auf Agarplatten	169
6.3.2	Stammhaltung in Gefrierkulturen	169
6.4	Verwendete Aktivitäts-Assays.....	169
6.4.1	Test auf antimikrobielle Wirksamkeit.....	169
6.4.2	L-Serindehydratase-Assay	170
6.4.3	Flavinreduktase-Assay.....	172
6.4.4	DCPIP-Test auf Reduktaseaktivität	173
6.4.5	Katalase-Assay	173
6.5	Proteinanalytik	174
6.5.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	174
6.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Whitaker und Granum	174
6.5.3	Durchführung der SDS-Gelelektrophorese.....	175
6.5.4	Zusätzliche Informationen zur 2-D-Gelelektrophorese.....	176
6.6	Prozessanalytik	180
6.6.1	Bestimmung der Optischen Dichte	180
6.6.2	Mikroskopische Zellzahlbestimmung.....	180
6.6.3	Bestimmung der Biotrockenmasse	180

6.6.4	Bestimmung der Biofeuchtmasse.....	181
6.6.5	Bestimmung der Wachstumsrate μ	181
6.6.6	Ermittlung des pH-Wertes	181
6.6.7	Bestimmung des Gelöstsauerstoffgehalts.....	181
6.6.8	Abgasanalytik (Kohlendioxid / Sauerstoff).....	182
6.7	KOH-Test zur Ermittlung des Gram-Verhaltens	182
6.8	Korrelation der Optischen Dichte mit der Biofeucht- bzw. Biotrockenmasse für <i>P. seriniphilus</i>	183
6.9	HPLC-Analytik der halogenierten Tryptophanderivate.....	184
6.10	Weitergehende Informationen zu den verwendeten Softwarepaketen.....	185
6.10.1	Parametereinstellungen für die Software MultiSimplex [®] Lite.....	185
6.10.2	Programmcode für den in MATLAB [®] implementierten Simplex-Algorithmus	186
6.10.3	Programmcode für den in MATLAB [®] implementierten einfachen Genetischen Algorithmus	187
7	Abbildungsverzeichnis	191
8	Tabellenverzeichnis.....	198
9	Literaturverzeichnis.....	201
10	Angaben zur Person.....	215
10.1	Betreute Studien- und Diplomarbeiten.....	215
10.2	Tagungsbeiträge	215
10.3	Veröffentlichungen.....	216
10.4	Lebenslauf.....	217

1 Einleitung

Der marine Lebensraum zeichnet sich durch seine enorme Größe und die sie besiedelnde Artenvielfalt aus, die sich über die verschiedensten marinen Habitate von der Tiefsee, den Korallenriffen, bis hin zu arktischen und tropischen Zonen bzw. Hydrothermalquellen erstreckt. Obwohl die Ozeane mehr als 70 % der gesamten Erdoberfläche bedecken und sich das Leben im Präkambrium bis vor ca. 3,5 Milliarden Jahren ausschließlich im Meer entwickelte [1], fokussierte sich die Erforschung der Biosphäre und der Nutzung des Naturstoffpools lange Zeit ausschließlich auf terrestrische Habitate. Hierbei stellten sich besonders Mikroorganismen der Gattung *Streptomyces* sp. als potente Produzenten bioaktiver Substanzen heraus [2].

Ein gezieltes Screening nach neuartigen Leitstrukturen marinen Ursprungs – besonders nach potentiellen Arzneiwirkstoffen gegen Krebs, antiviralen Substanzen und Antibiotika – setzte erst vor ca. 30 Jahren ein. Waren vor 20 Jahren weniger als zehn neuartige Substanzen bekannt [3], konnten bis zum Jahr 2001 bereits mehr als 12.000 neue Metabolite entdeckt werden [4]. Die direkte Ausbeute an marinen Naturstoffen, die bislang eine Marktreife erlangt haben, ist jedoch noch gering. So werden, außer den chemisch synthetisierten Analoga mariner Naturstoffe aus dem Schwamm *Cryptotethya crypta* Ara-A (acyclovir), welches antiviral wirksam ist bzw. Ara-C (cytosar-U, cytarabine), das als Antitumor-Substanz eingesetzt wird, nur Pseudopterosin C, extrahiert aus der karibischen Weichkoralle *Pseudopterogorgia elisabethae*, sowie das ω -conotoxin MVIIA aus *Conus magnus* kommerziell vermarktet [5, 6]. Während das Pseudopterosin Anwendung als entzündungshemmendes, schmerzlinderndes Additiv in High-End-Kosmetika findet, handelt es sich beim Wirkstoff aus der Kegelschnecke *Conus magnus* um ein sehr potentes Pharmakon, welches im Jahr 2005 in den USA die Marktzulassung als Analgetikum erhalten hat (Ziconotid; Handelsname: Prialt®). Das biologisch hoch aktive Ziconotid ist ein aus 25 Aminosäuren aufgebautes Polypeptid, das von der fischjagenden Kegelschnecke zur Lähmung ihrer Beute eingesetzt wird. Durch eine selektive Inhibierung neuronaler N-Typ-Ca-Kanäle dient es zum einen der Schmerzlinderung bei malignen Krankheiten wie Krebs oder AIDS und zum anderen zeigt es auch analgetische Effekte beim nicht-malignen, neuropathischen Schmerz [7]. Erwähnenswert sind das geringe Suchtpotential des Peptids sowie die in den Testphasen beobachtete konstante biologische Wirkstoffkonzentration, was es zu einer interessanten Alternative zu den häufig eingesetzten Derivaten des Morphins macht.

Das Potential der Marinen Biotechnologie in der zukünftigen Pharmaforschung wird auch daran deutlich, dass neue Wirkstoffe derzeit exklusiv marinen Ursprungs sind [8]. Zurzeit befinden sich ca. 15 Metabolite in verschiedenen klinischen Testphasen, wobei allein 14 von diesen Substanzen aus wirbellosen Tieren isoliert wurden [9]. Zwei bedeutsame Wirkstoff-Kandidaten sind Bryostatin 1 und Ecteinascidin-743. Das makrozyklische Lacton Bryostatin 1 wurde aus der Bryozoe *Bugula neritina* isoliert. Es dient

als Agonist der Proteinkinase C. Als Indikation gelten Melanome, Non-Hodgins Lymphome und Nierentumore [10, 11]. Im Jahr 2003 wurde vom Lizenzinhaber GPC Biotech die strategische Entscheidung getroffen, die Entwicklung sowie die weiteren klinischen Tests mit dem Wirkstoff nicht weiter fortzuführen, da anscheinend keine ausreichende Wirksamkeit in Korrelation zu einem akzeptablen Nebenwirkungsprofil aufgezeigt werden konnte. Trotzdem werden bis heute weitere Einsatzfelder untersucht, was durch etwa 80 Veröffentlichungen belegt werden kann, die nach dieser Entscheidung publiziert wurden (2004–2006). Ebenfalls weit fortgeschritten sind die klinischen Tests mit dem Antitumormittel Ecteinascidin-743, das aus der Seescheide *Ecteinascidia turbinata* isoliert wurde und nach der Marktzulassung von der spanischen Firma PharmaMar unter dem Markennamen Yondelis[®] zu beziehen sein wird. In den klinischen Tests konnte es erfolgreich bei bislang nicht therapierbaren Sarkomen eingesetzt werden [12].

Ein großes Problem der Pharmazeutischen Chemie liegt in der Bioverfügbarkeit der oben beschriebenen Substanzen. Um ein neues Arzneimittel zu etablieren, muss eine ausreichende Menge an biologisch aktiver Substanz zur Verfügung stehen, damit präklinische und klinische Testphasen durchlaufen werden können. Diese Tatsache wird jedoch von vielen Naturstoffchemikern nicht beachtet [13]. Hierbei handelt es sich um das Kernproblem der „Blauen Biotechnologie“, dem so genannten „supply problem“. Bei der Annahme, dass die von marinen Organismen gebildeten Naturstoffe hauptsächlich Sekundärmetabolite darstellen, können in der Regel lediglich Naturstoffausbeuten im Bereich von 10^{-4} – 10^{-6} % bezogen auf das Feuchtgewicht der Organismen erzielt werden [14]. Um beispielsweise ein Gramm des Antitumor-Wirkstoffes ET-743 zu isolieren, sind fast eine Tonne des Manteltierchens *E. turbinata* zu ernten und zu extrahieren [15].

Im Rahmen der Nachhaltigkeit und um keinen Raubbau an der marinen Biodiversität zu betreiben, haben sich die meisten Forschungsgruppen darauf geeinigt, das Sammeln mariner Invertebraten auf einen Bereich von 500 g bis 1 kg zu limitieren. Eine Alternative zum Sammeln enormer Mengen an Biomasse stellt die organisch-chemische Naturstoffsynthese dar. Hierbei zeigte sich bei der Synthese des Bryostatin 1, dass auch vereinfachte Strukturen eine hohe biologische Wirksamkeit aufweisen [16]. Da die chemische Totalsynthese mariner Naturstoffe häufig sehr viele Stufen umfasst, ist eine Herstellung im benötigten Umfang oftmals ökonomisch nicht vertretbar. Um dieses Problem zu überwinden, versucht man mittlerweile potente wirbellose Organismen in so genannten Aquafarmen im offenen Meer bzw. auch unter definierten Bedingungen in Containern zu kultivieren.

Aufgrund der enormen Biodiversität im marinen Lebensraum stellt sich jedoch die Frage, ob die zahlreichen Schwämme, Manteltierchen, Bryozoen und andere Wirbellose, Produzenten der aus ihnen isolierten Naturstoffe sind oder etwa die mit ihnen vergesellschafteten Mikroorganismen. Im Allgemeinen werden die genannten marinen Makroorganismen mit niederen Organismen wie Bakterien, Cyanobakterien und Pilzen besiedelt, welche im extra- bzw. intrazellulären Gewebe vorkommen [17, 18]. In man-

chen Fällen kann die Menge an assoziierten Mikroorganismen bis zu 40 % der gesamten Biomasse ausmachen [19]. Es liegt daher nahe, mannigfaltige symbiotische Beziehungen zwischen Mikro- und Makroorganismus zu vermuten, wobei die Kommunikation über das Medium Wasser erfolgt. Mittlerweile existieren deutliche Hinweise darauf, dass in einigen Fällen Mikroorganismen in die Biosynthese der aus Makroorganismen isolierten Naturstoffe involviert sind. So weist z. B. das Kohlenstoffgerüst des ET-743 eine sehr hohe Ähnlichkeit mit Safracin B (vgl. Abb. 1.1), einem Stoffwechselprodukt des ubiquitär vorkommenden Bakteriums *Pseudomonas fluorescens*, auf [20].

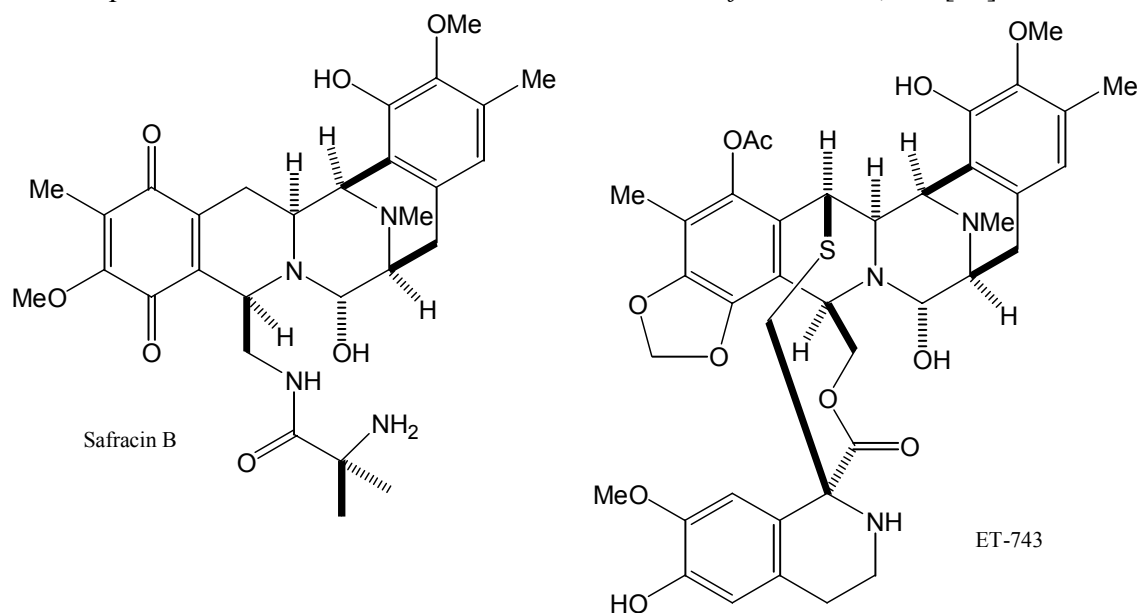


Abb. 1.1: Strukturformeln von Safracin B (aus *Pseudomonas fluorescens*) und ET-743 (aus dem Manteltierchen *Ecteinascidia turbinata*)

Im Falle des Bryostatin 1 ist mittlerweile bewiesen, dass ein bislang unkultivierbarer γ -proteobakterieller Symbiont „*Candidatus* Endobugula sertula“ an der Synthese des makrozyklischen Lactons beteiligt ist [21, 22]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass auch andere wirbellose Naturstoffproduzenten lediglich die biologisch aktiven Substanzen innerhalb der Nahrungskette akkumulieren.

Bei der unzulänglichen Kultivierbarkeit mariner Mikroorganismen unter Laborbedingungen handelt es sich um eines der größten Probleme der Marinen Biotechnologie. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnte gezeigt werden, dass erst die Spitze des Eisberges an marinen Mikroorganismen kultiviert wurde. So wird vermutet, dass bislang weniger als 1 % der insgesamt in marinen Habitaten existierenden Mikroorganismen bekannt sind [23, 24]. Neben der mangelnden Kultivierbarkeit gibt es zudem häufig Schwierigkeiten mit der Reproduzierbarkeit beim Sekundärmetabolitspektrum. Wird eine, zunächst als positiv bezüglich ihrer Bioaktivität deklarierte, marine Mischkultur vereinzelt, ist häufig mit einem Verlust der biologischen Wirksamkeit zu rechnen. Aus diesem Grund versucht man z. B. durch Zugabe von Kulturüberständen bzw. lebender Zellen zur marinen Submerskultur die Antibiotikaproduktion anzuregen oder durch Co-Kultivierungen im Biofilm eine Induktion

antimikrobieller Substanzen zu erreichen [25, 26]. Ebenso wird versucht, durch Optimierung der Fermentationsbedingungen und der Mediumszusammensetzung eine verbesserte Produktion der gewünschten Metabolite zu erzielen [27].

Neben den Sekundärmetaboliten fokussiert die Marine Biotechnologie mittlerweile ebenso auf die marinen Enzymsysteme. Von besonderer Bedeutung ist die Gruppe der Polyketidsynthasen (PKS), welche die Verknüpfung von Acyl-Coenzym A-Einheiten unter Ausbildung von Ringsystemen wie zum Beispiel beim Bryostatin 1 [28] katalysieren. Da besonders viele marine Naturstoffe mit biologischer Wirksamkeit ein Polyketidgerüst besitzen, sind für ein effektives molekulares Screening nach diesen Enzymen die für sie codierenden Gene von Interesse [29].

Ebenso sind mittlerweile die halogenierenden Enzyme in den Fokus der Marinen Biotechnologie gerückt [30]. Von großer Bedeutung sind dabei die Halogenasen, da sie in Biotransformationen eine selektive und spezifische Halogenierung eines Substrats ermöglichen und somit möglicherweise für Prozesse in der Weißen Biotechnologie genutzt werden können. Denkbar wäre z. B. die Substitution klassischer toxischer Halogenierungsagentien wie Thionylhalogenide oder Sulfurylhalogenide in der chemischen Darstellung halogener Intermediate durch diese Enzyme. Ein besonderes Interesse an solchen Prozessen besteht zudem von Seiten der pharmazeutischen Industrie, da halogenierte Naturstoffe oftmals eine höhere Aktivität als die nichthalogenierten besitzen [31] und von der chemischen Synthesechemie in der Bereitstellung reaktiver Zwischenprodukte, welche in nachfolgenden Reaktionen wie beispielsweise den populären Palladium-katalysierten Kupplungsreaktionen zur Darstellung von Feinchemikalien eingesetzt werden könnten.

Damit eine wirtschaftliche Nutzung der aus marinen Organismen gewonnenen Metabolite bzw. Enzyme ermöglicht werden kann, sind neuartige Anforderungen an die Kultivierungstechnik zu stellen, welche auf eine hohe Reproduzierbarkeit von Fermentationen und einen hohen Durchsatz ausgelegt sind. Die Bewältigung der dabei erhaltenen Menge an Daten ist nur noch rechnergestützt unter Zuhilfenahme mathematischer Lösungsmodelle möglich. Die hierfür eingesetzten Algorithmen können jedoch nicht nur in der nachgeschalteten Analyse großer Datenmengen zum Aufbau bestimmter Modellierungsansätze sondern ebenso in der direkten Analyse einzelner Versuchsschnitte zur direkten Optimierung und der Identifizierung eines globalen Optimums in einem mehrdimensionalen Suchraum genutzt werden.

2 Aufgabenstellung

Die Marine Biotechnologie hat in den letzten Jahren einen enormen Fortschritt bei der Kultivierung mariner Mikroorganismen und der Induktion der Sekundärmetabolitproduktion gemacht. Eine breite Anwendung haben die entwickelten Verfahren jedoch nicht gefunden, da sie sich in der Regel recht aufwendig gestalten, indem sie ein hohes Niveau an Kultivierungstechniken und einen enormen Zeitbedarf erfordern. Zudem bereitet besonders die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse Schwierigkeiten.

Gerade nach der Vereinzelnung von Mikroorganismen aus einer marinen Mischkultur ist es notwendig, effiziente Kultivierungstechniken zu etablieren, die eine schnelle Identifizierung optimaler Wachstumsbedingungen erlauben. Nur so gelingt es häufig, eine ausreichende Menge des gewünschten biologisch aktiven Naturstoffes zu isolieren und die notwendigen Bioassays durchzuführen.

So sollte im ersten Teilabschnitt dieser Arbeit die Möglichkeit einer „biochemischen“ Optimierung durch Zusatz von Acyl-Homoserin-Lactonen zu Fermentationsmedien eingehender untersucht werden. Diese Gruppe von Molekülen ist für die Kommunikation, dem so genannten Quorum Sensing, zwischen prokaryontischen, Gram-negativen Organismen verantwortlich und kann möglicherweise zur Induktion der Sekundärmetabolitproduktion bzw. zu einer Verbesserung des Wachstums mariner Mikroorganismen herangezogen werden.

Häufig kommt bei Optimierungen in multidimensionalen Suchräumen im Laboralltag eine Reduktion der Suchdimension zum Einsatz, wobei nacheinander die den Versuchsraum aufspannenden Parameter optimiert werden. Da die Parameter jedoch – besonders in der Nährmedienoptimierung – miteinander wechselwirken können, ist diese Vorgehensweise nicht praktikabel.

Um eine schnelle und reproduzierbare Optimierung des Wachstums mariner Mikroorganismen zu ermöglichen, sollte in einem weiteren Abschnitt dieser Arbeit die Entwicklung eines entsprechenden Systems forciert werden, welches effizient das Auffinden des globalen Optimums ermöglicht. Als Kultivierungstechniken werden im Rahmen dieses Abschnitts verschiedene Methoden wie Batch und Repeated-Batch untersucht und ihre Ergebnisse gegenübergestellt. Um die multidimensionalen Parameterprobleme nicht auf jeweils eindimensionale Problemstellungen reduzieren zu müssen und um eine spätere Automatisierung der gesamten Prozessregelung für folgende Anwendungen zu gewährleisten, sollten in MATLAB[®] implementierte Algorithmen für die Bewertung der erhaltenen Ergebnisse eingesetzt werden. Als Modellorganismus kam dabei ein von der Bryozoe *Bugula plumosa* isoliertes Bakterium (*Halomonas marina*) zum Einsatz.

Des Weiteren sollten diese Algorithmen zur Verbesserung der L-Serindehydrataseproduktion eines marinen Mikroorganismus, *Paracoccus seriniphilus*, eingesetzt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Betrachtung der kompletten Prozesskette einer rekombinant exprimierten Tryptophan-5-Halogenase. Ausgehend von der Kultivierung eines gentechnisch modifizierten *Pseudomonas fluorescens*-Stammes und der Isolierung der intrazellulär vorliegenden Halogenase sollte dieses Enzym nachfolgend hinsichtlich der Kinetik charakterisiert und zur Produktion des halogenierten Metaboliten eingesetzt werden. Ferner sollte eine Optimierung der enzymatischen Halogenierungsreaktion durchgeführt werden, da dies ein zentraler Anknüpfungspunkt für eine wirtschaftliche Gestaltung des Prozesses ist.

Der Rahmen dieser Arbeit besteht somit aus folgenden Arbeitspaketen:

- Untersuchung des Einflusses von Quorum Sensing vermittelnden Acyl-Homoserin-Lactonen auf das Wachstum mariner Mikroorganismen und auf deren Produktion biologisch aktiver Substanzen,
- Aufbau eines Kultivierungssystems, welches eine effiziente Ermittlung und Bewertung von Wachstumsparametern – unter Nutzung verschiedener Algorithmen – erlaubt,
- Einsatz der genannten Algorithmen zur Optimierung der L-Serindehydratase-Produktion des marinen Bakteriums *Paracoccus seriniphilus*,
- Aufreinigung und Charakterisierung einer rekombinant exprimierten Tryptophan-5-Halogenase,
- Optimierung der Aktivität des halogenierenden Enzyms.

3 Optimierung durch biochemische Induktion

Beim Transfer von Mikroorganismen aus ihren natürlichen Habitaten ins mikrobiologische Labor treten häufig Probleme bei der Kultivierbarkeit und somit auch bei der Gewinnung der von diesen Organismen gebildeten Sekundärmetabolite auf. Hauptgrund hierfür ist vermutlich die hohe Anpassung der Mikroorganismen an den Lebensraum Meer, der vielfältige symbiotische Beziehungen zulässt, derer bei der Übertragung in künstliche Umgebungen wie Fermenter und Schüttelkulturen kaum Rechnung getragen wird. Besonders entscheidend für eine erfolgreiche, reproduzierbare Kultivierung ist deshalb eine Nachahmung der in den Ozeanen vorkommenden Bedingungen. Es verwundert daher nicht, dass aus der Wassersäule isolierte, frei schwebende Mikroorganismen, andere Nährstoffansprüche haben als solche, die oberflächenassoziiert oder in inneren Geweben von Invertebraten vorkommen. Während Meerwasser typischerweise 10^4 – 10^6 Zellen pro mL enthält [32], können dem Meerwasser exponierte Oberflächen Zelldichten von bis zu 10^{12} Zellen pro mL aufweisen [33]. Zwei Beispiele für die Besiedlung der Oberfläche einer Bryozoe (Moostierchen) sind in Abb. 3.1 dargestellt.

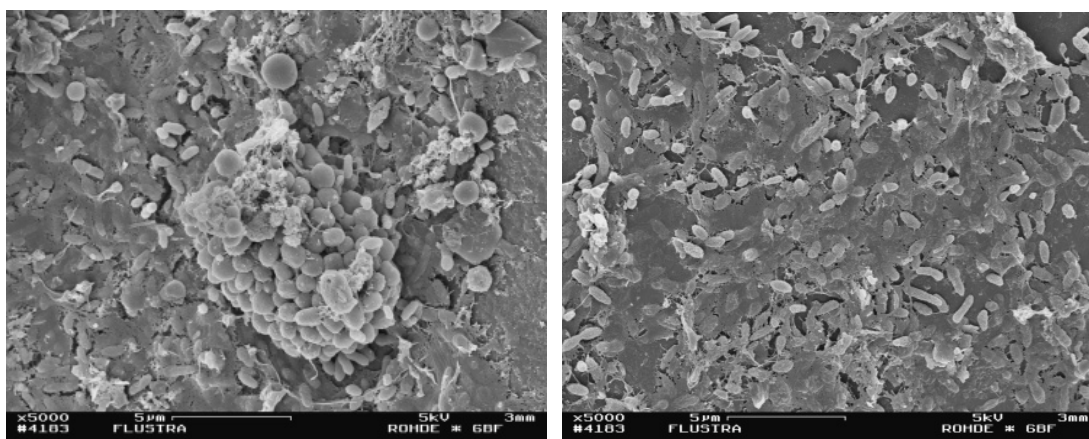


Abb. 3.1: Mikrobieller Bewuchs von *Flustra foliacea* (Aufnahmen: Dr. Manfred Rohde, GBF, Braunschweig) [34]

Meerwasser gilt allgemein als nährstoffarmes Medium. Es ist daher davon auszugehen, dass sich die planktonischen Mikroorganismen an diese Nische adaptiert haben. Sollen Organismen aus der Wassersäule im Labor kultiviert werden, misslingt dies häufig durch den Einsatz von Medien mit hohen Nährstoffgehalten. Durch den Einsatz der so genannten Verdünnungskultur ist es schließlich gelungen, eine erhöhte Zahl kultivierbarer Stämme zu isolieren [35].

Unklar ist aber immer noch, wo die Grenze zwischen oligotrophen und eutrophischen Stämmen verläuft. So konnten sich eutrophische Mikroorganismen derart an andere, geringere Nährstoffkonzentrationen adaptieren, dass ihr Wachstum als obligat oligo-

troph zu beschreiben war [36]. Der umgekehrte Fall, die Konvertierung von obligat oligotrophen in fakultativ oligotrophe Bakterien wurde ebenfalls beobachtet [37, 38].

Von großer Bedeutung für das limitierte Wachstum mariner Mikroorganismen ist neben dem Mangel an Makronährelementen vor allem der in ihren Habitaten vorliegende Eisenmangel [39, 40, 41]. Um dennoch Eisen-Ionen aus der Umgebung aufzunehmen, besitzen viele Organismen die Fähigkeit Eisen-komplexierende Moleküle, so genannte Siderophore, zu bilden, die eine erleichterte Eisenresorption ermöglichen [42]. Ein beeindruckendes Beispiel für die Bedeutung des Eisens bezüglich des Wachstums von Algen in den Meeren zeigen mehrere Versuche, die in den besonders eisenarmen Polarregionen durchgeführt wurden. Hierbei wurde durch Einleiten von Eisensalzen eine künstliche Algenblüte induziert. Durch erhöhte Photosyntheseraten sollte untersucht werden, ob die Algen als Speicher des atmosphärischen CO₂ dienen können [43, 44, 45].

Häufig wird zur Gewinnung und Kultivierung mariner Mikroorganismen ein von ZoBell in den vierziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts entwickeltes Medium eingesetzt [46], welches bei der Formulierung von Alternativen oft als Referenzmedium verwendet wird [47]. ZoBell konnte damals mit einem Medium, das 0,5 % Bacto-Pepton und 0,01 % Eisenphosphat in gealtertem Seewasser enthielt, eine maximale Anzahl mariner Bakterien kultivieren. Ein Jahrzehnt später wurde mit dem Zusatz von Hefeextrakt ein Standardnährmedium für die Marine Biotechnologie formuliert [48], welches heute unter leicht veränderter Zusammensetzung – statt Eisenphosphat wird 0,1 % Eisencitrat eingesetzt – unter dem Namen Marine Broth 2216 firmiert und kommerziell bezogen werden kann (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird dieses Standardmedium verwendet, da somit ein eisenlimitiertes Wachstum ausgeschlossen werden kann.

Eine besondere Anpassung an die nährstoffarmen Bedingungen der Meere hat sich in so genannten Biofilmen vollzogen. Hierbei handelt es sich um Konglomerate von verschiedensten marinen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen, Algen bzw. Protozoen. Eingebettet in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) diverser Makromoleküle wie z. B. Proteine, Polysaccharide, können in diesem Habitat hochkomplexe Ordnungen sowie Spezialisierungen einzelner Organismengruppen auftreten. Von Bedeutung hierfür ist die Kommunikation von (Mikro-)Organismen untereinander, wobei zwischen der Kommunikation einer einzelnen Spezies und derer über Speziesgrenzen hinweg zu unterscheiden ist (vgl Kap 3.1). Für diesen Zweck sind die Mikroorganismen mit bestimmten Rezeptoren ausgestattet, die eine über chemische Botenstoffe vermittelte Kommunikation ermöglichen. Hilfreich ist hierbei die Natur der Matrix Biofilm, da sich die Diffusionskoeffizienten bei kleinen Molekülen nur gering von denen im freien Wasser unterscheiden. Dieser Sachverhalt wird anschaulich durch Tab. 3.1 illustriert.

Tab. 3.1: Übersicht zum diffusiven Stofftransport verschiedener Moleküle in Biofilmen, repräsentiert durch das Diffusionskoeffizientenverhältnis ($D_{\text{Biofilm}}/D_{\text{Wasser}}$) [33]

Molekül	Molare Masse [g/mol]	$D_{\text{Biofilm}}/D_{\text{Wasser}}$
O ₂	32	0,98
Fluorescein	332	0,91
Dextran	4.000	0,76
Dextran	38.000	0,85
Dextran	580.000	0,26
Rinderserumalbumin	68.000	0,86
Katalase	225.000	0,67
DNA	3.200.000	0,63

Eine analoge Kommunikationsform wie in Biofilmen kann jedoch auch in nährstoffreichen Habitaten wie z. B. in inneren Organen von Fischen oder Geweben von Schwämmen auftreten. Im freien Ozean besitzt die Kommunikation dagegen aufgrund der deutlich geringeren Zelldichten und der enormen Verdünnung der Signalmoleküle eine untergeordnete Bedeutung.

Hintergrund und Theorie der bakteriellen Kommunikationsformen ist daher Gegenstand des nachfolgenden Kapitels.

3.1 Theoretische Grundlagen der bakteriellen Kommunikation

Mikroorganismen sind stets wechselnden umweltbedingten Einflüssen wie z. B. pH, Temperatur, Osmolarität oder Nährstoffangebot ausgesetzt. Daher haben sie verschiedene Systeme entwickelt, die eine Adaption an sich verändernde Umgebungsbedingungen erlauben. Hierzu zählt beispielsweise die Repression oder Aktivierung spezifischer Zielgene durch fluktuierende Umweltbedingungen [49].

Eine weitere Facette von „stimuli-response“-Mechanismen findet man in der bakteriellen Zell-Zell-Kommunikation mittels kleiner Signalmoleküle, so genannter Autoinducer. Während man zunächst annahm, dass es sich lediglich um ein seltenes Phänomen einiger obskurer Mikroorganismen handelt, scheint es heute offensichtlich, dass viele Mikroorganismen in der Lage sind, mit benachbarten mikrobiellen Populationen Informationen auszutauschen. Mittlerweile konnte eine Vielzahl an Signalmolekülen und die von ihnen induzierten Signalkaskaden identifiziert werden, wovon viele in eine Regulationsform eingeordnet werden können, die als Quorum Sensing (QS) bezeichnet wird. Dieser Term wurde zum ersten Mal in einem Review von Fuqua et al. [50] erwähnt und dient der genaueren Beschreibung einer solchen Regulationsform. Während des Zellwachstums beginnen die Zellen spezifische Autoinducer zu

produzieren, deren extrazelluläre Konzentration mit der Zelldichte des produzierenden Organismus korreliert. Diese Signalmoleküle können wiederum von den Zellen wahrgenommen werden, wodurch diese ihrerseits die Populationsdichte abschätzen können und schließlich die Genexpression bezüglich Veränderungen in der Zelldichte kontrollieren. So sind beispielsweise Phänomene mikrobiellen Verhaltens wie die Ausbildung eines Biofilms, die Produktion von Antibiotika oder die Virulenz Quorum Sensing reguliert [51]. Das bedeutet, dass ein bestimmtes Verhalten erst ab einem bestimmten „Quorum“ bzw. einer bestimmten Schwellenkonzentration der Signalmoleküle auftritt. Die Kommunikation kann hierbei sowohl zwischen Bakterien einer Population als auch mit anderen Pro- und sogar Eukaryonten über ein bakterielles „Esperanto“ erfolgen. Um diese Kommunikation zu unterbinden und damit unter anderem die Virulenzfaktoren auszuschalten, produzieren und sekretieren viele Organismen Autoinducer zersetzende Enzyme. Durch die Produktion von Agonisten der Signalmoleküle besteht ebenso die Möglichkeit, das Quorum Sensing zu unterbinden.

Beschrieben wurde eine Zell-Zell-Kommunikation erstmals Ende der siebziger Jahre am biolumineszierenden marinen Bakterium *Vibrio fischeri* [52, 53]. Dieses Bakterium lebt unter anderem auch in symbiotischen Verbänden in verschiedenen marinen Makroorganismen, wobei der Wirt die biolumineszierenden Eigenschaften des Bakteriums für spezifische Zwecke wie dem Anlocken von Beute, der Abwehr von Fraßfeinden oder bei der Partnersuche auszunutzen vermag. Im Gegenzug hierfür findet *V. fischeri* in den für die Lichtproduktion vorhandenen Organen eine nährstoffreiche Umgebung [54, 55], welche für die Biolumineszenz von größter Bedeutung ist. Dieser Quorum Sensing regulierte Prozess tritt nämlich nur auf, wenn *V. fischeri* in genügend hoher Zellzahl in den entsprechenden Kompartimenten der Lichtorgane vorhanden ist. Während im Meer frei schwimmende Zellen dieses Bakteriums nicht-lumineszierend sind, können sich die symbiotisch lebenden Artgenossen bis zu Zelldichten von 10^{10} – 10^{11} Zellen/mL vermehren und den entsprechenden Autoinducer, ein acyliertes Homoserinlacton (HSL), akkumulieren. Ist eine bestimmte Schwellenkonzentration des Autoinducers erreicht, antworten die Zellen mit der Lichtproduktion [56].

Für die mikrobielle Kommunikation konnten bislang mehrere chemische Klassen von Signalmolekülen identifiziert werden. Im Allgemeinen sind zwei Hauptkategorien zu unterscheiden. Während Aminosäuren und Peptide üblicherweise der Kommunikation Gram-positiver Bakterien dienen [57, 58, 59], nutzen Gram-negative Bakterien Fettsäurederivate [56]. Da in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf Kultivierungen Gram-negativer Zellen liegt, soll an dieser Stelle nur auf das von ihnen benutzte Quorum Sensing Systems eingegangen werden.

Die Aufklärung der Kommunikations-Kaskade von *V. fischeri* gelang in den achtziger Jahren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass zwei regulatorische Komponenten für diesen Prozess erforderlich sind: das LuxI Protein, welches für die Produktion des HSL-Autoinducers verantwortlich ist und das LuxR Protein, das den Autoinducer bindet und die Transkription des Luciferase Operons aktiviert [60, 61]. Während des Wachstums produzieren die Zellen den Autoinducer (vgl. Abb. 3.2). Als Funktion des Zellwachs-

tums akkumulieren sich daher bei höheren Zelldichten die Signalmoleküle und interagieren ab Konzentrationen im mikromolaren Bereich mit dem LuxR Protein. Der gebildete LuxR-Autoinducer-Komplex bindet daraufhin an den Luciferase-Promoter und aktiviert die Transkription. Die Lichtproduktion korreliert daher sehr stark mit der Zelldichte.

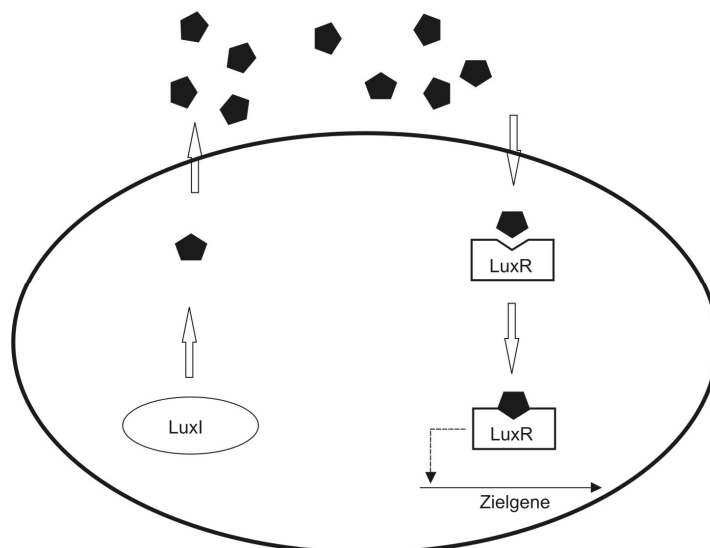


Abb. 3.2: LuxI/LuxR QS-System Gram-negativer Bakterien. Das LuxI-homologe Protein ist die Autoinducer-Synthase, welche die Bildung der Acyl-HSL-Autoinducer katalysiert (schwarze Pentagone). Diese können frei durch die Zellmembran diffundieren und akkumulieren sich bei hohen Zelldichten. Ist die Konzentration des Autoinducers hoch genug, bindet das LuxR-homologe Protein das Signalmolekül und der entstandene LuxR-Autoinducer-Komplex bindet an die Promotoren der Zielgene und aktiviert die Transkription [51].

Inzwischen konnte für mehr als 25 Gram-negative Bakterienstämme nachgewiesen werden, dass diese einen dem *V. fischeri* analogen Kommunikationsmechanismus aufweisen, in dem das System LuxI/LuxR konserviert ist [62, 63, 64, 65]. Das LuxI-homologe Enzym produziert hierbei den spezifischen Autoinducer. Dies geschieht durch Kopplung der Acyl-Seitenkette eines spezifischen Acyl-Acyl-Carrier Proteins (Acyl-ACP) aus dem Fettsäurestoffwechsel an einen Homocysteinrest von *S*-Adenosylmethionin (SAM). Das gebildete Intermediat lactonisiert schließlich zum acylierten HSL und Methylthioadenosin (MTA) wird frei [66, 67, 68, 69].

Neben diesem Standard-Kommunikationssystem existieren auch noch höhere, komplexere Systeme, welche hierarchisch aufgebaut sind und auf dem LuxI/LuxR-System basieren. Es wurden aber auch andere Wege der Signalübertragung gefunden. Beispiele hierfür finden sich in einem Übersichtsartikel von Whitehead et al. [56].

Durch die in den natürlichen Habitaten vorkommenden vielfältigen symbiotischen Beziehungen ist davon auszugehen, dass unter anderem auch das Wachstum von Mikroorganismen bzw. deren Produktion biologisch aktiver Substanzen Quorum Sensing kontrolliert ist. Eine Übersicht über verschiedene technische Einsatzfelder der zielgerichteten Nutzung der QS-Regulation ist in Kap. 3.2 dargestellt.

3.2 Technische Einsatzfelder für Quorum Sensing

Durch die Entschlüsselung der bakteriellen Kommunikation sind vielfältige neue Optionen zur Kontrolle von bestimmten Phänotypen von Mikroorganismen in den Fokus der Forschung gerückt. So kann beispielsweise durch die Blockierung der Quorum Sensing Regulation von pathogenen Stämmen wie *Pseudomonas aeruginosa*, welcher als Auslöser hartnäckiger Lungenentzündungen bei Mukoviszidose-Patienten gilt, durch den Einsatz von Agonisten der Signalmoleküle diese pathogene Eigenschaft unterbunden werden. Auch bildet diese Blockade der Zell-Zell-Kommunikation neue Therapieansätze bei bereits antibiotikaresistenten pathogenen Keimen, da kaum eine Möglichkeit existiert, dass die Bakterien zur Entfaltung ihrer Virulenz eine von der QS-Regulation abweichende Form der Kommunikation aufbauen [70]. Ebenfalls von größter Bedeutung ist die Bekämpfung mikrobieller Biofilme. Da die gesamte Biofilmbildung QS-reguliert ist, könnte man hier durch den Einsatz von Agonisten die Ausbildung von Biofilmen an Oberflächen von Transplantaten oder Kathetern verhindern. Biofilme stellen aber nicht nur ein Problem im Gesundheitsbereich dar, sondern können auch an vielen anderen Oberflächen gefunden werden, wo sie durch das so genannte Biofouling Schäden in enormer Höhe anrichten können [71]. So werden allein die Folgekosten der US-Navy zur Beseitigung von Biofilmen an Schiffskörpern auf eine Mrd. US-Dollar beziffert. Diese Entfernung dient der Wiederherstellung der hydrodynamischen Eigenschaften der Schiffskörper und senkt den durch den Bewuchs gestiegenen Treibstoffbedarf [72]. Um Biofouling an Schiffsrümpfen oder anderen Gegenständen zu unterbinden, werden diese häufig mit Schutzlacken, die Tributylzinn (engl. TBT) enthalten, bestrichen. Hierdurch gelangen jedoch große Mengen dieser kanzerogenen und teratogenen Substanz in das Meerwasser, akkumulieren sich im Wasser und in den Sedimenten, was schließlich zu einer Zerstörung der sensiblen marinen Habitate und deren Biodiversität führt. Bislang existiert lediglich ein Moratorium zum Einsatz von TBT in Europa. Doch handelt es sich hierbei um ein globales Problem, welches nicht vor kontinentalen Grenzen halt macht. Ein Einsatz von QS-blockierenden Agonisten als Alternative zum TBT wird derzeit intensiv untersucht [73].

Die Entdeckung der QS-Regulation erlaubt aber nicht nur eine Unterbindung der Kommunikation, um die Bildung von Biofilmen oder virulente Eigenschaften zu unterdrücken, sondern auch die Regulation erwünschter Phänotypen. Hierzu zählen z. B. die Induktion der Sekundärmetabolitproduktion oder eine Verbesserung des mikrobiellen Wachstums.

So konnten Bussmann et al. [74] anhand eines Zusatzes dieser Art von Signalmolekülen zu einem Anreicherungsmedium zeigen, dass die Anzahl an kultivierbaren Mikroorganismen aus wässrigen Habitaten signifikant zunahm. Würde ein analoger Transfer auf marine Organismen möglich sein, könnte sich hiermit eventuell die Möglichkeit bieten, bislang als unkultivierbar klassifizierte Organismen anzureichern und schließlich deren genomisches Potential auszuschöpfen.

3.3 QS-vermittelte Untersuchungen am marinen Bakterium A011 (*Halomonas marina*)

Im Rahmen dieses Kapitels wird die Isolierung des marinen Bakteriums A011 (*Halomonas marina*) beschrieben sowie der Mikroorganismus eingehender charakterisiert und hinsichtlich eines QS-Stimulus auf das Zellwachstum und die Produktion biologisch aktiver Substanzen untersucht. Angewandt wurden Signalmoleküle aus der Klasse der acylierten Homoserinlactone, die verschiedene Längen im Alkylrest aufwiesen. Die Grundstruktur der eingesetzten, acylierten Homoserinlactone ist in Abb. 3.3 dargestellt.

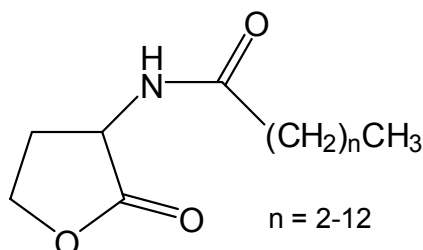


Abb. 3.3: Grundgerüst der eingesetzten Homoserinlactone

3.3.1 Isolierung, Einordnung und Klassifizierung des Stammes A011

Das marine Bakterium A011 wurde von Dr. R. Pukall (DSMZ, Braunschweig) im Rahmen eines Verbundprojektes des Landes Niedersachsen (Forschungsschwerpunkt Meeresbiotechnologie) von der Bryozoe *Bugula plumosa* isoliert. Die Probenahme der Moostierchen erfolgte in der Nordsee nahe Helgoland am Süddamm/Vorhafen in 6–8 m Wassertiefe im April 1999 von Mitarbeitern des Forschungsinstitutes Terramare, Wilhelmshaven.

Zur Isolierung des Bryozoen-assoziierten Bakteriums wurde nach dreimaligem Waschen mit sterilem Seewasser (vgl. Kap. 6.1.3) 1 g des Bryozoenmaterials in 10 mL steriler Lösung aus 0,1 % Natriumcholat, 0,4 g Chelex 100 und 0,5 g PEG 6000 30 min gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und in verschiedenen Verdünnungen auf unterschiedlichen Isolierungsmedien ausplattiert. Die taxonomische Bestimmung erfolgte mit Hilfe einer 16S-rDNA-Sequenzanalyse, woraufhin der Organismus als *Halomonas marina* klassifiziert wurde [75].

Die Anzucht des Bakteriums für weitere Untersuchungen erfolgte auf einem verdünnten MB-Medium (MB20 + 1 g/L Glucose; vgl. Kap. 6.1.2) bei 28 °C.

In einem Screeningverfahren nach spezifischen Biosynthesegenen wurde das erhaltene Bakterienisolat auf codierende Genfragmente für Domänen von Polyketidsynthasen vom Typ I/Typ II sowie nonribosomaler Peptidsynthasen (NRPS) getestet [75], da Polyketide sowie peptidische Verbindungen, wie z. B. Erythromycin, Tetracycline oder Vancomycin, für die Wirkstoffforschung interessante Sekundärmetabolite darstellen. Die Analyse des erhaltenen PCR-Produkts weist die in Tab. 3.2 dargestellten Sequenzhomologien der abgeleiteten Aminosäuresequenzen auf. Dabei konnte der Stamm als potentieller Produzent eines Polyketids vom Typ I (Makrolid-Typ) klassifiziert werden.

Tab. 3.2: Sequenzhomologien der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der PCR-generierten potentiellen *pks*-Genfragmente des untersuchten Stammes A011 im Vergleich zu publizierten Gensequenzen [75]

Homologe Gensequenzen	Identität ²	Homologie ²	Referenz ¹
<i>wcbR</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50 → potentieller PKS Typ I	65 %	82 %	BX640445
<i>stiA</i> , <i>Stigmatella aurantiaca</i> (Stigmatellin) → PKS Typ I	51 %	68 %	AJ421825
<i>amphJ</i> , <i>Streptomyces nodosus</i> (Amphotericin) → PKS Typ I	50 %	65 %	AF357202

¹Accession-Nr. in Genbank; ²Identität/Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz

In Vorversuchen zeigte sich, dass der Stamm auf dem genannten Medium nur geringe Biomassekonzentrationen erreicht [76]. Deshalb wurde zunächst ein Scale-up auf einen 30 L-Bioreaktor durchgeführt, um ausreichend Biomasse für den Downstream-Prozess zu erhalten, wodurch aus den nachfolgenden chemischen und biologischen Assays qualitative Aussagen getroffen werden sollten, ob *Halomonas marina* ein potentieller Wirkstoffproduzent ist.

Die Produktion der Biomasse erfolgte zweifach im 30 L-Maßstab im Fermenter Biostat[®] UD (B. Braun). Hierzu wurde das Medium MB20 mit 3 mL des Antischaummittels Desmophen 3900 (Bayer AG) versetzt und für 20 min bei 121 °C mit Heißdampf autoklaviert. Anschließend wurde mit einer sterilen, konzentrierten Glucoselösung die Konzentration auf 1 g/L im sterilisierten Medium eingestellt. Beimpft wurde mit 180 mL (0,6 %) einer Übernachtskultur von *Halomonas marina*. Die Kultivierung erfolgte für 24 h bei 28 °C und 150 rpm ohne pH-Kontrolle. Die Begasung mit steriler Luft erfolgte mit einem Volumenstrom von 10 L/min (0,33 vvm).

Zur Separation der Zellen von der Fermentationsbrühe wurde eine kontinuierlich arbeitende Kühlzentrifuge, Biofuge 28 RS (Fa. Heraeus Sepatech), eingesetzt. Die Zentrifugation erfolgte bei 4 °C, 10.000 rpm (Titandurchflussrotor 8575) mit einer Flussrate von 120 mL/min.

Das erhaltene Bakterienpellet hatte eine Feuchtmasse von 61,6 g, was einer Biomassekonzentration von 1,03 g/L entspricht. Nach Gefriertrocknung resultierte eine Trockenmasse von 9,5 g. Die Extraktion des getrockneten Pellets mit Methanol und Dichlormethan lieferte nach Abzug der Lösungsmittel Extraktmassen von 2,0 g bzw. 0,8 g [75]. Der Kulturüberstand wurde erschöpfend mit Ethylacetat extrahiert (Dr. Krüzfeld, GBF Braunschweig) und lieferte 1,0 g Rohextrakt.

Als Testverfahren zum Nachweis der biologischen Aktivität des Extrakts diente ein Agardiffusionstest nach Schulz et al. [77], wobei als Testorganismen die Bakterien *Bacillus megaterium* (Gram-positiv), *Escherichia coli* (Gram-negativ), die Pilze *Microbotryum violaceum* (Ustomycetes), *Mycotypha microspora* (Zygomycetes), *Eurotium rubrum* (vormals *E. repens*), *Ascomycetes* sp. und *Fusarium oxysporum* (Deuteromycetes) sowie die Microalge *Chlorella fusca* (Chlorophyceae) [75] eingesetzt wurden. Bei der Durchführung der jeweiligen Tests wurden die Rohextrakte mit einer Konzentration von 1 mg/mL in einem leichtflüchtigen Solvens gelöst und 50 µL dieser Lösung auf sterile Antibiotika-Testplättchen (Schleicher & Schuell 2668) pipettiert, welches anschließend auf eine für den jeweiligen Testorganismus geeignete Agarplatte gelegt und mit einer Keimsuspension der Organismen besprüht wurde. Zur Bewertung der biologischen Aktivität diente der nach einer spezifischen Inkubationszeit erhaltene Hemmhof bzw. die Hemmzone (Zone deutlich schwächeren Wachstums), die durch Messung des Abstandes vom Plättchenrand bis zum Rand der Hemmzone bestimmt wurde [77]. Als Positivkontrollen dienten das die Zellwandsynthese hemmende Antibiotikum Benzylpenicillin, das die Proteinbiosynthese inhibierende Streptomycin (je 1 mg/mL in Methanol) sowie das Antimykotikum Miconazol (0,5 mg/mL in Dichlormethan) [75].

Als weiteres Kriterium zur Bewertung der biologischen Aktivität der Extrakte wurde ein Tyrosinkinase-Test eingesetzt. Mit diesem ist eine Abschätzung der antitumoralen Wirkung von Substanzen möglich. Hintergrund des Tests ist die Tatsache, dass aktivierte Tyrosinkinasen die Tumorzelle vor dem so genannten programmierten Zelltod (Apoptose) schützen können [78]. Zudem wirken zellrezeptorgebundene Tyrosinkinasen in Kombination mit verschiedenen Wachstumsfaktoren als Promotoren der Karzinogenese auf die Zellproliferation und induzieren schließlich maligne Zelltransformationen [78]. Bei der Durchführung des Tests wurden die Extrakte in einer Konzentration von 2 mg/mL in DMSO gelöst und 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt. Ermittelt wurde die Hemmung des Enzyms Tyrosinkinase p56^{lck} mit Hilfe des Tyrosine Kinase Assay Kit non-radioactive (Roche-Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 1534513) in einer Abwandlung der Methode nach Kirsch [79]. Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung ist in der Dissertation von D. Akkermann zu finden [75].

Des Weiteren wurde mit Hilfe des Reverse Transcriptase Assay Kit non-radioactive (Roche-Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 1468120) die Hemmung der HIV-1-Reversen Transkriptase untersucht (vgl. [75]).

Während die mit Methanol und Dichlormethan erhaltenen Extrakte des gefriergetrockneten Bakterienpellets keinen Hinweis auf eine biologische Wirksamkeit aufwiesen, zeigte der mit Ethylacetat erhaltene Extrakt des Kulturüberstandes eine biologische Aktivität im Agardiffusions-, sowie im Tyrosinkinase- und Reverse-Transkriptase-Test [75]. Im Agardiffusionstest konnte eine antifungale Wirksamkeit gegen *Microbotryum violaceum* mit einer Inhibitionszone von 7 mm ermittelt werden. Die Inhibierungen im Tyrosinkinase- und Reverse-Transkriptase-Test zeigten Aktivitäten von 59 % bzw. 29 %.

Aufgrund dieses interessanten Wirkspektrums lag es nahe, diesen Stamm für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Biomasseproduktion eingehender zu untersuchen, da die erzielten Biomasseausbeuten während der bislang eingesetzten Kultivierungsbedingungen für eine sinnvolle Produktion der Rohextrakte, wie bereits beschrieben, zu gering ausfielen. Die hierbei eingesetzten Strategien bilden den Hintergrund der nachfolgenden Kapitel.

3.3.2 Klassische Strategien zur Optimierung des Bakterienwachstums

Wie bereits im vorherigen Kapitel eingehend dargestellt, handelt es sich bei dem marinen Stamm *Halomonas marina* um einen Produzenten biologisch aktiver Sekundärmetabolite. Aufgrund der geringen Biomasseproduktion, die unter den bislang für die Kultivierung eingesetzten Bedingungen erzielt wurde, werden im Folgenden Versuche erläutert, die auf klassische „one-factor-at-a-time“-Weise die Optimierung der Inkubationstemperatur, des pH-Wertes des Kultivierungsmediums sowie des Nährstoffgehalts des verwendeten Mediums beschreiben.

3.3.2.1 Optimierung der Wachstumstemperatur

Die Temperatur ist vermutlich eine der bedeutendsten Umwelteinflüsse, die hinsichtlich des Wachstums sowie dem Aufrechterhalten des Zellmetabolismus existieren. Die Anforderungen unterschiedlicher Spezies können dabei sehr gravierend differieren und reichen von Temperaturen unter 4 °C bis zu über 110 °C. In der Regel zählen aber die meisten bekannten terrestrischen und marinen Mikroorganismen zu den mesophilen Spezies, deren Wachstumsbereich von 10 °C bis etwa 45 °C reicht [80]. Zur Ermittlung der optimalen Wachstumstemperatur wurde *Halomonas marina* in 500 mL Schüttelkolben mit einem Volumen von 100 mL eines 20%igen Marine Broth Mediums (vgl. Anhang 6.1.1) mit einem Zusatz von 1 g/L Glucose innerhalb eines Temperaturbereichs von 20–37 °C bei 120 rpm kultiviert. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Das Inokulum einer exponentiell wachsenden Vorkultur betrug 10^6 Zellen/mL. Als Bewertungskriterium der jeweiligen Temperatur hinsichtlich des Wachstums dienen die maximalen Wachstumsraten μ_{\max} , welche in Abb. 3.4 in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt sind. Die Berechnung der Wachstumsrate erfolgte analog Kap. 6.6.5.

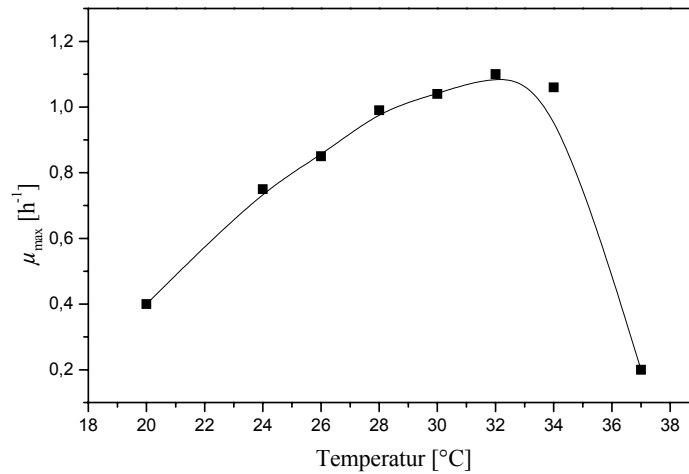


Abb. 3.4: Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Kultivierungstemperatur

Die maximale Wachstumsrate wird, wie Abb. 3.4 illustriert, bei etwa 32 °C erreicht. Insgesamt ist jedoch ein Wachstumsplateau zu erkennen, welches ungefähr von 28 bis 34 °C reicht. Als weiteres Kriterium bei einer Optimierung des Wachstums in Relation zur Temperatur ist neben der maximalen Wachstumsrate aber auch die maximale Biomasseproduktion bei gegebener Wachstumstemperatur zu betrachten, was in Abb. 3.5 dargestellt ist.

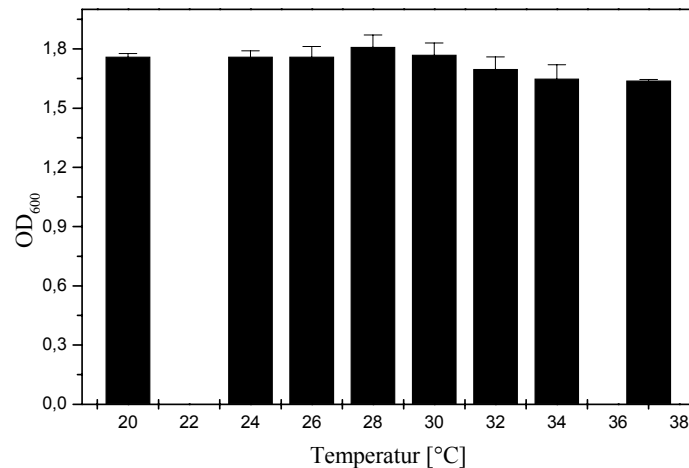


Abb. 3.5: Maximale Biomassekonzentration in Abhängigkeit von der Temperatur

Die resultierenden Unterschiede der Endkonzentration an Biomasse im Fermentationsmedium in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur fallen im Vergleich zu den beobachteten Variationen der Wachstumsrate deutlich moderater aus. Insgesamt befinden sich die ermittelten Biomassekonzentrationen in einem Bereich der Optischen

Dichte von etwa 1,7–1,8. Da bei 28 °C das Verhältnis von Wachstumsrate zur maximal erreichbaren Biomasse am günstigsten ausfiel, wurde diese Temperatur für die nachfolgenden Arbeiten gewählt.

3.3.2.2 Optimierung des pH-Wertes

Neben der Temperatur ist besonders der pH-Wert des Nährmediums in Hinblick auf das Wachstum von Mikroorganismen von Bedeutung. Jeder Organismus besitzt einen pH-Bereich, in welchem ein Wachstum möglich ist, sowie ein definiertes pH-Optimum. In natürlichen Habitaten liegen in der Regel pH-Werte von 5–9 vor, wobei sich die meisten dort siedelnden Organismen an diese Bedingungen adaptiert haben. Es sind nur wenige Arten beschrieben, die jenseits von pH-Werten von 2 (acidophile Stämme) bzw. 10 (alkaliphile Stämme) vorkommen, wie zum Beispiel *Picrophilus oshimae*, dessen pH-Optimum bei pH 0,7 liegt und bereits oberhalb von pH 4 der Zellyse unterliegt [80]. Während Pilze generell bei pH-Werten unterhalb von 7 ihr Optimum aufweisen, liegt das von den meisten Bakterien bevorzugte Milieu im neutralen Bereich [81].

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes für *Halomonas marina* wurde ein MB20-Medium mit einer Glucosekonzentration von 1 g/L verwendet, wobei der Initial-pH-Wert jeweils zuvor durch Addition von Salzsäure oder Natronlauge auf Werte zwischen 4 und 9 eingestellt wurde. Die Kultivierungen erfolgten schließlich bei 28 °C unter sonst gleichen Rahmenbedingungen wie bei der Temperaturoptimierung. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.6 dargestellt.

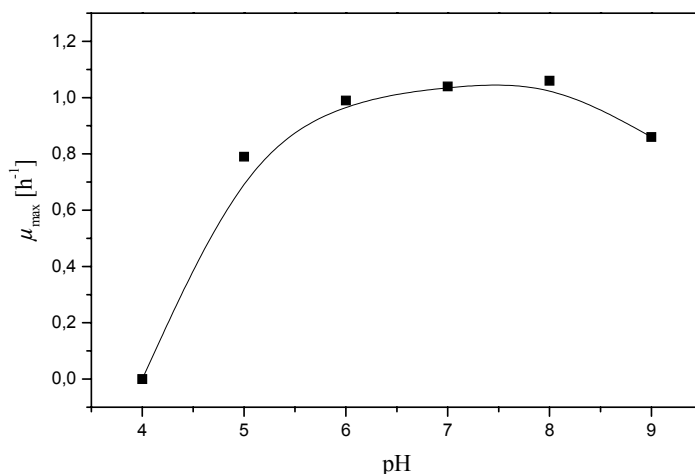


Abb. 3.6: Wachstumsraten von *Halomonas marina* bei verschiedenen pH-Werten

Die in Abb. 3.6 dargestellte Abhängigkeit der Wachstumsrate von *H. marina* vom pH-Wert des Fermentationsmediums beschreibt ein neutrophiles Verhalten des marinen

Stammes. Es zeigt sich ein optimaler Bereich von pH 6–8, in dem nur geringfügige Differenzen in der Wachstumsrate zu erkennen sind. Unterhalb von pH 5 nimmt μ_{\max} deutlich ab, so dass bei pH 4 kein Wachstum mehr nachzuweisen ist.

Für die nachfolgenden Versuche wurde aufgrund des hier ermittelten Wachstumsverhaltens innerhalb des optimalen pH-Intervalls gearbeitet. Da das eingesetzte Medium MB20 nach dem Autoklavieren einen pH von 7,0 besitzt, wurde es, wenn nicht anders angegeben, in weiteren Versuchen direkt ohne weitere Vorbereitung verwendet.

3.3.2.3 Einfluss verschiedener Ausgangskonzentrationen des Marine Broth Mediums auf das Wachstum von *Halomonas marina*

Das Medium Marine Broth MB 2216 hat in den vergangenen 60 Jahren seit der erstmaligen Komposition durch ZoBell [46] eine starke Verbreitung gefunden und gilt heute als Standardmedium in der Fermentation mariner Mikroorganismen. Da es jedoch bei manchen Bakterien durch die in Relation zum Meerwasser hohe Konzentration an C-Quellen (Pepton, Hefeextrakt) im Vollmedium MB 2216 zu einer Verringerung der Wachstumsraten bzw. einer kompletten Hemmung des Wachstums kommen kann [82], wurde das Wachstumsverhalten von *Halomonas marina* bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen an MB 2216 (20–100 %) untersucht. Die durch Verdünnung vorhandene geringere Salzkonzentration wurde durch Zusatz von Kochsalz auf die ursprüngliche Konzentration angeglichen, welche in Vorexperimenten als optimale Salzkonzentration von 19,45 g/L aufgefunden wurde [76]. Die erhaltenen Wachstumskurven sind in Abb. 3.7 dargestellt.

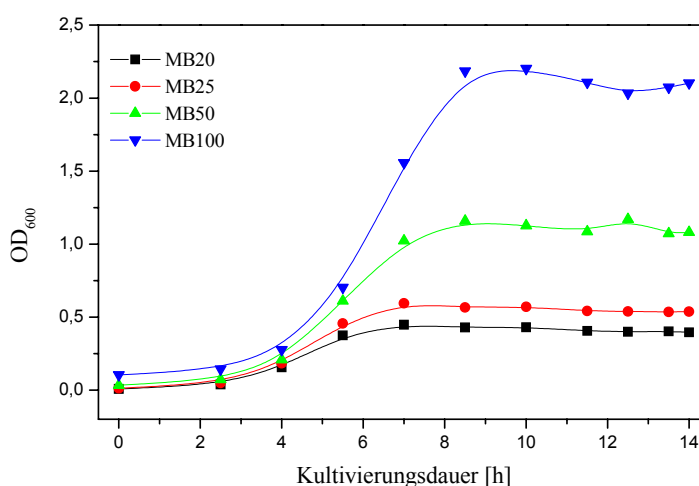


Abb. 3.7: Wachstum von *Halomonas marina* auf unterschiedlich konzentrierten Marine Broth Kultivierungsmedien ohne Glucosezusatz

Dabei zeigte sich, dass die maximale erreichbare Zelldichte in der Fermentation proportional zur Konzentration des Mediums ist. So entspricht die maximale

Biomassekonzentration unter Verwendung des MB20 Mediums exakt einem Fünftel der Konzentration unter Einsatz des Vollmediums (MB100).

Anhand von Vorversuchen war bereits bekannt, dass ein geringer Zusatz von Glucose zum Fermentationsmedium einen günstigen Einfluss auf das Zellwachstum hat [76]. Deshalb sollte ferner untersucht werden, wie sich das Wachstum von *Halomonas marina* auf den bereits getesteten Medien unter Zusatz von 1 g/L Glucose verhält. Hierzu wurde wie im vorherigen Versuch beschrieben verfahren, nur dass in den Medien nach dem Autoklavieren unter Verwendung einer konzentrierten Glucose-Stammlösung die entsprechende Konzentration eingestellt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 3.8 dargestellt.

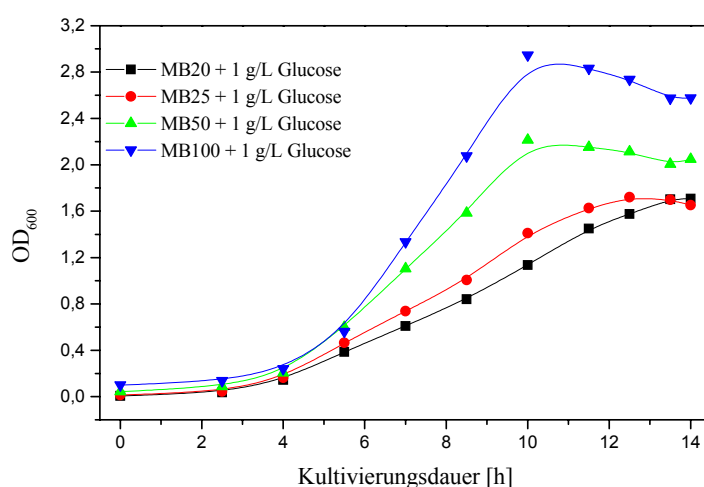


Abb. 3.8: Wachstum von *Halomonas marina* auf unterschiedlich konzentrierten Marine Broth Kultivierungsmedien mit Glucosezusatz

Ein Vergleich der erhaltenen Kurven mit denen, welche bei der Anzucht auf dem reinen Medium erhalten wurden, zeigt, dass ein Zusatz geringer Mengen Glucose bei jeder eingesetzten Konzentration des MB-Mediums eine Zunahme der Biomasse bewirkt. In der Annahme, dass der jeweilige Glucosezusatz zu jedem Medium einen äquivalenten Zuwachs an Biomasse induziert, sollten die in Abb. 3.8 dargestellten Wachstumskurven um jeweils identische Einheiten der OD₆₀₀ zunehmen. Während die maximale Ausbeute an Biomasse beim Vollmedium nur um den Faktor 1,34 gesteigert wird ($\Delta OD_{600} = 0,75$), bewirkt der Glucosezusatz zum MB20 Medium jedoch eine 3,8-fache Zunahme der Ausbeute ($\Delta OD_{600} = 1,25$). Diese Unterschiede sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass auf dem vollkonzentrierten Medium bereits alle Nährstoffe in (fast) ausreichender Konzentration zur Verfügung stehen und die im Medium vorhandenen Zellen somit nur einer geringen Wachstumslimitierung unterliegen. Auf dem geringer konzentrierten Medium ist die Konzentration an C-Quellen hingegen sehr gering, wodurch mittels Glucosezusatz diese Limitierung vermindert wird. Vor dem Hintergrund der Kosten des kommerziellen Marine Broth Mediums, wurde daher im

weiteren Verlauf der Arbeiten, falls nicht anders angegeben, mit dem verdünnten Medium mit Glucosezusatz weitergearbeitet.

Eine komplette Umstellung auf ein reines Glucose-Medium unter Aufrechterhaltung des nötigen Salzgehaltes zeigte in Vorversuchen, dass weder Zellwachstum noch Metabolismus vorhanden waren.

3.3.3 QS-Untersuchungen an *Halomonas marina*

Für die Untersuchung des Effektes von acylierten Homoserinlactonen auf das Wachstum sowie auf die Produktion von Sekundärmetaboliten wurde *Halomonas marina* auf dem Basismedium Marine Broth in 20%iger Verdünnung mit einem Zusatz der Stammlösung an HSLs kultiviert (MB20+HSL). Um für die später folgende Extraktion der Medienüberstände bzw. der Zellmasse ausreichende Mengen zur Verfügung zu haben, wurde die Fermentation der Hauptkulturen im 1,5 L-Maßstab in 5 L Erlenmeyerkolben mit je zwei Schikanen durchgeführt. Beimpft wurden die Hauptkulturen mit jeweils $2,25 \cdot 10^6$ Zellen einer Vorkultur von 100 mL MB20 in 500 mL Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen, welche über Nacht bei 28 °C und 120 rpm inkubiert wurden. Basierend auf Literaturangaben [74] erfolgte eine Addition von 1,6 mL der in Tab. 6.12 angegebenen Stammlösung der Lactone zur Hauptkultur (MB20+HSL). Als Kontrollen diente MB20 selbst sowie MB20+EE, das in äquivalenter Konzentration Essigsäureethylester enthielt wie MB20+HSL. Die erhaltenen Optischen Dichten bei $\lambda = 600$ nm nach 24-stündiger Inkubation bei 120 rpm und 28 °C sind in Abb. 3.9 dargestellt.

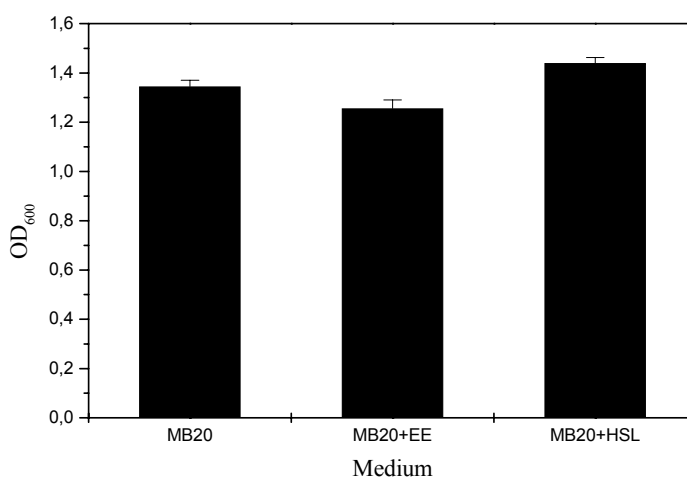


Abb. 3.9: Vergleich der Optischen Dichten von *Halomonas marina* nach 24 h Kultivierungszeit im MB20-Medium mit verschiedenen Mediumszusätzen bei 28 °C und 120 rpm; MB20+HSL (Zusatz von 1,6 mL der HSL-Stammlösung), Blindproben: MB20 sowie MB20+EE (Zusatz von 1,6 mL EE)

Wie Abb. 3.9 veranschaulicht, üben die eingesetzten Homoserinlactone einen stimulierenden Effekt auf das Wachstum des Bakteriums aus. Dabei resultierte eine im

Vergleich zum ersten Kontrollmedium (MB20) um 7 % erhöhte Biomassekonzentration, während das zweite Kontrollmedium (MB20+EE) eine inhibierende Wirkung auf das Zellwachstum aufwies. Unter Berücksichtigung dieses hemmenden Effektes des Lösemittels findet durch den Zusatz der acylierten Homoserinlactone eine deutliche Stimulierung des Wachstums statt und es ist eine Zunahme der Biomassekonzentration um 15 % festzustellen.

Auffallend ist die im Vergleich zu den vorigen Versuchen erhaltene erhöhte Biomasseausbeute beim MB20-Medium. Hierfür verantwortlich ist zunächst die verlängerte Kultivierungszeit von 14 auf 24 h, wodurch weitere Adaptionen des Stammes an das Medium möglich sind und diauxische Effekte auftreten, sowie durch geringfügig veränderte Bedingungen während des Autoklavierverfahrens, womit dem Mikroorganismus ein variiertes C-Quellenspektrum zur Verfügung steht.

Zur weiteren Untersuchung der Fermentationsbrühen und der Biomasse hinsichtlich produzierter biologisch aktiver Wirkstoffe wurde nach Beendigung der Kultivierungen die Biomasse durch Zentrifugation bei 3.345 g und 4 °C für 30 min vom Kulturüberstand separiert. Der Kulturüberstand wurde anschließend mit Essigester erschöpfend extrahiert. Die Biomasse-Pellets wurden zur Extraktion polarer Metabolite in 45 ml Methanol suspendiert und mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Labsonic U, Fa. B. Braun, Melsungen) für 6 min und 60 W bei einer Pulsdauer von $0,3 \text{ s}^{-1}$ aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren (3.345 g, 4 °C, 30 min) wurden die Sedimente jeweils zweimal mit weiteren 45 mL Methanol ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die in Methanol unlöslichen Pellet-Sedimente wurden nachfolgend zur Isolierung unpolarer Metabolite dreifach mit je 45 mL Dichlormethan extrahiert. Die Rohextrakte der jeweiligen Extraktionsschritte wurden durch Abzug der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer erhalten. Angaben über die dabei resultierenden Extraktmassen finden sich in Tab. 3.3.

Tab. 3.3: Erhaltene Extraktmengen aus dem Fermentationsüberstand (EE-Extrakt) sowie der Zellmasse (DCM-, MeOH-Extrakt)

Medium	EE-Extrakt	DCM-Extrakt	MeOH-Extrakt
MB20	0,062 g	0,104 g	0,082 g
MB20+EE	0,050 g	0,132 g	0,113 g
MB20+HSL	0,065 g	0,148 g	0,141 g

Während der Zusatz acylierter Homoserinlactone bzw. von Essigester zum Fermentationsmedium einen geringen Einfluss auf das Zellwachstum hat, zeigten sich deutliche Unterschiede in den jeweils erhaltenen Extraktmengen und somit in der Produktion von Metaboliten. Der Kultivierungsüberstand wie auch die Zellen, die unter dem Zusatz der Signalmoleküle angezogen wurden, zeigen in absoluten Massen die höchsten Ausbeuten. Für eine Bewertung dieses Ergebnisses ist es jedoch sinnvoll, die erhaltenen Extraktmengen in Relation zur Biomasseausbeute darzustellen (vgl. Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Erhaltene Extraktmengen in Relation zur Biomasse; als Referenz wurden die Extraktmengen der Kultivierung mit MB20+HSL verwendet

Medium	EE-Extrakt [%]	DCM-Extrakt [%]	MeOH-Extrakt [%]
MB20	102	75	62
MB20+EE	88	102	92
MB20+HSL	100	100	100

Die in Tab. 3.4 angegebenen normierten Daten zeigen, dass der HSL-Mediumszusatz eine Steigerung der Ausbeute des MeOH-Extrakts sowie des EE-Extrakts im Vergleich zum Kontrollmedium ermöglicht. Allerdings ist dabei lediglich die Verbesserung der Ausbeute des methanolischen Extrakts von Relevanz, da hier eine erhöhte Ausbeute im Vergleich zum Kontrollmedium (MB20+EE) und zum Basismedium zu beobachten war.

Zur Untersuchung der erhaltenen Extrakte hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit wurden diese in jeweils 2 mL des zur Extraktion benutzten Lösungsmittels resolvatisiert und nach Sterilfiltration bei 4 °C gelagert.

Die Agardiffusions-Assays wurden wie im Anhang 6.4.1 beschrieben durchgeführt. Als Testkeime dienten je zwei marine (*Paracoccus seriniphilus*, Gram-negativ; *Streptomyces* sp., Gram-positiv) und terrestrische Stämme (*Escherichia coli*, Gram-negativ; *Bacillus subtilis*, Gram-positiv). Als Referenz diente die Hemmhofbildung gegen eine sterilfiltrierte Penicillin-Stammlösung (1 mg/mL in H₂O_{bidest.}). Da bereits aus Vorversuchen bekannt war, dass sich die biologisch aktiven Wirkstoffe hauptsächlich in den Essigesterfraktionen finden lassen, wurde eine weitere Untersuchung der Extrakte des Pellets nicht weiter verfolgt [75].

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.10 dargestellt. Auf die Präsentation der Daten zu den Hemmhoftests gegen den verwendeten *Bacillus* sp.-Testkeim wurde aufgrund der Unwirksamkeit der Extrakte sowie der Lösungsmittel verzichtet.

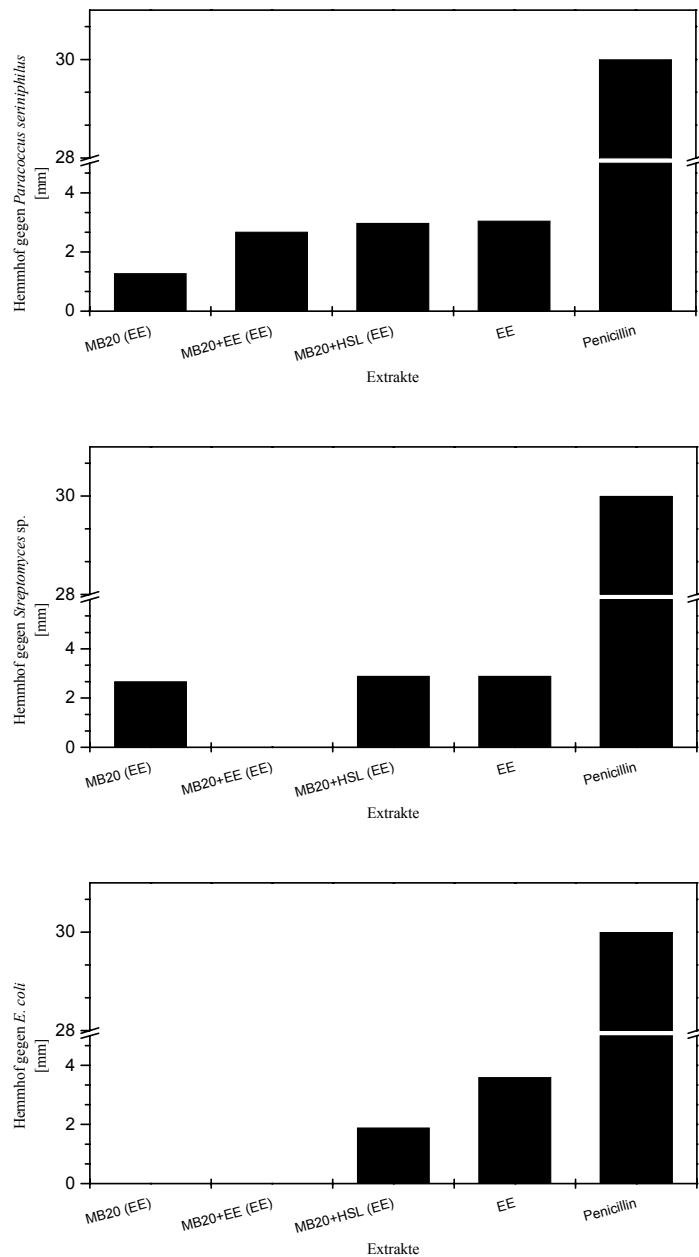


Abb. 3.10: Hemmhofbildung der Testkeime gegen die erhaltenen Essigester-Extrakte nach einer Inkubationszeit von drei Tagen bei 28 °C (vgl. Kap. 6.4.1)

Um Aussagen über die Wirksamkeit der eingesetzten Extrakte machen zu können, ist es obligat, die Auswirkungen des reinen Lösungsmittels (EE) in Relation zu diesen zu betrachten. Auffällig ist, dass der als Kontrolle eingesetzte Essigester bei jedem hier beschriebenen Testkeim einen Hemmhof verursachte, während die jeweils im äquivalenten Volumen Essigester gelösten hydrophilen Extrakte der Kulturüberstände in etwa gleiche bzw. geringere oder überhaupt keine Hemmhöfe induzierten. Dies lässt die Annahme zu, dass in den Extrakten vermutlich weitere auf die jeweiligen Testkeime stimulierend wirkenden Substanzen enthalten waren. Dieser Hypothese konnte jedoch

im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter nachgegangen werden. Die nach Zusatz der acylierten Homoserinlactone erzielte Optimierung in der Biomasseproduktion lässt sich anhand dieser Versuche nicht auf die Produktion biologisch aktiver Metabolite des betrachteten Mikroorganismus übertragen, obwohl der Zusatz nachweislich die Gesamtmenge an extrahierbaren polaren Substanzen erhöht.

3.4 Untersuchung eines QS-Stimulus auf *Flustra*-assoziierte marine Bakterienstämme

Vor dem Hintergrund der Erhöhung der Biomassekonzentration unter Zusatz acylierter Homoserinlactone bei der Kultivierung von *Halomonas marina* sollten mit *Flustra foliacea* assoziierte Bakterienstämme hinsichtlich eines solchen Stimulus untersucht werden. Dabei wurde sowohl der Einfluss der Lactone auf die maximal erreichbaren Wachstumsraten als auch auf die Wirkstoffproduktion der Bakterien untersucht. Ferner wurde die Wirkung eines HSL-Zusatzes auf die Gesamtzahl isolierbarer Mikroorganismen in einer Anreicherungskultur verfolgt.

Das hierfür verwendete Zellmaterial des Moostierchens stammte aus einer Probenahme nahe Helgoland (Steingrund) im Jahr 2000 (Prof. Dr. Liebezeit, Universität Oldenburg), welches bei -20 °C gelagert wurde.

3.4.1 Isolierung, Extraktion und Wirkstoffproduktion *Flustra*-assoziiierter Bakterienstämme

Die Isolierung geeigneter *Flustra*-assoziiierter Bakterienstämme, für die nachfolgende Untersuchung der Wirkstoffproduktion in Hemmhoftests, erfolgte durch Zugabe von *Flustra*-Biomasse zu den entsprechenden Kulturmedien. Um ein möglichst breites Spektrum an Bakteriengattungen isolieren zu können wurden vier verschiedene Medien verwendet, deren spezifische Zusammensetzung dem Anhang Kap. 6.1 zu entnehmen ist: Seawater Basal Medium (SwBasal), Synthetic Seawater Medium (SSM), 1/5-konzentriertes Marine Broth Medium (MB20) und Yeast Extract-Malt Extract Agar (YMA). Ein Ablaufschema der Isolierung ist in Abb. 3.11 dargestellt.

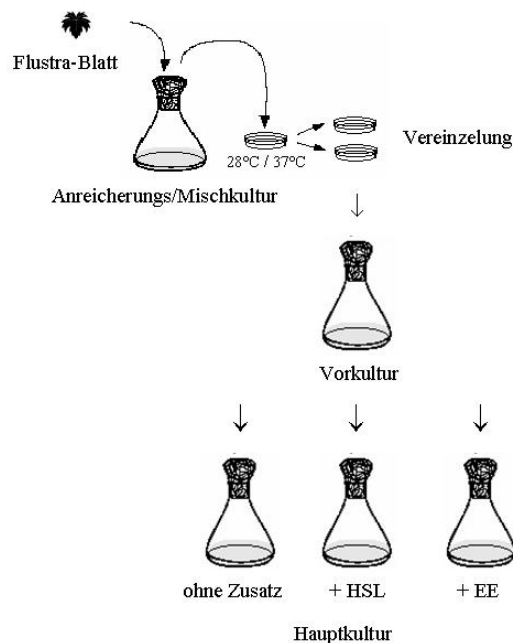


Abb. 3.11: Komplettes Ablaufschema für die Isolierung und Kultivierung *Flustra*-assoziiierter Bakterienstämme

Durch Zugabe von ca. 10 cm² großen *Flustra*-Blättern zu jeweils 150 mL des entsprechenden sterilen Nährmediums in 500 mL Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen erfolgte das Beimpfen der Anreicherungskulturen. Diese wurden bei 28 °C und 120 rpm im temperierbaren Schüttelschrank für drei Tage inkubiert. Anschließend wurden aus den Kolben, in denen durch Bestimmung der optischen Dichte ein Wachstum von Mikroorganismen feststellbar war, je 75 µL unter aseptischen Bedingungen entnommen und auf Festmedien gleicher Zusammensetzung überimpft. Um im Vorfeld Temperatureinflüsse auf das Wachstum der angereicherten Mikroorganismen festzustellen, wurden die beimpften Agar-Platten gleicher Mediumszusammensetzung bei 28 °C sowie bei 37 °C für zwei Tage inkubiert. Die hierbei erhaltenen Mischpopulationen wurden in einem weiteren Isolationsschritt mit Hilfe eines Verdünnungsausstrichs auf weiteren Festmedien gleicher Zusammensetzung überimpft und bei gleichen Bedingungen inkubiert, um Reinkulturen zu erhalten. Nach zwei Tagen wurde an jeder Platte eine mikroskopische Untersuchung auf Reinkulturen durchgeführt. Die so identifizierten Reinkulturen wurden anschließend zur Anreicherung nochmals auf den für deren Isolierung verwendeten Nährmedien und Bebrütungstemperaturen angezogen. Die Lagerung der isolierten Stämme erfolgte auf den eingesetzten Festmedien bei 4 °C.

Insgesamt konnten nach dem beschriebenen Isolationsschema fünf verschiedene Bakterienstämme auf MB20, ein Bakterienstamm auf SSM und eine weitere Reinkultur auf YMA isoliert werden, die im Folgenden als F01–F07 bezeichnet werden. Das SwBasal Medium wies dagegen kein Wachstum Bryozoen assoziierter Mikroorganismen auf.

Zudem konnte bei den unterschiedlichen Inkubationstemperaturen kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten der isolierten bakteriellen Mikroorganismen festgestellt werden. Aufgrund dieser Tatsache wurden im weiteren Verlauf der Arbeiten die erhaltenen Reinkulturen bei 28 °C hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens untersucht.

Zur groben Klassifizierung wurden die einzelnen Bakterienstämme auf ihr Gram-Verhalten überprüft, wobei der in Kap. 6.7 dargestellte KOH-Test angewendet wurde. Als Kontrollen dienten *Paracoccus seriniphilus* (LS1, Gram-negativ) sowie *Bacillus subtilis* (Gram-positiv). Die erhaltenen Ergebnisse der sieben Stämme sind in Tab. 3.5 dargestellt.

Tab. 3.5: Gram-Verhalten der isolierten Bakterien F01-F07

Stamm (Medium)	<i>B. subtilis</i>	LS1	F01 (MB20)	F02 (MB20)	F03 (MB20)	F04 (SSM)	F05 (YMA)	F06 (MB20)	F07 (MB20)
Gram-Verhalten	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Somit konnten drei Gram-positive und vier Gram-negative Bakterienstämme isoliert werden.

Die isolierten Bakterienstämme wurden in nachfolgenden Experimenten hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens in Gegenwart acylierter Homoserinlactone untersucht. Wie in Kap. 3.1 beschrieben, ist diese Art von Signalmolekülen der Kommunikation Gram-negativer Bakterien zuzuordnen. Um zu untersuchen, ob diese jedoch ebenso einen Effekt auf Gram-positive Keime zeigen, wurden sie mit in die HSL-Stimulus-Experimente eingebunden. Hierzu wurden drei Einzelversuche für jeden isolierten Stamm durchgeführt, indem 200 mL Medium in 500 mL-Erlenmeyerkolben mit $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL einer Übernachtskultur beimpft wurden und je ein Kolben mit 224 μ L der HSL-Stammlösung (vgl. Kap. 6.2.3) bzw. mit 224 μ L sterilem Essigsäureethylester versetzt wurde (vgl. Abb. 3.11), die Kultur ohne Zusatz diente jeweils als Referenz. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 28 °C und 120 rpm. Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens wurde die Optische Dichte jeder Kultur bei $\lambda = 600$ nm verfolgt. Anhand dieses Datensatzes ließ sich zudem die maximale Wachstumsrate der isolierten Mikroorganismen bestimmen. Das hierbei detektierte Wachstumsverhalten der Gram-negativen Bakterien ist in Abb. 3.12, das der Gram-positiven Mikroorganismen in Abb. 3.13 illustriert.

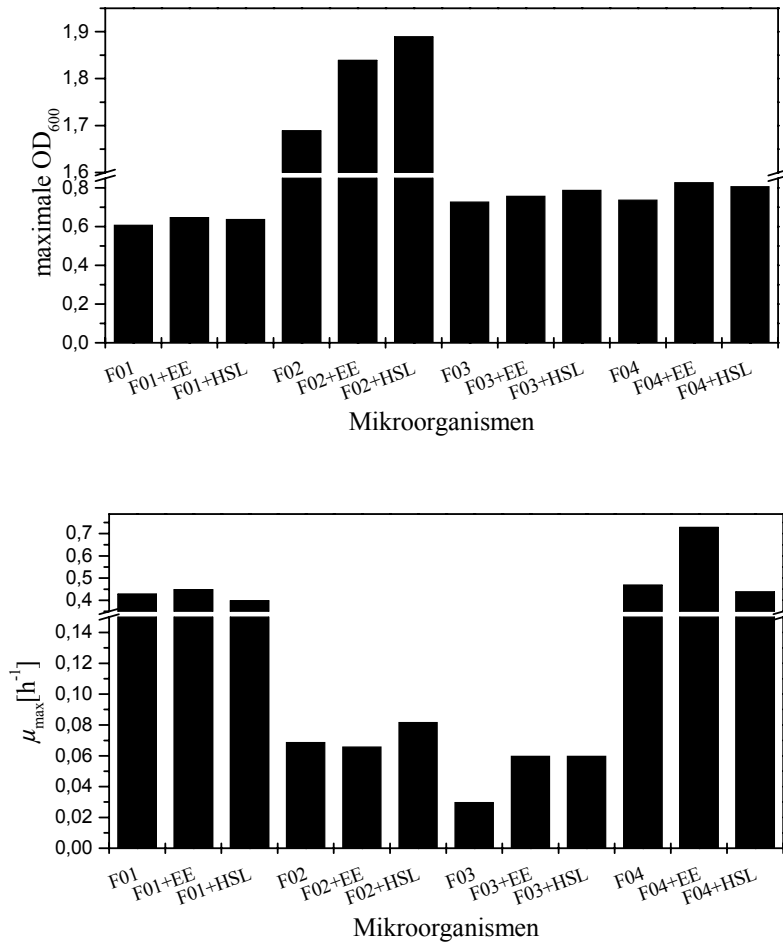


Abb. 3.12: Wachstumsverhalten der isolierten Gram-negativen Stämme F01-F04

Während der Zusatz acylierter Homoserinlactone auf den Stamm F01 keinen Einfluss zeigt, reagieren die Isolate F03 und F04 scheinbar positiv auf die Addition. Jedoch ist der Effekt analog zu dem des allein vom Zusatz an Essigsäureethylester hervorgerufenen. Ein signifikanter Einfluss ist hingegen beim Mikroorganismenisolat F02 nachweisbar. Dort ist eine erhöhte Biomasseproduktion um etwa 9 % im Vergleich zum Medium ohne Homoserinlacton-Zusatz zu beobachten. Die Wachstumsrate zeigt eine Steigerung durch die Supplementierung um ca. 19 %. Interessant ist, dass das Lösungsmittel selbst keinen Einfluss auf μ_{\max} hat.

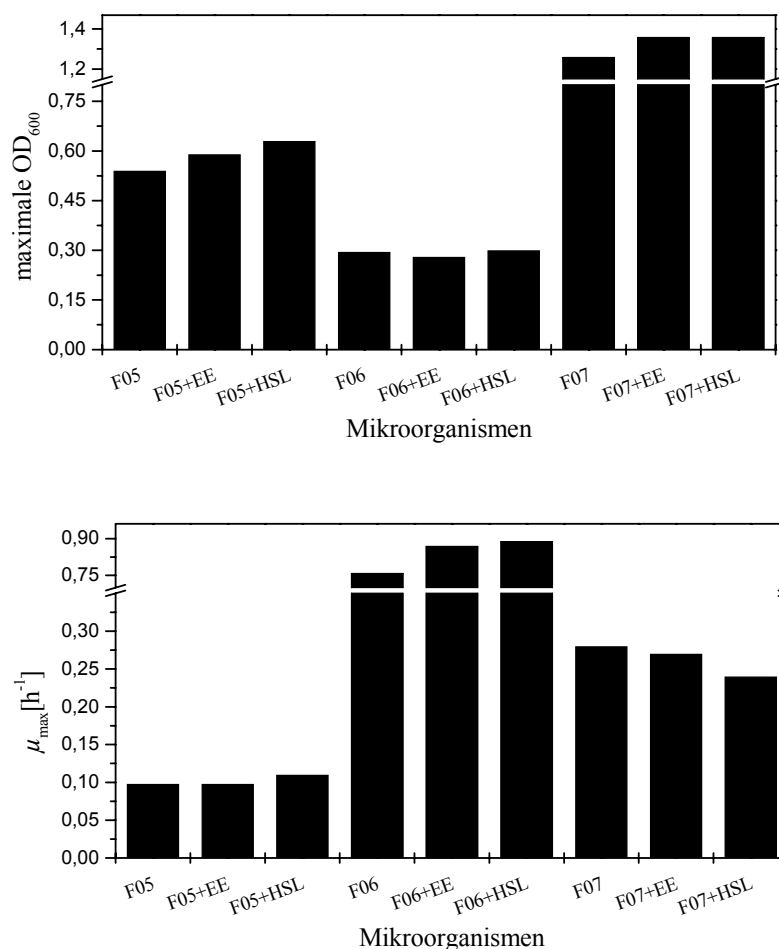


Abb. 3.13: Wachstumsverhalten der isolierten Gram-positiven Stämme F05-F07

Das in Abb. 3.13 dargestellte Wachstumsverhalten der drei Gram-positiven Stämme F05–F07 weist im Gegensatz zu den Variationen des Verhaltens der Gram-negativen Organismen keinen einzigen Stamm auf, der signifikant auf einen Stimulus der Homoserinlactone reagiert. Die geringen Abweichungen der ermittelten Optischen Dichte bzw. der Wachstumsraten lassen sich lediglich auf den Zusatz an Essigsäureethylester zurückführen, der ebenso wie bei den Gram-negativen Stämmen nach Hydrolyse von den Mikroorganismen metabolisiert werden kann. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde von einer weiteren Betrachtung der Gram-positiven Stämme hinsichtlich einer möglichen Induktion der Produktion antibiotisch wirkender Substanzen abgesehen.

Somit wurden für das Wirkstoffscreening die vier Gram-negativen Bakterienstämme F01–F04 hinsichtlich der Induktion antimikrobiell wirksamer Metabolite eingehender untersucht.

Für die Extraktion der *Flustra*-assoziierten Gram-negativen Bakterien wurden diese in den entsprechenden Nährmedien bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumspha-

se angezogen und von diesem durch Zentrifugation (30 min bei 4 °C und 3.345 g) abgetrennt. Die Sedimente wurden mit 100 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 2:1 versetzt. Nach 24-stündigem Rühren wurden die Pellets filtriert und das Filtrat einrotiert. Der Überstand wurde mit 400 mL Essigester extrahiert. Dazu wurde er 24 h in Essigester gerührt und ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Die hierbei erhaltenen Mengen an Extrakt sind in Abb. 3.14 präsentiert.

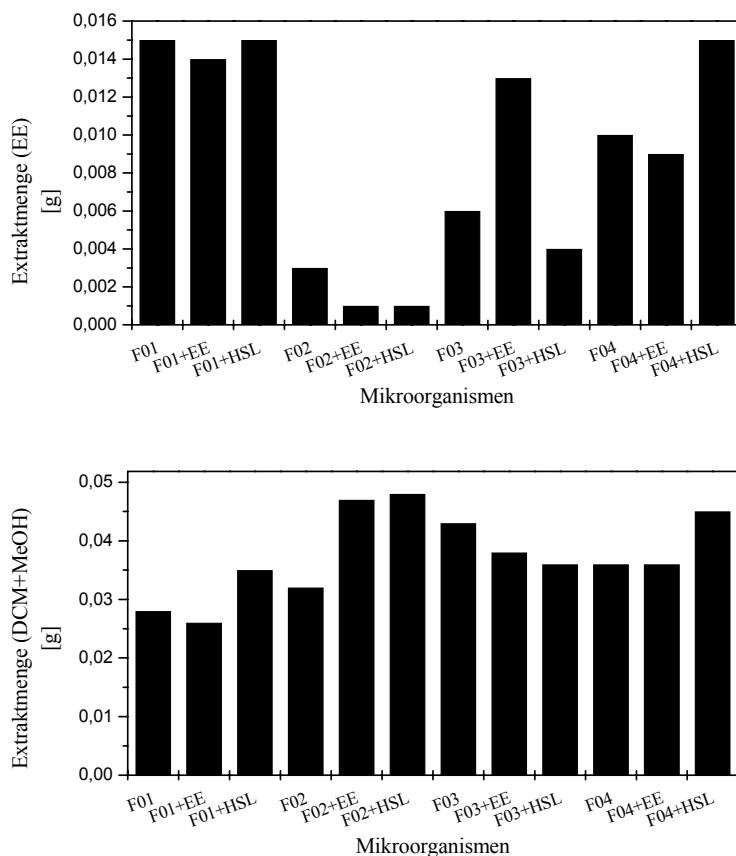


Abb. 3.14: Extraktmengen aus dem Überstand (EE-Extraktion) sowie des Pellets (DCM/Methanol-Extraktion)

Wie Abb. 3.14 eindrücklich illustriert, stehen die maximal erreichten Biomasseausbeuten (vgl. Abb. 3.12) in keiner Korrelation zu den erhaltenen Extraktmengen. So liefert der Stamm mit der höchsten Biomassekonzentration (F02) zwar bei der mit Dichlormethan und Methanol durchgeführten Extraktion des Pellets die größte Ausbeute, der mit Ethylacetat gewonnene Auszug des Kulturüberstands weist dagegen die geringste Ausbeute auf. Über eine erzielbare Extraktmenge lassen sich deshalb keine konkreten Aussagen treffen, da die insgesamt erhaltenen Mengen aller eingesetzten Mikroorganismen stark zwischen dem Essigester-Extrakt und dem DCM/Methanol-Extrakt differieren.

Ein signifikanter, positiver Effekt der zum jeweiligen Kultivierungsmedium supplementierten Homoserinlacton-Stammlösung konnte im EE-Extrakt, wie Abb. 3.14 zeigt, lediglich beim Stamm F04 nachgewiesen werden, wobei eine Steigerung der Extraktmenge um ca. 50 % erzielt wurde. Zudem zeigte auch der DCM-Methanol-Auszug dieses Stammes eine um ca. 29 % erhöhte Steigerung der Extraktmenge auf. Neben diesem Stamm konnte lediglich beim marinen Mikroorganismus F01 für den DCM/Methanol-Extrakt eine bedeutende Erhöhung der Ausbeute nachgewiesen werden.

Alle erhaltenen Extrakte wurden für die nachfolgenden Untersuchungen gewogen, als 1%ige Lösung (w/v) im jeweiligen Lösemittel vorgelegt und sterilfiltriert im Kühlschrank aufbewahrt. Die Durchführung der Hemmhoftests erfolgte analog zu der in Kap. 6.4.1 beschriebenen Methodik. Als Testkeime dienten, wie schon bei der Untersuchung der biologischen Wirksamkeit der Extrakte von *Halomonas marina*, zwei marine und zwei terrestrische Bakterienstämme, die Gram-positives bzw. Gram-negatives Verhalten aufweisen. Als Referenz diente wiederum die Hemmhoftbildung der Testkeime gegen eine Penicillin-Stammlösung. Die erhaltenen Resultate dieser Bioassays sind in Abb. 3.15 für die Essigester-Extrakte und in Abb. 3.16 für die DCM/Methanol-Extrakte dargestellt. Auf eine explizite Darstellung der Ergebnisse der DCM/Methanol-Extrakte gegen *E. coli* und den marinen Testkeimen *Paracoccus seriniphilus* sowie dem Streptomyceten B8300 wurde verzichtet, da hierbei keinerlei Effekt auf eine Inhibierung des Wachstums nachgewiesen werden konnte.

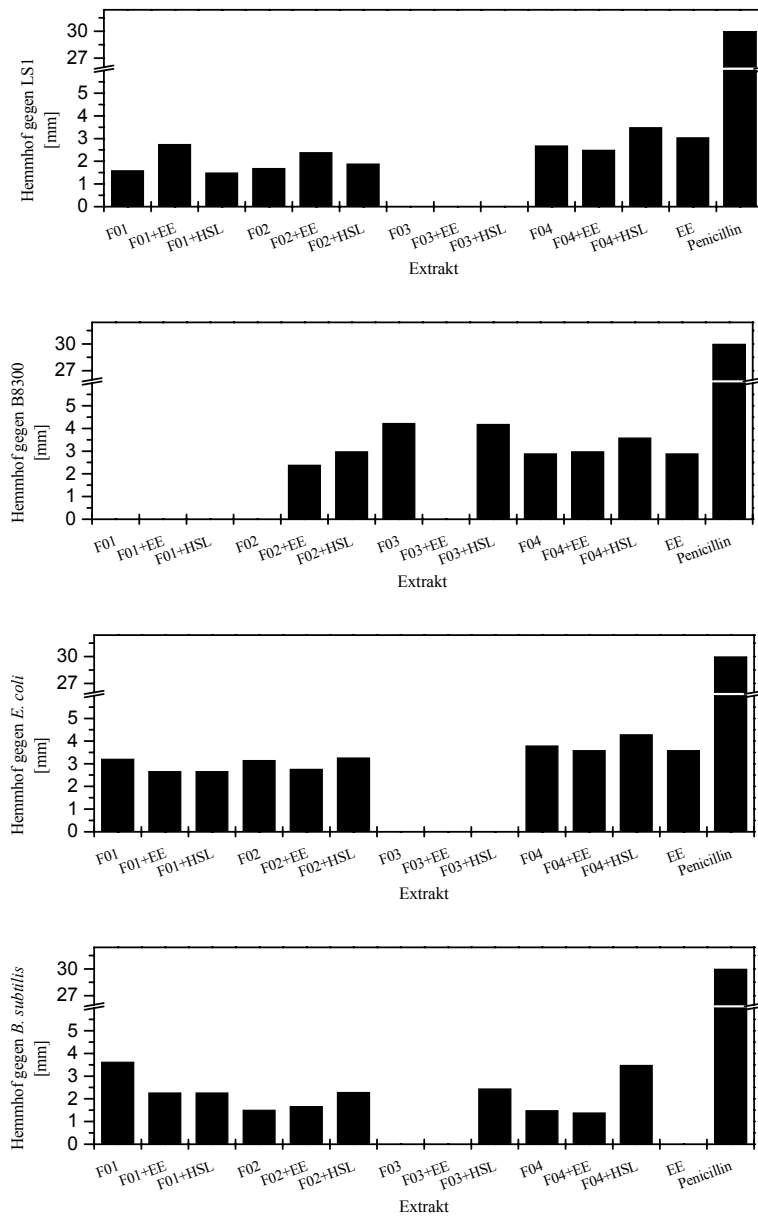


Abb. 3.15: Hemmhofbildung der Testkeime gegen die EE-Extrakte der isolierten Bakterien F01–F04

Der Mikroorganismus F04 erwies sich, wie Abb. 3.15 zeigt, als potentester Kandidat, der positiv auf einen HSL-Stimulus reagiert. Dieser Stamm weist gegen jeden Testkeim unter Supplementierung der Homoserinlactone einen signifikant erhöhten Hemmhofdurchmesser auf, der über dem des allein vom Essigester hervorgerufenen liegt. Allerdings fällt dieser im Vergleich zum vom Penicillin hervorgerufenen um ein Vielfaches geringer aus. Die anderen Extrakte zeigen dagegen nur gegen den Gram-positiven terrestrischen Testkeim *Bacillus subtilis* einen nennenswerten Effekt. Neben der hierbei erkennbaren Steigerung des Hemmhofdurchmessers beim Extrakt von F02+HSL wurde

beim Stamm F03 nur unter Verwendung des Extrakts der HSL-Kultivierung eine Inhibierung des Testkeims nachgewiesen. Dies zeigt, dass insbesondere der Stamm F03 nur dann in der Lage ist, biologisch aktive Sekundärmetabolite zu produzieren, wenn Additive wie die hier angewandten Homoserinlactone dem Kultivierungsmedium hinzugefügt wurden.

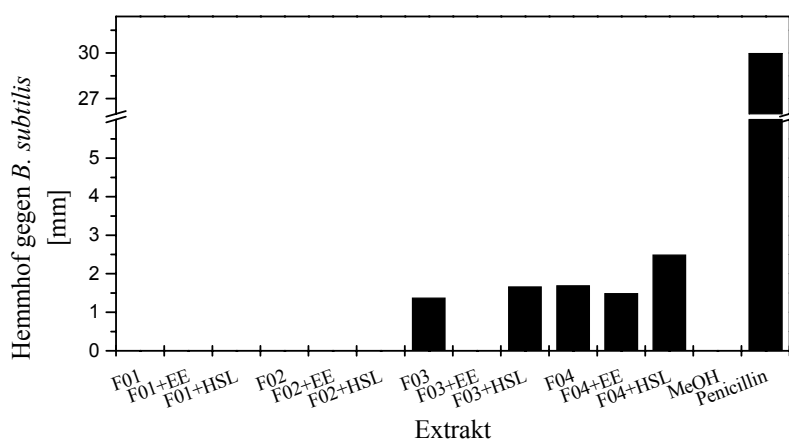


Abb. 3.16: Hemmhofbildung von *B. subtilis* gegen die Extrakte der Zellpellets der Gram-negativen Mikroorganismen; gegen die Testkeime *E. coli*, *Paracoccus seriniphilus* und *Streptomyces* sp. (B8300) konnte kein Effekt nachgewiesen werden

Die Wirkung der Extrakte, welche aus den Pellets der isolierten Bakterien gewonnen wurden, fällt im Vergleich zu den Extrakten des Überstandes deutlich geringer aus (vgl. Abb. 3.16). Gegen die Testkeime *Paracoccus seriniphilus*, *E. coli* und B8300 konnte kein Hemmhof detektiert werden, der eine signifikante Größe aufwies. Eine Inhibierung des Wachstums von *B. subtilis* konnte durch Zusatz der Extrakte von F03 und F04 gezeigt werden, während die methanolischen Extrakte der Bakterien F01 und F02 keine Hemmzone induzieren konnten. Auch in diesem Versuch besitzt wiederum der Extrakt von F04 die größte biologische Wirksamkeit. Ein Zusatz von Homoserinlactonen zum Kultivierungsmedium scheint auch hier die Produktion antimikrobiell wirksamer Metabolite zu induzieren und die Aktivität um ca. 40 % zu steigern.

3.4.2 Einfluss eines QS-Stimulus auf die Gesamtzahl isolierbarer Mikroorganismen von *Flustra foliacea*

Der Fokus bei der Isolierung von Mischpopulationen oder auch Reinkulturen mariner Mikroorganismen liegt vor allem auf der Wachstumsoptimierung der Stämme, da hinsichtlich der Wirkstoffproduktion oftmals nur geringe Metabolitkonzentrationen in den Zellen vorliegen und somit eine enorme Menge an Biomasse für nachfolgende Bioaktivitätstests zu extrahieren ist. Dabei ist jedoch häufig zu beobachten, dass nur ein geringer Anteil der in einer Umweltprobe vorkommenden Mikroorganismen überhaupt

fähig ist, sich in Schüttelkolben oder Bioreaktoren zu reproduzieren. Ein interessanter Ansatz zur Optimierung der Biomassekonzentration sowie zur Steigerung des Gesamtanteils der kultivierbaren Mikroorganismen besteht darin, dem für die Anreicherung eingesetzten Fermentationsmedium verschiedene Homoserinlactone zu supplementieren, was bereits bei der Anreicherung von Mikroorganismen aus Süßwasser-Habitaten einen nachweisbaren positiven Effekt zeigte [74].

Um zu testen, welchen Einfluss ein Zusatz verschiedener Homoserinlactone zu einem Fermentationsmedium auf die resultierende Gesamtkeimzahl einer Mischkultur hat, wurden fünf Ansätze mit je zuvor für 20 min bei 121 °C autoklaviertem MB20 (100 mL in 500 mL-Erlenmeyerkolben) vorbereitet:

- ohne Zusatz
- +60 µL HSL
- +60 µL EE
- +240 µL HSL
- +240 µL EE

und je ein Blatt von *Flustra foliacea* zugegeben (vgl. Abb. 3.17). Die HSL-Stammlösung, welche entsprechend Kap. 6.2.3 zusammengesetzt war, wurde sterilfiltriert zum Medium in der entsprechenden Menge addiert.

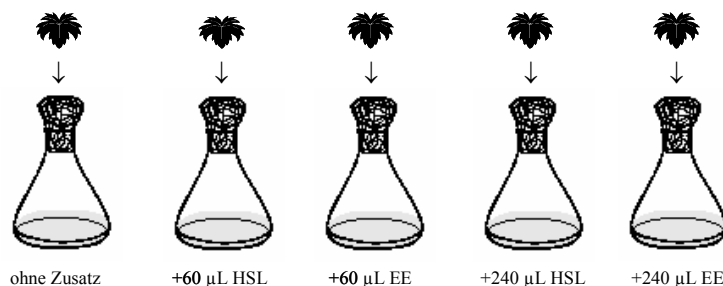


Abb. 3.17: Ablaufschema für die Untersuchung des Einflusses eines HSL-Mediumszusatzes auf die Gesamtkeimzahl einer Mischkultur in einem Anreicherungsmedium

Die Inkubation erfolgte jeweils bei 28 °C und 120 rpm im Schüttelinkubator (Certomat[®] S, Fa. B. Braun Biotech). Die Analytik der Gesamtkeimzahl erfolgte nach 24 h bzw. 48 h durch Auszählen mit Hilfe einer Thoma-Kammer (vgl. 6.6.2), da eine photometrische Analyse aufgrund der unterschiedlichen Morphologien der sich replizierenden Bakterienarten nicht in Betracht gezogen werden konnte. Die hierbei ermittelten Daten sind in Abb. 3.18 dargestellt.

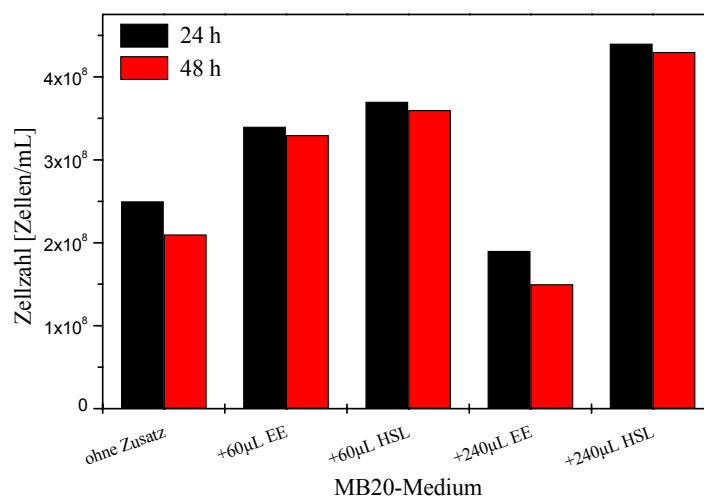


Abb. 3.18: Effekt eines HSL-Mediumzusatzes auf die Gesamtzellzahl *Flustra foliacea*-assoziierter Bakterien nach einer Kultivierungszeit von 24 h bzw. 48 h im MB20-Medium

Abb. 3.18 veranschaulicht deutlich, dass ein Zusatz von Homoserinlactonen einen günstigen Effekt auf die Gesamtzahl an Keimen im Kultivierungsmedium hat. Während die Zellzahl der Kontrollprobe nach 24 h etwa $2,5 \cdot 10^8$ Zellen/mL beträgt, weisen die Proben mit HSL-Zusatz eine deutlich erhöhte Zellzahl von etwa $3,7 \cdot 10^8$ Zellen/mL bzw. $4,4 \cdot 10^8$ Zellen/mL auf. Dabei zeigt jedoch nur die Probe mit einem Zusatz von 240 µL der HSL-Stammlösung eine signifikante Steigerung, da ein äquivalenter Zusatz an reinem Lösemittel eine deutlich verminderte Zellzahl etabliert. Im Vergleich zur Kontrolle konnte dabei eine Steigerung der Gesamtzellzahl um mehr als 75 % erzielt werden. Da ein Zusatz von 60 µL der HSL-Stammlösung im gleichen Maße die Zellzahl erhöht wie ein Zusatz von 60 µL an reinem Essigester, ist darauf zu schließen, dass in diesem Konzentrationsbereich vermutlich eine Verstoffwechslung des Lösemittels selbst auftritt, was bei höheren Konzentrationen nicht mehr der Fall ist. Dies indiziert die Reduktion der Gesamtzellzahl, wenn die Vergleichsprobe einen Zusatz von 240 µL an Lösemittel enthielt. Erwähnenswert ist neben der erzielten höheren Gesamtzellzahl zudem die im nachfolgenden Zeitintervall von 24 h deutlich geringere Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollprobe ohne jeglichen Zusatz. Dieses Phänomen deutet auf eine Verringerung der Zellyse hin, was hinsichtlich des Einsatzes mariner Mikroorganismen in technischen Prozessen ein interessanter Aspekt ist.

3.5 Synopsis

Das Wachstum eines im Polyketidscreening positiv aufgefallenen Bakteriums (*Halomonas marina*) konnte hinsichtlich der Temperatur und dem pH-Wert des Fermentationsmediums optimiert werden. Als Optimum für die Wachstumsrate wurde eine Temperatur von 32 °C, die maximale Produktion an Biomasse jedoch bei 28 °C nachgewiesen. Insgesamt konnte ein optimaler Wachstumsbereich bestimmt werden, der im Bereich der aufgefundenen Werte lag. Hinsichtlich des pH-Wertes konnte für das Wachstum ein günstiger Bereich aufgefunden werden, der zwischen pH 6–8 liegt. Interessant ist hierbei, dass sich die optimale Wachstumstemperatur stark vom Fundort unterscheidet, von dem die Probe zur Isolierung des Mikroorganismus entnommen wurde. Am Süddamm vor Helgoland werden in einer Wassertiefe von 6–8 m kaum Temperaturen erreicht, die im angegebenen optimalen Wachstumsbereich liegen, man würde daher eher einen durch Adaption resultierenden Bereich von $T \approx 10\text{--}18\text{ °C}$ erwarten. Dieses Phänomen ist jedoch häufig bei marinen Stämmen zu beobachten.

Versuche zum Wachstumsverhalten von *Halomonas marina* in verschiedenen konzentrierten Marine Broth Medien zeigten, dass die maximal resultierende Zelldichte direkt proportional zur eingesetzten Konzentration des Mediums ist. Mit Hilfe eines Zusatzes von 1 g/L Glucose zu diesen Medien konnte die Ausbeute an Biomasse gesteigert werden. Dabei wurde bei den geringer konzentrierten Nährmedien eine stärkere Zunahme der Biomassekonzentration als beim Vollmedium beobachtet.

Bei der Untersuchung zum Einfluss von Homoserinlactonen auf das Wachstum des Gram-negativen Bakteriums *Halomonas marina* zeigte sich eine leichte Steigerung der Zellkonzentration um 7 %, wenn dem Fermentationsmedium die Autoinducer-Substanzen hinzugefügt wurden. Des Weiteren konnte mit Hilfe eines Zusatzes von Signalmolekülen zum Fermentationsmedium der Anteil extrahierbarer Substanzen aus der Biomasse signifikant gesteigert werden. Ein Indiz für eine mögliche Induzierbarkeit einer Wirkstoffproduktion konnte nicht nachgewiesen werden, da die detektierten Hemmhöfe der Bioassays alle kleiner waren als die allein vom Lösemittel hervorgerufenen, womit keine Signifikanz der Ergebnisse gegeben war.

Inwiefern acylierte Homoserinlactone ein verbessertes Wachstum sowie eine Induktion der Sekundärmetabolitproduktion mariner Bakterien ermöglichen, wurde an Mikroorganismen untersucht, die zuvor von dem Moostierchen *Flustra foliacea* isoliert worden waren. Bei der Isolierung konnten sieben verschiedene Bakterienstämme vereinzelt werden, wobei vier Gram-negativ und drei Gram-positiv waren. Von den Gram-negativen Stämmen zeigte ein Kandidat ein deutlich verbessertes Wachstumsverhalten in Gegenwart der Homoserinlactone. So konnte die Wachstumsrate im Vergleich zur Kontrolle durch den HSL-Stimulus um 12 % gesteigert werden. In der Gruppe der isolierten Gram-positiven Bakterien konnte kein relevanter Effekt hinsichtlich des Wachstums beobachtet werden. In Relation zu diesem Resultat und vor dem Hintergrund, dass Homoserinlactone in der Literatur üblicherweise Signalmoleküle Gram-negativer Bakterien darstellen, wurden für nachfolgende Bioassays ausschließlich Extrakte von Überstand und Zellpellet der isolierten vier Gram-negativen Mikro-

organismen eingesetzt. Eine relevante Steigerung der Extraktmengen, die deutlich über der Referenzproben lag, konnte auch hier nur bei einem Mikroorganismus (F04) nachgewiesen werden. Dabei konnte die Ausbeute des Essigesterextrakts um 50 % und die des DCM/Methanol-Extrakts um 29 % verbessert werden. Bei den durchgeführten Hemmhoftests mit den isolierten Gram-negativen Stämmen gegen zwei marine und zwei terrestrische Testkeime erwies sich dieser Stamm zudem als potentester Kandidat, der sensitiv auf den HSL-Zusatz im Kultivierungsmedium reagierte, da er der einzige Mikroorganismus war, dessen Essigester-Extrakt des Überstands einen relevanten Hemmhof gegen alle Testorganismen aufwies. Eine durch den HSL-Zusatz gesteigerte Produktion antimikrobiell wirksamer Metabolite konnte ferner für den Stamm F02 nachgewiesen werden. Der Essigester-Auszug des Kulturüberstands inhibierte eindeutig das Wachstum beider Gram-positiven Testorganismen *Streptomyces* sp. (B8300) und *B. subtilis*, während die Gram-negativen Organismen keine Änderung des Wachstumsverhaltens zeigten, wenn sie dem Extrakt ausgesetzt waren. Von Interesse ist das Verhalten von *B. subtilis* gegen die EE-Extrakte der Fermentationsbrühe von F03. Hierbei war ausschließlich beim Essigester-Extrakt des Kulturüberstands mit HSL-Zusatz ein Hemmhof zu beobachten. Zeigen alle anderen (wirksamen) Exktrakte lediglich eine Vergrößerung der Hemmzone, konnte hier eine direkte Induktion durch den HSL-Zusatz im Nährmedium nachgewiesen werden.

Die aus den Pellets gewonnenen Extrakte erwiesen sich dagegen als deutlich geringer biologisch aktiv als die des Überstands. Lediglich ein nach Kultivierung unter HSL-Zusatz gewonnener Extrakt der Pellets (F04) zeigte eine relevante Steigerung der Aktivität, wobei jedoch nur gegen *B. subtilis* eine Hemmzone detektiert wurde. Alle anderen Mikroorganismenextrakte zeigten keine biologische Aktivität. Eine abschließende Bewertung des Einflusses von Homoserinlactonen vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse ist nur schwer möglich. So sind zwar signifikante Effekte auf das Wachstum sowie auf die Produktion von Sekundärmetaboliten nachweisbar, allerdings war von den produzierten Hemmhöfen keiner größer als jener vom Penicillin induzierte. Inwiefern die Konzentration der biologisch aktiven Substanzen in den verwendeten Extrakten variierte und mit dem des Penicillins vergleichbar war, kann ebenso nicht abschließend bewertet werden, da die Extraktmengen selbst sehr gering waren und die antimikrobiell wirkenden Substanzen daher in äußerst geringen Konzentrationen vorkommen müssen. Zusammenfassend können die nachgewiesenen Hemmhöfe jedoch als Indikator für das Vorhandensein einer deutlichen biologischen Aktivität gewertet werden.

Des Weiteren wurde der Einfluss einer Supplementierung von Homoserinlactonen zu Nährmedien, die der Anreicherung *Flustra*-assoziiierter Mikroorganismen dienen, untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei einer Addition von 240 μL der HSL-Stammlösung zum Anreicherungsmedium eine deutliche Erhöhung der Anzahl an Mikroorganismen in der Kultur im Vergleich zur unbehandelten Probe resultiert. So konnte durch die Supplementierung eine Steigerung der Gesamtzellzahl in der Anreicherungskultur um mehr als 75 % erreicht werden. Die Endkonzentration der Signalmoleküle lag bei Zugabe von 240 μL der HSL-Stammlösung zum Medium bei 1,92 μM . Diese geringe

Konzentration indiziert die enorme Bedeutung und Signalwirkung, welche von diesen Substanzen ausgeht. Eine geringere Konzentration der Autoinducer-Moleküle von $0,48 \mu\text{M}$ im Medium zeigte dagegen keinen signifikanten Einfluss, was auf einen Schwellenwert zwischen diesen beiden eingesetzten Konzentrationen schließen lässt. Wurden $240 \mu\text{L}$ des reinen Lösemittels Essigester dem Medium hinzugefügt, resultierten im Vergleich zur Kontrolle deutlich verminderte Gesamtzellzahlen, was die Induktion eines verbesserten Wachstums durch die Signalmoleküle beweist.

4 Rechnergestützte Optimierung von Bioprocessen

Die Optimierung biologischer Prozesse bzw. Verfahren ist von enormer wirtschaftlicher Bedeutung. Bei industriellen Prozessen steht hauptsächlich die Minimierung der laufenden Fixkosten im Mittelpunkt, was man – abgesehen von den Personalkosten – durch ein effizienteres Downstream-Processing erzielen bzw. auch durch eine Maximierung der Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) im angewendeten Verfahren erreichen kann. In der im Labormaßstab durchgeführten Grundlagenforschung spielt dagegen hauptsächlich die Maximierung der in einer Reaktion erzielbaren Produktausbeute eine Rolle. Bei der Optimierung solcher Prozesse kommen hauptsächlich klassische unsystematische Verfahren wie die sukzessive Veränderung eines Parameters bei Konstanthaltung aller anderen Einflussgrößen zum Einsatz, man spricht auch von einer one-factor-at-a-time-Strategie. Diese Methode führt zwar in der Regel zu einem verbesserten Ergebnis, ignoriert werden jedoch mögliche Wechselwirkungen der zu optimierenden Parameter untereinander (vgl. Abb. 4.1), wie sie beispielsweise bei der Mediumoptimierung auftreten können, wenn mehrere komplexe Bestandteile als zu optimierende Komponenten eingesetzt werden. Trotz der genannten Problematik zählt diese Vorgehensweise zu der am weitest verbreiteten, vermutlich weil sie die einfachste Optimierungsmethode darstellt.

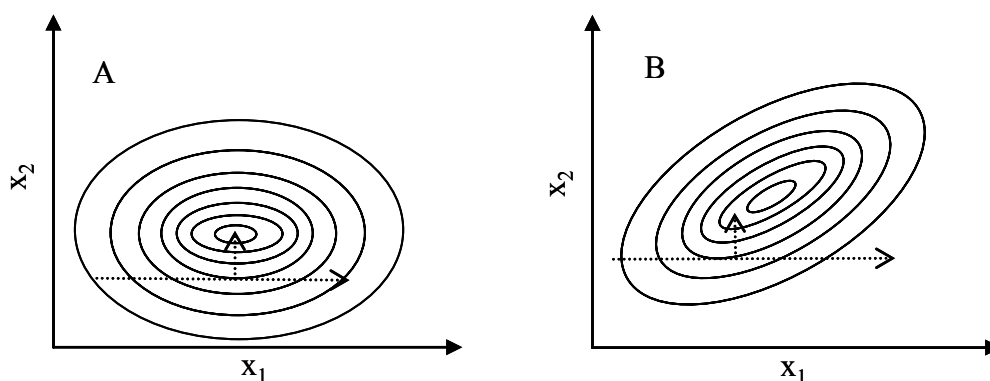


Abb. 4.1: Sukzessive Variation bei nicht-abhängigen Parametern (A) sowie korrelierenden Parametern (B); die one-factor-at-a-time-Strategie ist nur bei nichtkorrelierenden Parametern sinnvoll einsetzbar

Zur Überwindung solcher bei mehrparametrischen Optimierungsversuchen auftretenden Probleme wurde in den vergangenen Jahren eine Vielzahl an mathematischen Lösungsstrategien entwickelt. Diese sollen den Experimentator bei der Versuchsplanung unterstützen und die Anzahl der durchzuführenden Versuche auf ein Minimum beschränken, da üblicherweise mehrdimensionale Versuchsräume aufgespannt werden, die ein komplettes Abrastern der Einzelversuche unmöglich machen. Zu nennen seien an dieser Stelle beispielsweise die statistische Versuchsplanung, die ebenso weit verbreitete Response Surface Methodology (RSM) bzw. die in dieser Arbeit verwendeten Genetischen Algorithmen und der Simplex-Algorithmus. Den erwähnten Methoden

liegt zugrunde, dass sie entweder statistischer oder stochastischer Natur sind und leicht in bestehende Softwarepakete eingebunden werden können bzw. als ready-to-use Software kommerziell zu beziehen sind wie beispielsweise MultiSimplex[®] Lite (Simplex-Algorithmus, Fa. Grabitech Solutions AB, Timrå, Schweden), GALOP (Genetischer Algorithmus, Forschungszentrum Jülich GmbH), Design Expert[®] (RSM, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA). Von besonderer Bedeutung wird mittelfristig die Automatisierung von Optimierprozessen durch direkte Kopplung der Optimierprogramme mit der gesamten Prozessregelung sein, da inzwischen High-Troughput-Systeme entwickelt worden sind, bei denen Kultivierungen parallel in Mikrotiterplatten durchgeführt werden können, inklusive der online-Prozesskontrolle von Biomasse, pH, pO₂ und NADH [83].

Langjährig etablierte Systeme für eine online-Prozesskontrolle existieren bislang nur für Bioreaktoren. Im Vergleich zu den üblicherweise im Labormaßstab eingesetzten Schüttelkolben bieten Bioreaktoren den Vorteil, dass so genannte „blinde“ Bereiche im Fermentationsverlauf ausgeschlossen werden können. Zwar sind mittlerweile die ersten kommerziell erhältlichen Systeme zum Monitoring von Kultivierungen in Schüttelkolben erhältlich [84, 85], diese müssen sich jedoch noch im Alltagseinsatz bewähren. Ein großer Nachteil dieser Reaktorsysteme ist die nur unzureichend durchführbare Skalierung des Kolbens selbst und seiner Peripherie in den m³-Maßstab, welche aber i. d. R. für industrielle Prozesse notwendig ist. Die Stärke dieses Reaktorsystems besteht vor allem im einfachen Numbering-up.

Bei der Durchführung von Optimierungen muss man sich jedoch der Tatsache bewusst sein, dass das Auffinden des absoluten Optimums in der Regel unmöglich ist. Es gilt hier im Rahmen des Möglichen, dass immer nur eine Verbesserung der zuvor vorhandenen Ausgangsbedingungen erzielt werden kann, wie Goldberg es schon so treffend formuliert hat:

„It would be nice to be perfect: meanwhile, we can only strive to improve“¹

Zudem ist es von besonderem Interesse, wie die Zielfunktion, auch Gütefunktion oder Gütekriterium genannt, gewählt wird. Werden hier unzureichende Bedingungen an diese gestellt, so führt dies zwangsweise zu einem völligen Misserfolg der kompletten Versuchsplanung.

Wird bei einer Prozessoptimierung die simultane Verbesserung zweier schwer vereinbarer Zielfunktionen angestrebt, wie beispielsweise die Minimierung der Produktionskosten bei gleichzeitiger Maximierung der Produktausbeute, muss eine so genannte Pareto-Optimierung in den angewandten Algorithmus implementiert sein. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Optimierungen war solch eine Pareto-Optimierung jedoch nicht erforderlich, da bei den beschriebenen Verfahren die Gesamtzielfunktion immer als Summe von Teilfunktionen mit entsprechenden Gewichtungsfaktoren ausgedrückt und somit auf ein monokriterielles Problem reduziert

¹ D. E. Goldberg, Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning, Addison-Wesley, Reading, Massachusetts (1989)

werden konnte. Für weiterführende Informationen zur Pareto-Optimierung wird daher an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen [86].

4.1 Theoretischer Hintergrund der verwendeten mathematischen Lösungsverfahren

In den folgenden beiden Unterkapiteln werden die theoretischen Fundamente der in dieser Arbeit eingesetzten Algorithmen – Simplex-Algorithmus und Genetischer Algorithmus – dargestellt.

4.1.1 Simplex-Algorithmus

Der Simplex-Algorithmus (kurz: Simplex)² zählt zu den statistischen Verfahren, welche eine direkte „hill-climbing“-Strategie anwenden. Dieser wurde erstmals 1962 von Spendley et al. [87] in seiner ursprünglichen Form präsentiert und in den Folgejahren beispielsweise durch Nelder and Mead [88], Åberg and Gustavsson [89] und Betterbridge et al. [90] modifiziert.

Insgesamt eignet sich dieses Verfahren für nichtlineare Problemstellungen, bei denen die Antwortfläche unbekannt ist und die zu optimierenden Parameter voneinander abhängig sind. Der Simplex arbeitet mit einem Startdesign, das von der Anzahl der vorgegebenen Versuchparameter abhängt. Bei k zu optimierenden Faktoren, wird eine $k+1$ geometrische Figur im k -dimensionalen Raum aufgespannt, wobei diese geometrische Figur auch als Simplex bezeichnet wird. Für zwei anzupassende bzw. zu optimierende Parameter erhält man also einen zweidimensionalen Simplex (Dreieck), bei drei Parametern einen dreidimensionalen Simplex (Tetraeder), usw. Gearbeitet wird mit den Versuchspunkten, welche in den Ecken der aufgespannten geometrischen Figur liegen. Wurden die vorgegebenen Versuche des Startsimplex durchgeführt, erfolgt die weitere Optimumssuche sequentiell, wobei immer nur ein weiterer Versuch durchgeführt werden muss, bevor die Software nach entsprechender Bewertung der vorhandenen Parametersätze neue Vorgaben an den Experimentator macht.

Im einfachsten Fall wird für ein Optimierproblem ein Simplex mit konstanter Schrittweite eingesetzt. Hierzu müssen zunächst die Versuche des Startsimplex durchgeführt werden, wobei dieser die Punkte anhand der vorgegebenen Zielfunktion auf einer Antwortfläche bewertet. Dabei wird analog zur „hill-climbing“-Strategie das stärkste Gefälle zwischen den erhaltenen Punkten im Versuchsraum gesucht und analog

² In seiner ursprünglichen Form wurde der Simplex-Algorithmus 1947 von George Dantzig zur Optimierung linearer Probleme entwickelt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Algorithmus handelt es sich genauer gesagt um das sogenannte „Downhill-Simplex-Verfahren“, welches ein iteratives Verfahren zur nichtlinearen Optimierung darstellt.

Gl. (4.1) der Schwerpunkt p aller Versuchspunkte v mit Ausnahme des schlechtesten Versuchspunktes s bestimmt:

$$p = \frac{1}{k} \sum_{j \neq i}^k v_j \quad (4.1)$$

mit: j = Index des schlechtesten Versuchspunktes
 i = Index für den betrachteten Versuchspunkt
 k = Zahl der Versuchspunkte ohne den schlechtesten Versuchspunkt

Anschließend ist der schlechteste Punkt s am Schwerpunkt der geometrischen Figur zu spiegeln vgl. Gl. (4.2).

$$r = p + p - s \quad (4.2)$$

Durch diese Operation wird ein neuer Versuchspunkt r vorgegeben, der wiederum anhand seiner Antwort im Suchraum ein sequentielles Voranschreiten des Simplex in Richtung eines Optimums bewirken kann. Dieses Verfahren ist schließlich so lange zu wiederholen, bis die erhaltenen Ergebnisse ausreichend optimiert wurden. Das Konvergenzkriterium ist erreicht, wenn der Simplex um das erhaltene Optimum rotiert [91]. Das Verfahren wird in Abb. 4.2 noch einmal anschaulich beschrieben.

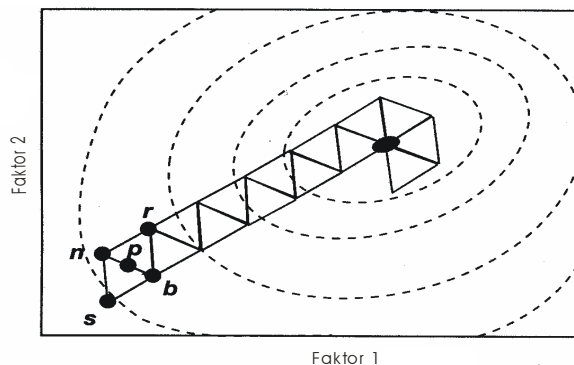


Abb. 4.2: Optimiersequenz des Simplex-Algorithmus am Beispiel einer zwei-parametrischen Optimierung; (b) bester Versuchspunkt, (n) zweitbesten Versuchspunkt, (s) schlechtester Versuchspunkt des Startsimplexes; (p) Schwerpunkt der geometrischen Figur ohne den schlechtesten Wert, (r) neuer Versuchspunkt [91]

Von besonderer Bedeutung für das Gelingen der Optimierung ist die Wahl der besten Schrittweite. Ist diese zu groß, wird leicht das Optimum übersprungen, während bei zu geringen Schrittweiten möglicherweise ein lokales Optimum gefunden und die Versuchsdauer enorm verlängert wird.

Aus diesen Gründen wurden, wie oben bereits erwähnt, Modifizierungen am Algorithmus vorgenommen, welche eine variable Gestaltung der Schrittweite implementiert haben. Die Größe der Schrittweite ist dabei situationsabhängig und auch die Richtung kann zusätzlich modifiziert werden. Nach der Auswertung eines neuen Suchpunktes r werden folgende Fälle unterschieden:

- r ist besser als b

die Schrittweite wird vergrößert, wobei ein Faktor α eingeführt wird, der größer als 1 ist (Gl. (4.3)):

$$e = p + \alpha \cdot (p - s) \quad (4.3)$$

hierbei ist e der neue Versuchspunkt, der beim nächsten Schritt an die Stelle von r tritt,

- r ist schlechter als b

die Schrittweite wird verkleinert, wobei zwei Fälle zu unterscheiden sind:

1. ist r besser als s und schlechter als n , wird der Simplex kontrahiert, eine Richtungsänderung ergibt sich nicht; man erhält einen neuen Versuchspunkt c_+ (Gl. (4.4)):

$$c_+ = p + \beta \cdot (p - s), \quad (4.4)$$

wobei β zwischen 0 und 0,5 liegt.

2. r ist schlechter als n und s , so wird der Simplex kontrahiert und gespiegelt; man erhält den neuen Versuchspunkt c_- (Gl. (4.5)):

$$c_- = p - \beta \cdot (p - s). \quad (4.5)$$

- r ist schlechter als b und besser als n

die Schrittweite und die Richtung des Simplex bleiben unverändert.

Eine grafische Darstellung der beschriebenen Fälle bezüglich des Simplex mit variabler Schrittweite ist in Abb. 4.3 dargestellt.

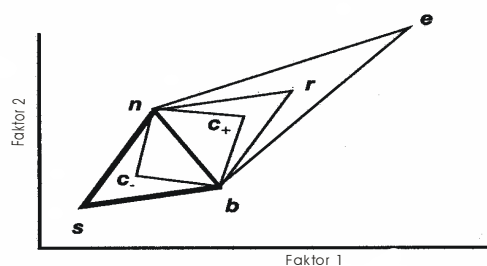


Abb. 4.3: Mögliche Schrittweitenvariation des Simplex-Algorithmus mit variabler Schrittweite [91]

Eine Garantie, dass der Simplex-Algorithmus das globale Optimum findet, ist jedoch nicht gegeben, was Abb. 4.4 verdeutlicht.

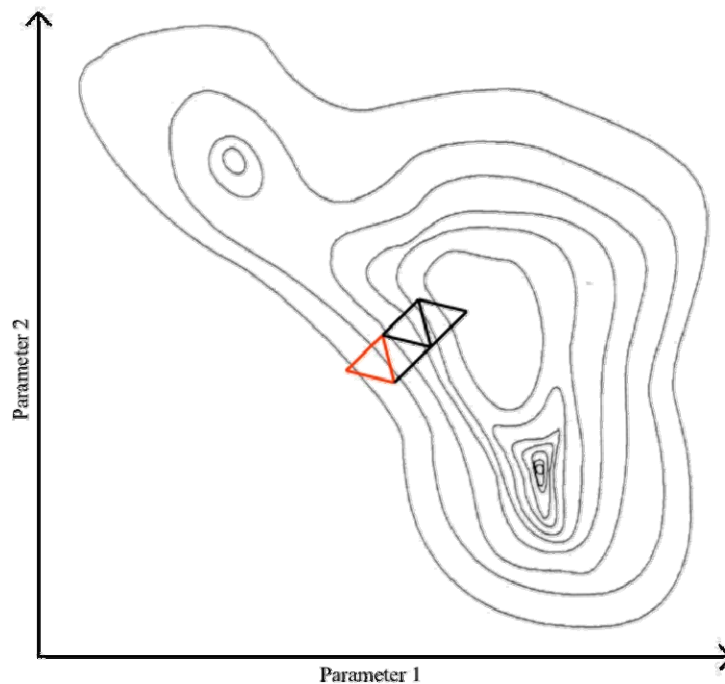


Abb. 4.4: Beispiel für eine fehlerhafte Optimierung unter Anwendung des Simplex-Algorithmus; dargestellt ist wegen der übersichtlicheren Darstellung nur der Simplex mit konstanter Schrittweite, wobei der Startsimplex rot dargestellt ist; gefunden würde unter den vorgegebenen Startbedingungen lediglich ein lokales Optimum

Das Problem ist hier in der vom Algorithmus verwendeten „hill-climbing“-Strategie zu suchen, da der Weg immer entlang des stärksten Gefälles orientiert ist und somit zum nächstgelegenen Optimum führt. Dies bedeutet, dass die gesamte Optimiersequenz und letztendlich der Erfolg sehr stark von den vorgegebenen Startbedingungen abhängig ist. Es existieren aber auch einige Möglichkeiten, die Wahrscheinlichkeit solcher Ereignisse zu minimieren:

- nach einer definierten Anzahl von Schritten kann neu angesetzt werden und um den bislang besten Wert mit einer definierten Abweichung ein neuer Simplex aufgebaut werden;
- alternativ kann eine solche Abweichungen auch mit Hilfe eines implementierten Zufallsgenerators vorgegeben werden;
- ein Neuansatz wird statt nach n-Schritten per Zufallszahl festgelegt.

Liegen solche multimodalen Zielfunktionen vor, wie sie in Abb. 4.4 dargestellt sind, sollten vor Anwendung einer „hill-climbing“-Strategie alternative, stochastische Methoden wie beispielsweise Genetische Algorithmen zur groben Identifizierung des globalen Optimums eingesetzt werden. Die Theorie hierzu ist Gegenstand des nachfolgenden Kapitels.

4.1.2 Genetische Algorithmen

Die zu den stochastischen Algorithmen zählenden Genetischen Algorithmen (GA) wurden Mitte der 1960er Jahre von John H. Holland entwickelt. Beispielhaft für die Optimierstrategie dieser mathematischen Methode ist die Implementierung rein biologischer Prozesse wie Selektion und Reproduktion in den Optimierprozess, um dadurch bessere Lösungen einer gesuchten Zielgröße zu erhalten. Der Hintergrund der entwickelten Algorithmen ist in der Strategie der von Charles Darwin veröffentlichten Evolutionstheorie des „survival of the fittest“ zu finden [92]. In der Umwelt fungiert eine Zelle generell als „Problemlöser“ und reagiert dabei auf verschiedene äußere Stimuli, indem durch den selektiven Druck besser adaptierte Nachkommen reproduziert werden. Durch diese Abstraktion der biologischen Modelle in den Algorithmus ergeben sich neuartige Lösungsansätze für viele konventionell kaum oder nicht zu optimierende Fragestellungen wie beispielsweise nicht lineare Probleme. Die Eigenschaften, die den Einsatz Genetischer Algorithmen für die Optimierung biotechnologischer Prozesse hervorheben, lassen sich wie folgt zusammenfassen [95]:

- GA benötigen keine Modelle; die Modellbildung biotechnologischer Prozesse ist sehr zeitaufwändig;
- biologische Systeme sind in der Regel nicht linear; Genetische Algorithmen optimieren eine biologische „Black Box“;
- Genetische Algorithmen sind unempfindlich gegen Rauschen; die ermittelten Werte sind in der Regel stark verrauscht;
- Genetische Algorithmen sind für das Handling eines großen Parametersatzes und multimodaler Funktionen ausgelegt; eine Einschätzung des Einflusses verschiedener Parameter untereinander ist nur schwer möglich; die zu untersuchende Parameteranzahl ist üblicherweise hoch.

Holland konzipierte seinen an der Evolution orientierten Algorithmus derart, dass bei den zu untersuchenden Parametern zwischen dem Genotyp und Phänotyp differenziert wird (vgl. Abb. 4.5), wodurch selbst komplizierte Parametervariationen in einfache Strukturen umgewandelt werden können.

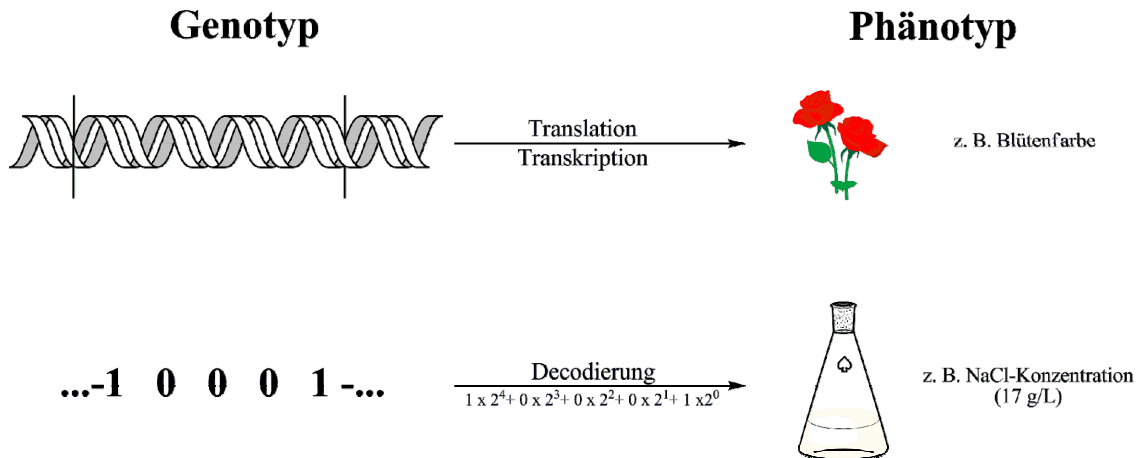


Abb. 4.5: Analogie des Phänotyps und Genotyps von Molekulargenetik vs. GA

In der Regel wird eine Codierung der Parameter in den Binärcode vorgenommen, d. h. die einzelnen Parameter werden in so genannte bit³-strings umgewandelt, womit sich für den Optimierprozess die in der Natur vorkommenden genetischen Operatoren wie Selektion, Crossover, Mutation und Paarung anbieten. Die Umwandlung der reellen Parameterwerte in die Binärdarstellung erfolgt dabei in der Regel nach dem üblichen mathematischen Formalismus⁴ (vgl. (4.6)), man spricht dann von einem „simple genetic algorithm“.

$$x_i = \sum_{v=0}^j b_j \cdot 2^j \quad (4.6)$$

So würde die Realzahl 7 beispielsweise folgendermaßen in den Binärcode transformiert werden:

$$\text{z. B.: } 0111 = 0 \cdot 2^3 + 1 \cdot 2^2 + 1 \cdot 2^1 + 1 \cdot 2^0 = 7.$$

Der so codierte Parameterwert bildet dann ein „Gen“ auf dem bit-string, welches in seiner Gesamtheit – als Summe der einzelnen „Gene“ – als „Chromosom“ bezeichnet wird (vgl. Abb. 4.6).

³ bit: binary digit

⁴ Eine Transformation der reellen Werte in den Binärcode ist bei den neueren Softwarepaketen nicht mehr zwingend notwendig, da diese inzwischen auch direkt mit dem natürlichen dekadischen System zurechtkommen. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode wurde jedoch ebenfalls mit der Codierung im Binärcode gearbeitet.

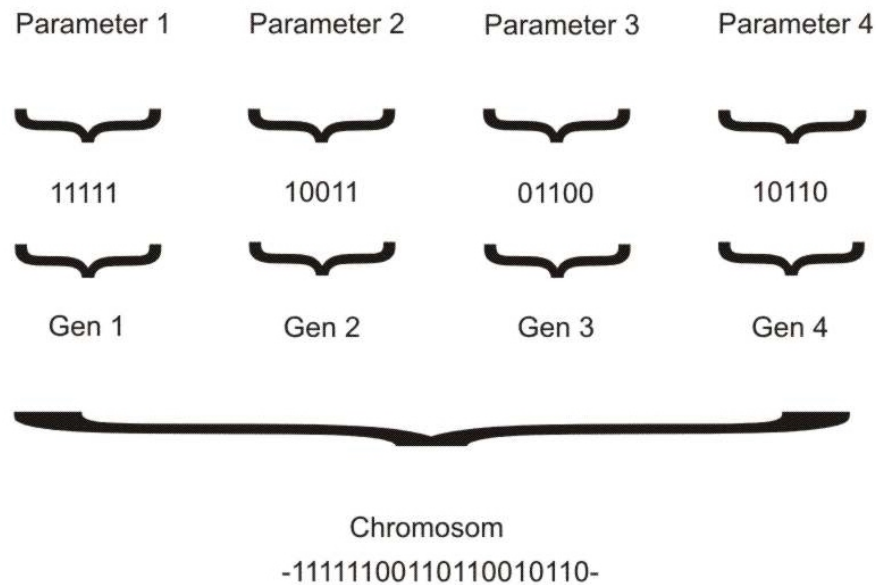


Abb. 4.6: Darstellung eines „Chromosoms“ durch Transformation eines dekadischen Parametersatzes in den Binärcode

Der Algorithmus arbeitet aber nicht mit einem einzelnen „Chromosom“, sondern, da es sich um eine parallele Optimierungsmethode handelt, mit einer gewissen Anzahl an codierten Parametersätzen, die zuvor vom Experimentator innerhalb der Softwarepakete festgelegt werden müssen. Dabei sollte die Zahl der zu untersuchenden Variationsparameter maximal halb so groß sein wie die Anzahl der verschiedenen parallel durchzuführenden Versuche, die jeweils als „Individuen“ bezeichnet werden [93]. Sind die vom Programm vorgegebenen Versuche durchgeführt und die Werte der Zielfunktionen der einzelnen „Individuen“ ermittelt worden, findet ein Ranking der einzelnen Kombinationen der Versuchsanordnungen statt. Diejenigen „Individuen“ mit der besten Ausbeute oder den jeweils besten Ergebnissen haben eine höhere quantitative Fitness und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit, einen Einfluss auf die Nachkommen zu haben, indem sie in einem stärkeren Maße für die weiteren Arbeitsschritte des Algorithmus selektiert werden. Diesem Schritt folgt der Abschnitt der Reproduktion, um eine konstante Anzahl von Individuen in den jeweiligen Generationen zu gewährleisten. Die vorhandenen Strings werden nun in Paaren angeordnet und nach dem Zufallsprinzip findet bei diesen ein Austausch einzelner binärer Segmente statt, man spricht von einem „Crossover“ in Analogie zum biologischen Term. Die Wahrscheinlichkeit für einen Crossover zwischen zwei gepaarten Binärstrings kann dabei frei gewählt werden, sollte aber mehr als 90 % betragen [94]. Alternativ zu einem „single-point“ Crossover können auch andere Möglichkeiten des Informationsaustausches wie beispielsweise ein Crossover an zwei verschiedenen Punkten oder höherdimensionierte Multipointcrossover von der Software vorgenommen werden. Durch diesen Informationsaustausch einzelner Parameter bereits selektierter Individuen ist ein schnellerer Optimierungsfortschritt möglich, als es die Operatoren Selektion und Mutation allein ermöglichen. Die Wahrscheinlichkeit für einen Crossover sollte zudem nicht zu gering gewählt werden, da hierdurch der Experimentieranteil reduziert wird und kaum neue

Informationen in die Optimiersequenz einfließen bzw. kaum neue Individuen generiert werden. Mit Hilfe des nachfolgend eingesetzten Mutationsoperators wird bei den nun modifizierten „Chromosomen“ mit einer zuvor definierten Wahrscheinlichkeit eine Invertierung einer Eins zu einer Null oder umgekehrt durchgeführt. Die Mutation dient im Algorithmus zur Prävention einer vorzeitigen Konvertierung der zu untersuchenden Individuen, wobei die Mutationsrate dabei zwischen 0,0 und 0,1 liegen sollte. Wird sie zu gering gewählt, ist jedes Bit für die gesamte Optimierung im Prinzip festgelegt. Eine zu hoch voreingestellte Mutationsrate führt jedoch dazu, dass die gesamte Suche zufällig wird [95].

Der üblicherweise zur Codierung verwendete Binärcode bringt aber auch einige Nachteile hinsichtlich der genauen Identifizierung des Optimums mit sich. Sind nur noch kleine Veränderungen in der Parametervariation notwendig, um das globale Optimum zu erreichen, kann es aufgrund der Codierung dazu kommen, dass eine Inversion eines gesamten Segments im Binarstring notwendig wird. Soll beispielsweise ein Parameter vom Real-Wert 7 (Binärcode: 0111) auf den Real-Wert 8 (Binärcode: 1000) gesetzt werden, wäre eine komplette Invertierung aller einzelnen Bits notwendig. Solch ein Vorgang ist jedoch durch die dem Algorithmus zugrunde liegenden Crossover- und Mutationsoperatoren – sinnvolle Einstellung vorausgesetzt – kaum möglich. Um dieses generell bei der Verwendung des Binärcodes auftretende Problem zu umgehen, wurde bereits 1953 eine alternative Variante der Codierung von Frank Gray vorgeschlagen. Hintergrund dieser Variante ist, dass die im dekadischen System sukzessiv aufeinander folgenden Zahlen sich bei dieser Darstellung im Binärsystem nur in einer Ziffer unterscheiden (vgl. Tab. 4.1). Ursprünglich für die Minimierung der Fehlerübertragung digitaler Signale entwickelt, hat der Gray-Code eine weite Anwendung erfahren.

Tab. 4.1: Vergleich von Binär- und Gray-Code

Binärer Code	Gray Code	Dezimalzahl	Binärer Code	Gray Code	Dezimalzahl
0000	0000	0	1000	1100	8
0001	0001	1	1001	1101	9
0010	0011	2	1010	1111	10
0011	0010	3	1011	1110	11
0100	0110	4	1100	1010	12
0101	0111	5	1101	1011	13
0110	0101	6	1110	1001	14
0111	0100	7	1111	1000	15

Für die bereits erwähnte Selektion wird in der Regel von der Software die so genannte „roulette wheel selection“-Methode (rws-Methode) verwendet. Nach Bewertung der Strings aufgrund des jeweils erzielten Ergebnisses wird dabei die Güte der einzelnen Versuche bestimmt, das Verhältnis der Güten zum Durchschnittswert berechnet und

anschließend ein virtuelles Roulette-Rad kreiert, welches zu den Güten proportional gewichtete Flächen besitzt. Die Anzahl der Segmente des Rades wird durch die Summe der eingesetzten Individuenzahl bzw. der Nachkommenzahl determiniert. Pro Nachkomme wird nun dieses virtuelle Rad gedreht, wobei die Nachkommen mit der größten repräsentierenden Fläche die höchste Wahrscheinlichkeit besitzen, für die Reproduktion von Strings ausgewählt zu werden. In Tab. 4.2 wird das Vorgehen der rws-Methode an einem Beispiel eingehender illustriert.

Tab. 4.2: Illustration der "Roulette-Rad-Methode" [96]

Genotyp (String)		Reprod.- Zahl		„Roulette-Rad“	Wahrscheinlichste Population		
I	01101	→	0,58		→	01101	I
II	11000	→	1,97		→	11000	II
III	01000	→	0,22		→	11000	II
IV	10011	→	1,23		→	10011	IV
			Σ 4,00				

Der String II hat aufgrund seiner höchsten Güte die größte Wahrscheinlichkeit für die Reproduktion gewählt zu werden. Dem String III kommt die geringste Güte zu, weshalb er vermutlich nach dem viermaligen Drehen des virtuellen Roulette-Rads kaum einen Einfluss auf die Nachkommen haben wird. Theoretisch könnte es aber auch vorkommen, dass Individuen mit relativ hoher Güte nicht in die nachfolgende Generation übernommen werden, weshalb einige Algorithmen das beste Individuum direkt für die folgenden Schritte im Algorithmus übernehmen. Eine Methode, die „Evolution“ gezielter voranzutreiben, kann mit Hilfe der „ball-bearing“-Methode forciert werden. Dabei wird um das beschriebene Roulette-Rad ein Kugellager mit äquidistanten Kugeln – die Summe der Kugeln entspricht dabei der Anzahl an Strings – gelegt und virtuell „gedreht“, wodurch eine höhere Gleichverteilung als bei der Roulette-Methode erzielt werden kann [93].

Die einzelnen Schritte bzw. Operationen des Genetischen Algorithmus sind zusammenfassend in Abb. 4.7 dargestellt.

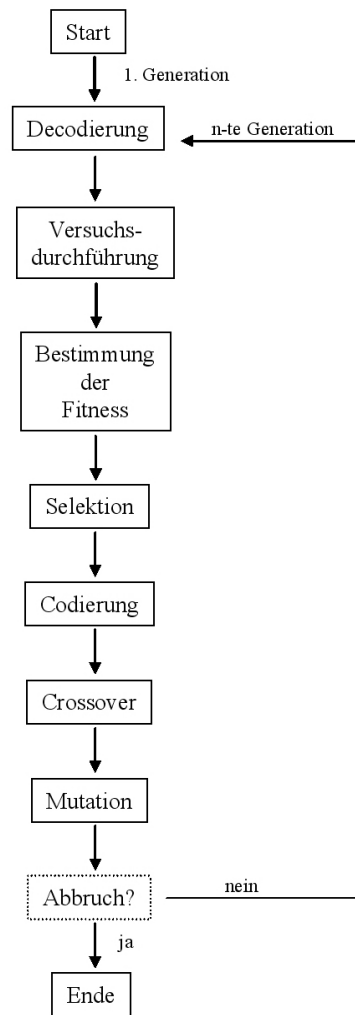


Abb. 4.7: Fließschema für Genetische Algorithmen

Bei den beschriebenen Selektionsverfahren handelt es sich vermutlich um die am häufigsten verwendeten. Weitere Verfahren wie beispielsweise „stochastic universal sampling“ oder „tournament selection“ wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet, weshalb an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen wird [97].

Das besondere Potential Genetischer Algorithmen erschließt sich über die Anwendung des „implicit parallelism“. Neben der direkten Betrachtung der Funktionswerte der einzelnen Individuen einer Generation werden dabei Ähnlichkeiten zwischen den Strings gesucht, womit sich der Informationsgewinn deutlich erhöhen lässt. Zur Beschreibung der Ähnlichkeiten der jeweiligen „Genotypen“ hat sich der Begriff des Schemas etabliert. Ein String 11011001 zählt beispielsweise zur Region 11***** (* ist dabei ein Joker bzw. Wildcard-Symbol und kann eine 0 oder eine 1 darstellen), 1*****1, **0**00* usw. Das bedeutet, dass die größten Regionen (Regionen mit vielen *) in das Suchraster der meisten Strings der Population fallen; es werden also viele Schemata abgedeckt. Ein GA, der nur wenige Bits enthält, überprüft somit eine viel größere Anzahl von Regionen, als es die jeweilige Individuenzahl ausdrückt. Die binäre

Darstellung zeigt bei der Anwendung von Schemata einen großen Vorteil: während eine sechsstellige Zahl im Binärsystem durch einen String der Länge $10^6 \approx 2^{20} = 1,05 \cdot 10^6$ dargestellt wird, gehört eine im dekadischen System dargestellte Zahl nur zu $2^6 = 64$ Schemata [98]. Die Charakterisierung von Schemata erfolgt nach der Ordnung $o(H)$ – definiert als Anzahl der festen Positionen an Nullen und Einsen – und der Länge des Schemas $\delta(H)$, definiert als Distanz zwischen der ersten und letzten festgelegten Position im gesamten Schema. Beispielsweise hat der String 011**1 die Ordnung $o(H) = 4$ und die Schemalänge $\delta(H) = 6 - 1 = 5$. Die Vergrößerung oder Verkleinerung eines Schemas, welches m -fach in der Binärcharakterdarstellung der Generation präsent ist, kann mit Hilfe von Gl. (4.7) beschrieben werden. Dabei ist $f(H)$ die mittlere Fitness der Binärcharaktere, die das Schema H enthalten, f_{avg} die mittlere Fitness aller Individuen einer Generation und t der Generationszähler.

$$m(H, t+1) = m(H, t) \cdot \frac{f(H)}{f_{\text{avg}}} \quad (4.7)$$

Das bedeutet, dass Schemata mit einer überdurchschnittlichen Fitness vergrößert, während unterdurchschnittliche Schemata verkleinert werden [94]. Der Konservierung von Schemata bezüglich Crossover liegt eine bestimmte Gesetzmäßigkeit zugrunde. So ist die Wahrscheinlichkeit p_s , dass ein Schema während eines Crossovers nicht zerstört wird, eine Funktion der Schema-Länge $\delta(H)$, der Crossoverwahrscheinlichkeit p_c sowie der Länge l der binär codierten Strings (vgl. (4.8)):

$$p_s \geq 1 - p_c \cdot \frac{\delta(H)}{l-1} \quad (4.8)$$

Neben dem Crossover hat auch die durch den Mutationsoperator vorgenommene Manipulation am Binärstring einen Einfluss auf die vorhandenen Schemata. Ein Ansatz, der die Vergrößerung bzw. Verkleinerung von Schemata nach der Selektion, dem Crossing over und der Mutation zusammenfasst, kann wie folgt beschrieben werden (vgl. (4.9)) [99]:

$$m(H, t+1) \geq m(H, t) \cdot \frac{f(H)}{f_{\text{avg}}} \cdot \left[1 - p_c \cdot \frac{\delta(H)}{l-1} \right] - o(H) \cdot p_m \quad (4.9)$$

Hieraus resultiert, dass neben der Fitness eines Strings besonders die Schemalänge und die Ordnung für die Größe eines Schemas in der Folgeneration von Bedeutung sind.

Sollen lineare Probleme mit Hilfe von GAs gelöst werden, reduziert sich der gesamte Suchraum im Gegensatz zu nicht-linearen Problemen, da die Anwesenheit einer 1 bzw. einer 0 an einer Position im String keinerlei Auswirkungen auf andere Positionen im Binärstrang zeigt. Ein Suchraum von beispielsweise 1000 Binärstrings enthält mehr als 3^{1000} Lösungen; handelt es sich dagegen um ein lineares Problem, reduziert sich der Suchraum auf 2000 Möglichkeiten, da „nur“ die Positionen von Nullen und Einsen jeder Position in die Lösung einfließen [100].

4.2 Einsatz von Simplex- und Genetischem Algorithmus zur Optimierung von Bioprocessen - Stand der Technik

Die Optimierung von biotechnologischen Prozessen ist ein unentbehrlicher Schritt, wenn eine ökonomische Betrachtung sowie eine technische Umsetzung grundlagenbasierter Forschungsergebnisse erfolgen soll. Obwohl aufgrund der industriellen Voraussetzungen für solch ein Vorgehen viele mathematische Lösungsmodelle zur Verfügung stehen, finden diese nur langsam Eingang in (bio-)chemische und ingenieurwissenschaftliche Disziplinen. Zwar liefert eine Literatursuche im Science Citation Index (Stand Dez. 2006) nach den Stichworten „genetic algorithm“ bzw. „simplex algorithm“ 13.269 respektive 579 Literaturverweise, jedoch muss dieses Suchergebnis vor dem Hintergrund aller vorhandenen wissenschaftlichen Teildisziplinen betrachtet werden. Besonders im Bereich der Modellbildung sowie der Anpassung experimenteller Daten an ein Modell haben sich diese Algorithmen etabliert und finden neben weiteren Algorithmen zur statistischen Modellbildung eine breite Anwendung, deren zusammenfassende Darstellung jedoch basierend auf der enormen Fülle an Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelt werden kann. Selbst eine Präsentation der ins wissenschaftliche Teilgebiet dieser Arbeit fallenden Publikationen kann keinerlei Anspruch auf Vollständigkeit erfüllen, weshalb im Folgenden auf einige bedeutende Veröffentlichungen mit Modellcharakter eingegangen wird.

Der Einsatzbereich Genetischer Algorithmen im natur- wie auch im ingenieurwissenschaftlichen Bereich umfasst bereits sehr viele Teildisziplinen. Neben der Anwendung Genetischer Algorithmen im computergestützten Moleküldesign [101, 102] sind ebenso Einsatzmöglichkeiten für numerische Optimierungen chemometrischer Modelle sowie im verfahrenstechnischen Bereich und der Regelungstechnik [103, 104, 105, 106, 107] und auch im High-Throughput-Screening in der Kombinatorischen Chemie [108, 109] beschrieben. Es lassen sich in der Literatur jedoch auch thematisch näher an dieser Arbeit orientierte Einsatzmöglichkeiten solcher Algorithmen finden. Ein Großteil dieser Publikationen fokussiert auf die Optimierung von Nährmediumzusammensetzungen hinsichtlich einer verbesserten Kultivierungsstrategie von Mikroorganismen aber auch algorithmenbegleitete Versuchsdurchführungen zur Etablierung verbesserter Expressionsprofile biokatalytisch aktiver Proteine sowie Optimierungen von Enzymaktivitäten existieren bereits. Einige bedeutende Beispiele sind in Tab. 4.3 zusammenfassend aufgeführt. Trotz der dort aufgeführten deutlichen Effizienz der rechnergestützten Optimierung von Bioprocessen herrscht bei den Anwendern noch vielfach Skepsis sowie eine gewisse Phobie, die einen allgemeinen Einsatz im Laboralltag verhindert. Üblicherweise wird mit einer Reduktion der Suchraumgröße sowie der Suchraumdimension vorlieb genommen, ohne davon auszugehen, dass sich damit die komplette (multimodale) Zielfunktion verändern kann.

Tab. 4.3: Beispiele verschiedener Anwendungen von Genetischen Algorithmen in bioverfahrenstechnischen Prozessen

Biologische Komponente	Zielobjekt	Variablen	Anzahl an Experimenten	Verbesserung der Zielfunktion	Referenz
<i>Arthrobacter simplex</i>	Δ^1 -Dehydrogenase	14	2 · 144	Faktor 5	[110]
<i>Candida boidinii</i>	Format-dehydrogenase	14	2 · 125	Faktor 1,4	[111]
<i>Pseudomonas putida</i>	Biomasse	12	2 · 224	Faktor 1,27	[96]
<i>E. coli</i>	Biomasse, Esterase	7, 12	2 · 84, 2 · 100	Faktor 4,3, Faktor 68	[112]
<i>Candida boidinii</i>	Wachstumsrate	7	40	Faktor 1,19	[113]
<i>Lactobacillus leishmannii</i>	D-Lactat-Dehydrogenase-Aktivität	6	480	Faktor 19	[114]
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Dioxygenase (Dke1)-Expression	10	120	Faktor 16	[115]
Multi-enzymkomplex	Synthese von O-Glykanen	7	56	Faktor 2	[116]

Die in Tab. 4.3 dargestellten Beispiele illustrieren, in welchem Maße eine Zielfunktion im Rahmen einer rechnergestützten Optimierung mit Hilfe sequentiell angewandter Genetischer Algorithmen verbessert werden kann. Die Zielfunktionen weisen dabei um bis zu 68-fache Steigerungen des Ursprungsergebnisses auf. Für einen etablierten industriellen Prozess würde bereits die geringste in Tab. 4.3 genannte 1,19-fache Verbesserung des Ergebnisses deutliche (positive) Auswirkungen auf die Kostenbilanz haben.

Der Einsatz des Simplex-Algorithmus findet im Vergleich zum GA, wie bereits erwähnt, nur in einem deutlich geringeren Umfang statt. Eine Analyse der Literatur mit Hilfe des ISI Web of Knowledge im Dezember 2006 ergab zum Suchbegriff >> „simplex algorithm“ AND optimization << 194 Literaturstellen. Dabei ist der Großteil nicht auf den biowissenschaftlichen Bereich bezogen, wie eine grafische Auswertung der Suchergebnisse, hinsichtlich der Anzahl von Veröffentlichungen bezogen auf die wissenschaftlichen Teilgebiete, repräsentiert (vgl. Abb. 4.8).

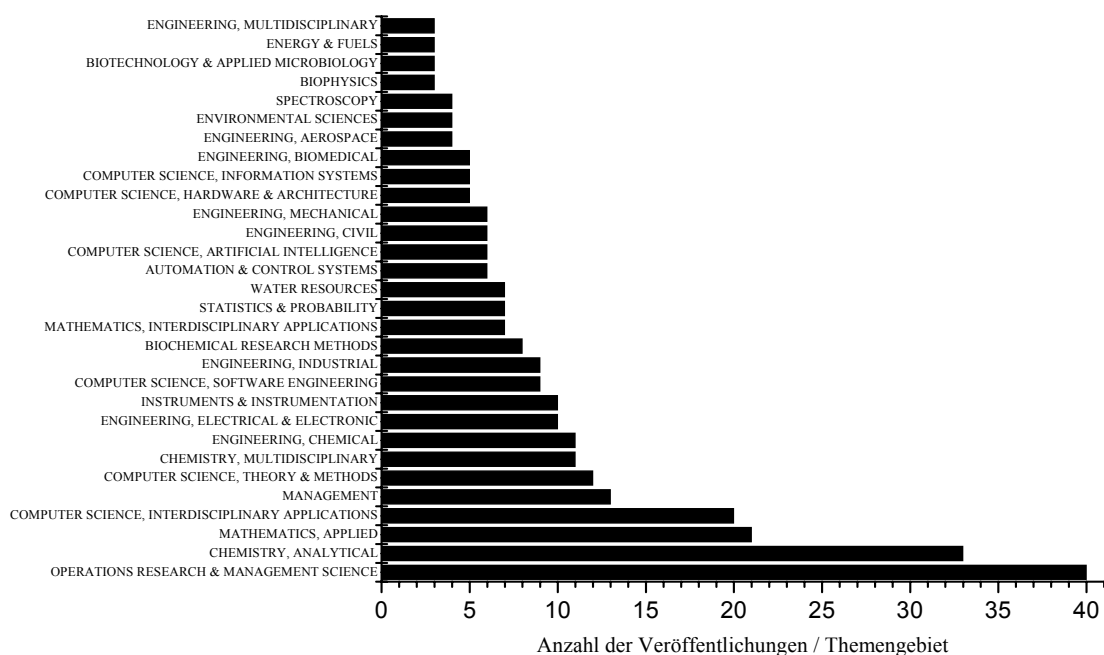


Abb. 4.8: Grafische Darstellung der Anzahl der Suchergebnisse >> „simplex algorithm“ AND optimization << (Stand 12/2006); Mehrfachnennungen sind möglich

Somit wird deutlich, dass dieser Algorithmus im bioverfahrenstechnischen Bereich eher ein „Schattendasein“ fristet, was durch lediglich drei Nennungen im Gebiet „Biotechnology & Applied Microbiology“ sowie acht Einträgen in der Kategorie „Biochemical Research Methods“ zum Ausdruck kommt. Die davon relevanten Veröffentlichungen befassen sich überwiegend mit Optimierungen chromatographischer Trennverfahren (z. B. [117, 118, 119]); lediglich eine ist im Bereich der Modellierung angesiedelt und behandelt die mathematische Beschreibung des Metabolismus von *E. coli* [120]. Diese Suche beinhaltet jedoch nicht sämtliche Veröffentlichungen, da zum einen bei älteren Publikationen keine Keywords angegeben sind sowie nicht alle Zeitschriftenreihen in der Literaturdatenbank aufgenommen wurden. So sind durch weitere Recherchen innerhalb der bereits gefundenen Zitationen Publikationen zu finden, die sich beispielsweise mit der Kostenoptimierung der biotechnologischen Algenproduktion [121], der Optimierung von Kultivierungsbedingungen hinsichtlich pH und T des Fermentationsmediums (*Hansenula anomala*) [122] oder auch mit der Nährmedienoptimierung hinsichtlich der Verbesserung der Enzymexpression beschäftigen [123]. Bei letztgenanntem Prozess konnte eine Steigerung der Antwortfunktion um den Faktor 3,8 innerhalb von 12 Versuchen bei sechs Variablen erzielt werden. Insgesamt fällt jedoch die quantitative Anwendung deutlich geringer aus als die der Genetischen Algorithmen, was allein der Tatsache geschuldet ist, dass diese besser multimodale Zielfunktionen verarbeiten können und in der Lage sind, das globale Optimum aufzufinden.

Besonders interessant ist ein Hybrid aus den beiden beschriebenen Algorithmen, wobei zunächst vom Genetischen Algorithmus das globale Optimum der Zielfunktion aufzufinden ist, welches nachfolgend mit dem „downhill“-Simplex-Verfahren verfeinert

werden soll. Eine Literaturanalyse hierzu liefert lediglich 19 Datensätze, wobei bislang keine Anwendung in der Biotechnologie zu finden ist. Hierfür sollte jedoch der enorme experimentelle Aufwand zur Bewertung berücksichtigt werden, der nicht in jedem Fall eine ökonomische Anwendung der Kombination beider Algorithmen erlaubt.

4.3 Optimierung der L-Serindehydrataseexpression von *Paracoccus seriniphilus*

Gegenstand des Kapitels ist die Anwendung Genetischer Algorithmen und des beschriebenen Simplex-Algorithmus zur Optimierung der Mediumszusammensetzung hinsichtlich der L-Serindehydrataseexpression des marinen Stammes *Paracoccus seriniphilus*. Hintergrund dieser Untersuchung ist die Realisierung eines für L-Serin spezifischen Biosensors, bei dem eine L-Serindehydratase als biologische Komponente eingesetzt werden soll. Üblicherweise erfolgt eine Aminosäureanalytik mittels HPLC, welche eine Derivatisierung der Aminosäuren im zu untersuchenden Reaktionsgemisch für deren Detektion verlangt. Der Zeitaufwand hierfür beträgt in der Regel etwa eine Stunde. Durch die Entwicklung eines bioanalytischen Systems wäre es möglich, die Verfolgung der entsprechenden Aminosäurekonzentration deutlich zu verkürzen. Zu diesem Zweck ist es notwendig, ausreichende Mengen an Enzym bereitstellen zu können. Hierbei können die erläuterten Algorithmen eine große Hilfe leisten.

4.3.1 L-Serindehydratase

Das zur Unterklasse der Lyasen zählende Enzym L-Serindehydratase (E.C. 4.2.1.13) katalysiert die irreversible, nichtoxidative Desaminierung von L-Serin zu Pyruvat [124] und wird sowohl von Pro- als auch von einigen Eukaryonten exprimiert [30]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich mit einer bakteriellen L-Serindehydratase gearbeitet, welche vom marinen Prokaryonten *Paracoccus seriniphilus* exprimiert wird. Es handelt sich bei diesem Stamm um den ersten marinen Vertreter, aus dem eine L-Serindehydratase detektiert und isoliert werden konnte.

Das Enzym ist ein Heterodimer, bestehend aus einer α -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 40 kDa und einer β -Untereinheit von 14,5 kDa [30]. Wie fast alle bakteriellen L-Serindehydratasen ist es aufgrund des Aufbaus empfindlich gegenüber Luftsauerstoff, da die Untereinheiten an Fe-S-Cluster geknüpft sind und in diesen das Fe^{2+} durch den Sauerstoff relativ leicht zu Fe^{3+} oxidiert werden kann. Eine Stabilisierung und Aktivierung des Enzyms ist daher durch einen Zusatz von Fe^{2+} -Ionen bzw. durch Addition von Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol oder Cystein möglich [30].

Im Reaktionsgeschehen fungiert der Fe-S-Cluster zunächst als Lewis-Säure und leitet die Desaminierung von L-Serin durch einen Dehydratisierungsschritt ein (vgl. Abb. 4.9).

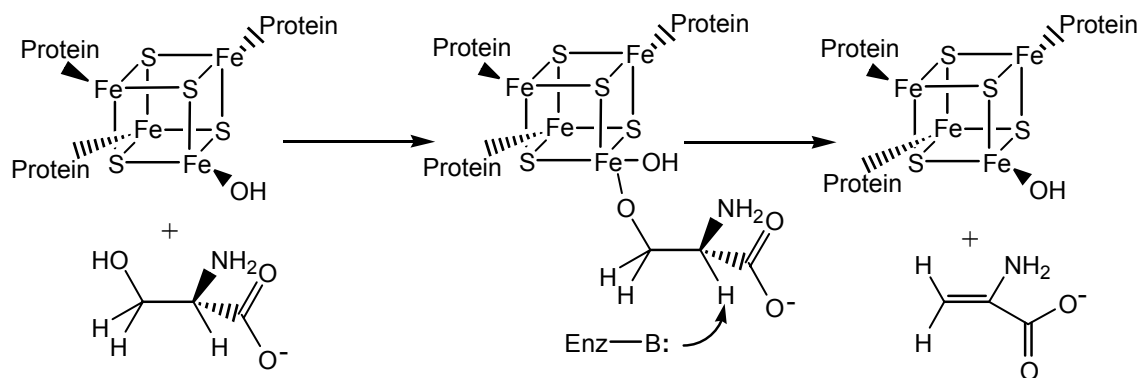


Abb. 4.9: Dehydratisierung von L-Serin durch den Fe-S-Cluster [125]

Der β -Eliminierung folgt eine Tautomerisierung des Aminoacrylats und die Hydrolyse des entstandenen Imins, unter Bildung von Pyruvat und Ammonium [126]. Die optimale Aktivität zeigt das Enzym bei einem pH von 7,6 und einer Temperatur von 51 °C [30].

Im Gegensatz zu L-Threonindehydratase (E. C. 4.2.1.13), die ebenso L-Serin zu Pyruvat umzusetzen vermögen, zeigt die in dieser Arbeit verwendete L-Serindehydratase nur eine geringe Querempfindlichkeit zu Threonin [34]. Für den Einsatz in einem bioanalytischen System zur Detektion der L-Serinkonzentration ist die beschriebene Dehydratase deshalb gut geeignet.

4.3.2 *Paracoccus seriniphilus* als L-Serindehydratase-Expressionsorganismus – Zusammenfassung von Vorarbeiten

Der marine Mikroorganismus *Paracoccus seriniphilus* (DSM 14827) wurde am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover im Rahmen des vom Land Niedersachsen geförderten Forschungsschwerpunkts „Marine Biotechnologie“ von M. Laroche mit Hilfe eines L-Serin-Minimalmediums isoliert und anschließend auf komplexen Medien charakterisiert [30]. Als Quelle des Organismus diente ein Extrakt der Nordsee-Bryozoe *Bugula plumosa*. Eine REM-Aufnahme, welche die kokkenartige Gestalt der Zellen zeigt, ist in Abb. 4.10 dargestellt.

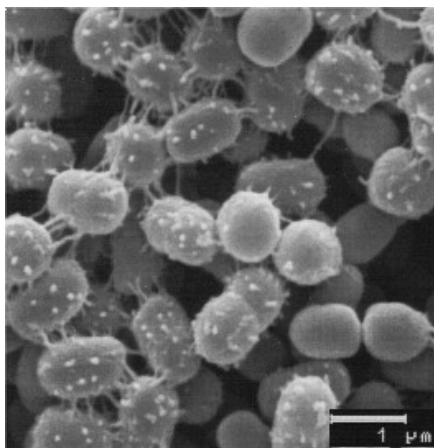


Abb. 4.10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *P. seriniphilus* nach Kultivierung in Marine Broth Medium [30]

Hinsichtlich einer „Vor-Optimierung“ der Biomasse- und Enzymproduktion etablierte sich ein Medium, das aus 34,3 g/L Sea Salts, 5 g/L Pepton und 5 g/L Hefeextrakt zusammengesetzt war. Hiermit konnte die optimale Kultivierungstemperatur ($T_{\text{opt.}} = 30\text{ °C}$) und der pH-Bereich (pH 6,5–8) für das Wachstum in Schüttelkulturen ermittelt werden [30]. Eine nachfolgende Substitution des Sea Salts durch Natriumchlorid im Basismedium zeigte ein optimales Wachstum des Stammes bei einer NaCl-Konzentration von 3 % [30].

Mit dieser Formulierung des Nährmediums wurde schließlich bei den zuvor bestimmten optimalen Kultivierungsparametern (pH 7 und 30 °C) der optimale Erntezeitpunkt ermittelt (vgl. Abb. 4.11).

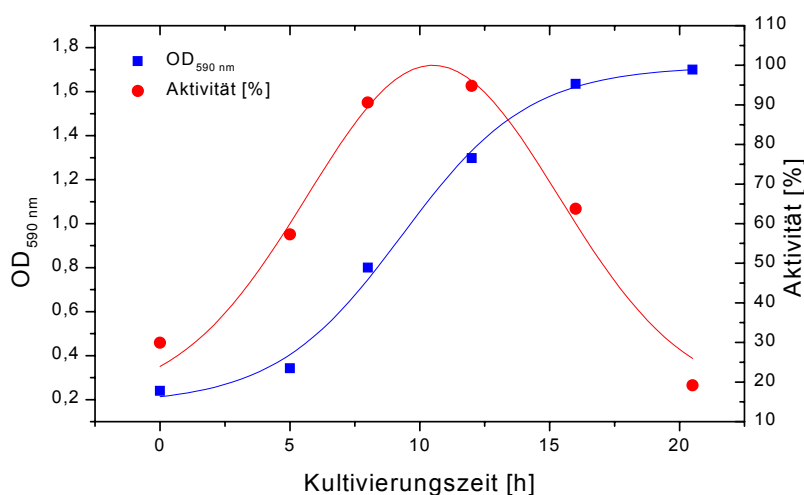


Abb. 4.11: Ermittlung des optimalen Erntezeitpunkts zur Gewinnung der L-Serindehydratase (Kultivierung erfolgte in MB50 mit einem Zusatz von 1 g/L L-Serin) [30]

Der Erntezeitpunkt liegt demnach kurz vor Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Eine Induktion der Enzymproduktion erfolgte dabei durch einen Zusatz von 1 g/L L-Serin zum Kultivierungsmedium.

Basierend auf diesen Vorarbeiten der Dissertation von M. Laroche wird im folgenden Kapitel die Optimierung der Enzymexpression unter Anwendung einer Kombination von Genetischem Algorithmus und Simplex-Algorithmus beschrieben.

4.3.3 Eingesetzte Strategie zur Optimierung der L-Serindehydrataseexpression unter Anwendung der Algorithmen

Anhand der in Kap. 4.3.2 dargestellten Ergebnisse aus Vorversuchen [30] sollte das Medium für die Kultivierung von *P. seriniphilus* hinsichtlich der Enzymexpression optimiert werden. Hintergrund ist der bereits erwähnte Einsatz des Enzyms in einem bioanalytischen System zur Detektion der L-Serinkonzentration in einem großtechnischen Prozess. Hilfreich für das Gelingen einer solchen Optimierstrategie ist es, vorab einige den gesamten Prozess betreffende Fragestellungen zu formulieren:

- Welche Mediumsbestandteile sollen optimiert werden?
- Sind diese Bestandteile das ganze Jahr über in äquivalenter Qualität verfügbar?
- Welche Gütefunktion soll von den Algorithmen maximiert werden?

Das von Laroche [30] zur Biomasseproduktion sowie als Expressionsmedium verwendete Komplexmedium, basierend auf 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Pepton, 3 % NaCl und dem für die Enzyminduktion notwendigen Zusatz von 1 g/L L-Serin, war hinsichtlich der Inhaltsstoffe in Bezug zur Enzymproduktion und dem Zellwachstum unoptimiert. Mit Hilfe dieses Mediums konnte zwar ausreichend Enzym für die Charakterisierung und Aufreinigung gewonnen werden, eine effiziente Gestaltung der Expression stand dabei jedoch nicht im Vordergrund der grundlagenbasierten Untersuchungen. Die eingesetzten Mediumsbestandteile, welche in der Regel kaum jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen, wie es beispielsweise bei günstig verfügbaren Nährmediensbestandteilen wie Melasse, Maisquellwasser oder Sojaöl vorkommen kann, sind somit gut geeignet für einen stabil laufenden Produktionsprozess des Enzyms.

Von Bedeutung für den Optimierprozess war schließlich die Festlegung, in welchen Konzentrationsbereichen die jeweiligen Komponenten variiert werden sollten und ob eine Einbeziehung weiterer Bestandteile in die rechnergestützte Optimierung sinnvoll ist. Da es sich um ein marines Bakterium handelt, welches in der Regel nicht an hohe Nährstoffgehalte adaptiert ist, wurde der zu optimierende Konzentrationsbereich der Nährstoffquellen zwischen 0–20 g/L festgelegt. Üblicherweise zeigen diese komplexen Nährmedien selbst eine Pufferwirkung, welche jedoch nur bei ausreichend hoher Konzentration gewährleistet ist. Da aufgrund der Voreinstellungen auch geringe Konzentrationen der Bestandteile von den Algorithmen vorgegeben werden können,

sollte ferner der Einfluss eines Pufferzusatzes bei der Optimierung betrachtet werden, der beim bislang ermittelten pH-Wachstumsoptimum seine puffernde Wirkung entfaltet. Hintergrund dabei ist, dass Abweichungen vom Optimum des pH-Werts im Kultivierungsverlauf eine Verringerung der Wachstumsrate hervorrufen [30]. Zudem könnte es durch solche Abweichungen vom pH-Optimum zu einem unkontrollierten Expressionsverhalten der L-Serindehydratase kommen, welche die gesamte Optimierungsstrategie beeinflussen würde. Um dies zu unterbinden, wurde ein auf pH 7,0 voreingestellter Kaliumphosphatpuffer ausgewählt, der im Bereich von 0–100 mM dem Medium supplementiert wurde.

Von erheblicher Bedeutung für den Prozess ist zudem der Zeitpunkt, wann die einzelnen Mediumsbestandteile zusammengeführt werden sollen. Die sicherlich eleganteste Variante, der Sterilfiltration nach dem Zusammenfügen der einzelnen (unsterilen) Bestandteile, konnte aufgrund der hohen Verbrauchskosten für die benötigten Filtrationsmodule nicht angewandt werden. Ein Zusammenfügen aller Bestandteile und die nachfolgende Reduktion der in den Medienbestandteilen enthaltenen Keime mittels Dampfsterilisation konnte ebenso nicht genutzt werden. Hierbei können unkontrollierte Reaktionen zwischen den eingesetzten Medienbestandteilen auftreten, wie beispielsweise die Maillard-Reaktion, bei der unter Hitzeeinwirkung neue Verbindungen durch eine Reaktion reduzierender Zucker mit Aminosäuren gebildet werden, womit eine Reduktion der zu verstoffwechselnden Bestandteile auftritt. Daher wurden für die Optimiersequenz Stammlösungen der drei Bestandteile, aus denen sich das Nährmedium zusammensetzt, vorbereitet, die schließlich separiert voneinander mittels Dampfsterilisation vorbehandelt wurden. Auftretende Maillard-Reaktionen in der Hefeextrakt-Stammlösung konnten somit zwar nicht ausgeschlossen werden, jedoch fanden sie unter definierten Bedingungen statt und konnten somit gegebenenfalls beim Neuansetzen reproduziert werden.

Eine besondere Bedeutung wurde bereits der Wahl der Zielfunktion bzw. der Gütefunktion zugeschrieben, was im Folgenden detailliert erläutert wird. Das angestrebte Versuchsziel ist die optimierte Expression der L-Serindehydratase hinsichtlich der Nährmediumszusammensetzung. Wie ist aber nun diese „optimierte Expression“ zu definieren? Zum einen soll der Mikroorganismus eine große Menge an Enzym produzieren und zum anderen ein gutes Wachstum auf dem eingesetzten Medium zeigen, damit schließlich genügend Biomasse verfügbar ist, aus der das Enzym isoliert werden kann. Abb. 4.11 (Kap. 4.3.2) verdeutlicht dieses Problem mit der Darstellung des optimalen Erntezeitpunktes für das Enzym. Das Dilemma ist dabei, dass das Maximum der Enzymaktivität bzw. der Enzymexpression vor dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase erreicht wird. Ein vorteilhaftes Expressionsverhalten, wobei das Enzym mit maximaler Aktivität am Ende der exponentiellen Wachstumsphase produziert würde, liegt demnach nicht vor, weshalb ein Kompromiss für die zu optimierende Gütefunktion gefunden werden muss. Aufgrund dieser Tatsache wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Gütefunktion das Produkt aus der Optischen Dichte und der Enzymaktivität

zum Zeitpunkt t gewählt. Hierdurch können, wie Abb. 4.12 anschaulich zeigt, beide Ziele – hohe Biomasseausbeute sowie maximale Enzymaktivität – kombiniert werden.

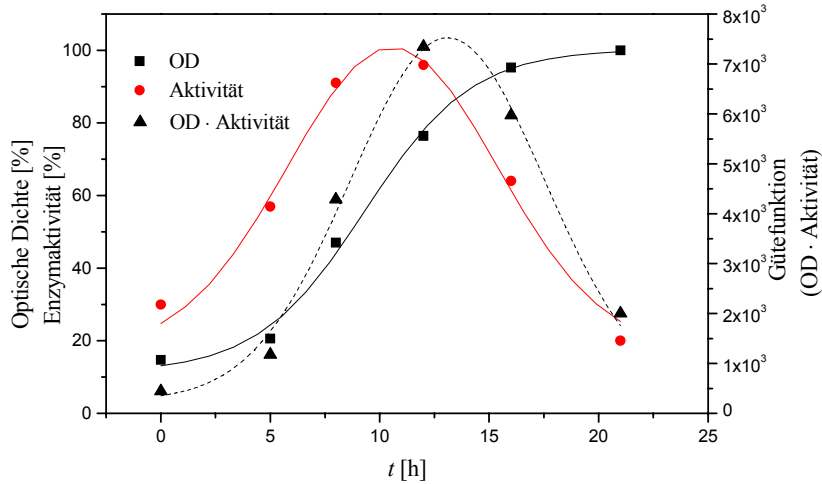


Abb. 4.12: Darstellung der angewandten Gütefunktion (Produkt aus Biomasse und Enzymaktivität)

Eine ausschließliche Betrachtung der Optischen Dichte als Gütekriterium würde dagegen, wie Abb. 4.12 zeigt, eine Kultivierung bis hinein in den stationären Bereich bedeuten. Insgesamt würde dabei eine minimale Enzymaktivität resultieren. Eine ausschließliche Betrachtung der Enzymaktivität als Zielfunktion würde ebenfalls zu Fehlinterpretationen und vermutlich ebenso zu einem Misserfolg führen, da schon geringe Mengen an Biomasse Enzymaktivität zeigen.

Alternativ hätte auch eine Gütefunktion gewählt werden können, welche die Summe aus Aktivität und Biomasse darstellt. Wie Abb. 4.13 zeigt, würde solch eine Definition der Zielfunktion zu einem frühzeitigeren Anstieg vor und zu einem langsameren Abfall der Funktion nach Erreichen des Optimums führen, womit insgesamt ein schlechteres Ergebnis resultieren würde als mit der gewählten Definition.

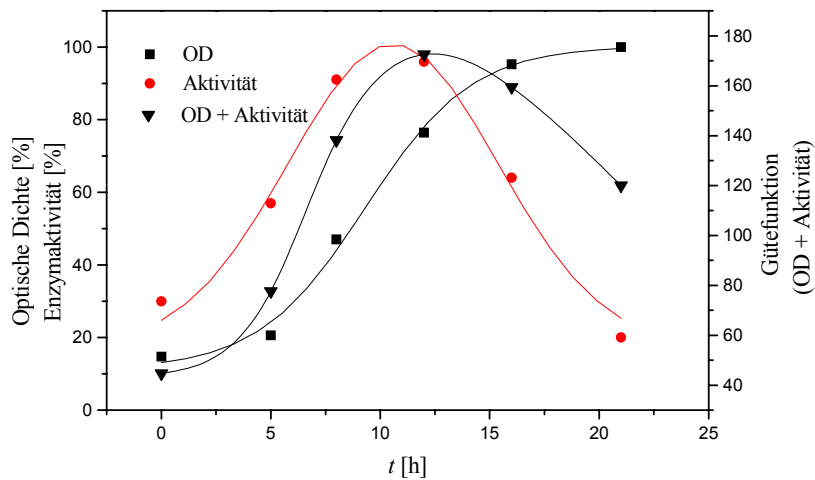


Abb. 4.13: Darstellung der alternativen Gütefunktion (OD + Enzymaktivität)

Aufgrund dieser Vorüberlegungen zur Gütefunktion muss ebenso der Einfluss der Mediumszusammensetzung auf Wachstum und Enzymexpression diskutiert werden. Je nach Qualität des Mediums werden die Organismen unterschiedlich schnell wachsen. Ebenso wird sich vermutlich das Expressionsverhalten von *P. seriniphilus* auf den einzusetzenden Medien verändern. Eine vorausschauende Korrelation zwischen beiden Funktionen, welche die Güte der Optimierung bestimmen, kann dabei nicht definiert werden. Da für eine im vertretbaren Umfang zu gestaltende Optimierung die Probenahmen inkl. Aufarbeitung für die Enzym-Assays nur zu einem definierten Zeitpunkt durchgeführt werden können, wurde anhand der Vorarbeiten der Erntezeitpunkt der Biomasse auf 16 h festgelegt. Hierbei können jedoch folgende (unvermeidbare) Situationen eintreten:

- die Mediumszusammensetzung kann für das Wachstum so günstig sein, dass zum definierten Erntezeitpunkt bereits eine Lyse der Zellen stattfindet und eine verminderte Aktivität des Enzyms bzw. eine totale Inaktivität resultiert;
- die Mediumszusammensetzung erlaubt nur eine sehr geringe Wachstumsrate bei gleichzeitig hoher Biomasseausbeute, das Enzym würde demnach spät exprimiert werden und somit die Qualität dieses Mediums unentdeckt bleiben.

Die Durchführung der Mediumsoptimierung mit Hilfe der aus dem Produkt an Biomasse und Enzymaktivität gebildeten Zielfunktion zur L-Serindehydratasegewinnung ist Gegenstand des nachfolgenden Kapitels.

4.3.4 Optimierung der L-Serindehydratase-Produktion von *P. seriniphilus* mit Hilfe des Genetischen Algorithmus

Basierend auf den in Kap. 4.3.3 dargestellten Vorüberlegungen zur Optimierung der L-Serindehydratase aus *P. seriniphilus* wurden die Stammlösungen der zu optimierenden

drei Mediumskomponenten Hefeextrakt, Pepton aus Protein und Kaliumphosphatpuffer vorbereitet, deren zu variierende Konzentrationsbereiche in Tab. 4.4 dargestellt sind.

Tab. 4.4: Konzentrationsbereiche der Parameter zur Optimierung der L-Serindehydrataseproduktion

Mediumsbestandteil	Konzentrationsbereich im Medium	Konzentration der Stammlösung
Hefeextrakt	0–20 g/L	100 g/L
Pepton	0–20 g/L	100 g/L
Kaliumphosphat	0–100 mM	1 M (pH 7)
Natriumchlorid	30 g/L	150 g/L

Die Stammlösungen wurden dabei nach dem Ansetzen für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Die für den Kultivierungsprozess notwendigen Fermentationskolben (500 mL Kolben mit je zwei Schikanen) und die zum Zusammenfügen der Mediumsbestandteile in einer Clean-Bench nötigen Messzylinder wurden unter den gleichen Bedingungen autoklaviert.

Als Vorkulturmedium wurde MB20 mit einem Zusatz von 1 g/L Glucose verwendet (100 mL Medium in 500 mL Fermentationskolben mit je zwei Schikanen), welche den Stammlösungen entsprechend autoklaviert wurden.

Die Vorkulturen, die für jede neu vom GA vorgegebene Nährmediumszusammensetzung bzw. Generation vorbereitet werden mussten, wurden mit einer Kolonie beimpft und für 23 h bei 120 rpm und 30 °C im Inkubationsschüttler bebrütet. Die Hauptkulturen wurden entsprechend dem vom Genetischen Algorithmus vorgegebenen Schema in einer Reinwerkbank unter sterilen Bedingungen zusammengemischt (200 mL Medium in 500 mL Fermentationskolben mit je zwei Schikanen), die L-Serinkonzentration mittels einer sterilfiltrierten L-Serinstammlösung zur Enzyminduktion auf 1 g/L eingestellt und nach dem Beimpfen mit jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL für 16 h, 120 rpm bei 30 °C inkubiert. Die Fermentationszeit der Hauptkultur stellt hierbei einen Kompromiss zwischen der in Kap. 4.3.3 diskutierten maximalen Enzymaktivität bzw. der maximal erreichbaren Biomasseausbeute dar und basiert auf den mit Hefe-Pepton erzielten Erfahrungen.

Für die variablen Parameter im Genetischen Algorithmus selbst wurden die in Tab. 4.5 dargestellten Parametereinstellungen verwendet. Anhand des im Voraus unbekanntem Optimierungsverlaufs der Gütefunktion wurde die max. Generationenzahl auf 12 fixiert. Über die Genauigkeit („precision“) bzw. Bitlänge für eine Variable wurde der Wert sechs eingestellt, womit der Zusatz eines jeden Medienbestandteils auf 64 verschiedenen Konzentrationsniveaus gewährleistet ist. Hieraus ergibt sich eine Gesamtgröße des Suchraumes von 262.144 Versuchspunkten, die im Falle der klassischen one-factor-at-a-time-Strategie theoretisch durchzuführen wären. Der Wert für den Parameter Generation Gap wurde auf 1 voreingestellt, damit jeweils nur die aktuell bearbeitete Generation respektive die erhaltenen Ergebnisse zu den in einer Generation durchgeführten Expe-

rimenten betrachtet werden. Eine Populationsgröße von sechs simultan durchzuführenden Versuchen wurde aufgrund der in der Literatur vorhandenen Erfahrungswerte der Software vorgegeben [93]. Für eine Doppelbestimmung wurden daher 12 Versuche pro Generation durchgeführt.

Die Gütefunktion setzt sich aus der Optischen Dichte des reinen Mediums, gemessen bei 600 nm, und der Enzymaktivität, gemessen im Rohextrakt, zusammen. Die Optische Dichte wurde als Differenz zwischen der vor dem Animpfen gemessenen und der nach 16 h Kultivierungszeit ermittelten OD_{600} definiert. Hierdurch wurden die durch die verschiedenen Zusammensetzungen vorhandenen unterschiedlichen Optischen Dichten der Kultivierungsmedien normiert. Ein stärker konzentriertes Medium besitzt schon allein aufgrund seiner höheren Konzentration an Mediumbestandteilen einen höheren Anfangswert und würde daher bei einem äquivalenten Endwert, im Vergleich zu einem geringer konzentrierten Medium, weniger Biomasse liefern. Für die Korrelation der Optischen Dichte mit der resultierenden Biofeucht- und Biotrockenmasse für *Paracoccus seriniphilus*, kultiviert im Marine Broth Medium, sei an dieser Stelle auf Kap. 6.8 verwiesen.

Die Ermittlung der Enzymaktivität erfolgte als Volumenaktivität (U/mL). Da bei jeder Bestimmung der enzymatischen Aktivität äquivalente Biomassekonzentrationen zur Bereitstellung des Rohextrakts verwendet wurden, erlaubte dies den direkten Vergleich der erhaltenen Aktivitäten sowie die einfache Bestimmung der Gütefunktion.

Tab. 4.5: Verwendete GA-Parametereinstellungen bei der Mediumsoptimierung zur L-Serindehydratase-Optimierung

Parameter	Wert
max. Generationenzahl	12
Genauigkeit	6
Generation Gap	1
Mutationsrate	0,03
Crossoverrate	0,9
Populationsgröße	6
Gütefunktion	OD_{600} ·Enzymaktivität

Die Hauptkulturen wurden nach der Kultivierung bei 4 °C und 3.345 g für 30 min zentrifugiert. Das Biomassepellet wurde in ca. 1,5 mL 3%iger Kochsalzlösung aufgenommen, gewaschen und in bis zur Gewichtskonstanz getrocknete 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und erneut bei 4 °C und 10.000 g für 10 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde die Biofeuchtmasse bestimmt (vgl. auch Kap. 6.6.4). Anschließend wurden die Pellets in einem Verhältnis des Aufschlusspuffers (20 mM KPP-Puffer, pH 7,6) zu Biofeuchtmasse von 10:1 (Aufschlusspuffer/-Biofeuchtmasse) suspendiert und zur Stabilisierung und Minderung des Einflusses der

Luftoxidation des Enzyms mit 1 % (v/v) einer 100 mM (1,76 g Cystein in 100 mL Aufschlusspuffer) Cystein-Stammlösung versetzt.

Der Zellaufschluss erfolgte unter Eiskühlung mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Labsonic U, Fa. B. Braun, Melsungen) in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 6 min mit 60 W und einer Pulsdauer von $0,3 \text{ s}^{-1}$. Das Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 15.000 g für 5 min lieferte den für die Aktivitätsbestimmung der L-Serindehydratase eingesetzten Rohextrakt. Die Durchführung des Enzym-Assays ist detailliert im Anhang Kap. 6.4.2 dokumentiert.

Abb. 4.14 zeigt den Verlauf der Zielfunktion des besten Individuums einer Generation im Vergleich zum Mittelwert der Gütefunktion, welcher in der jeweiligen Generation erreicht wird. Zudem wird der direkte Vergleich zur Arbeit von M. Laroche [30] dargestellt.

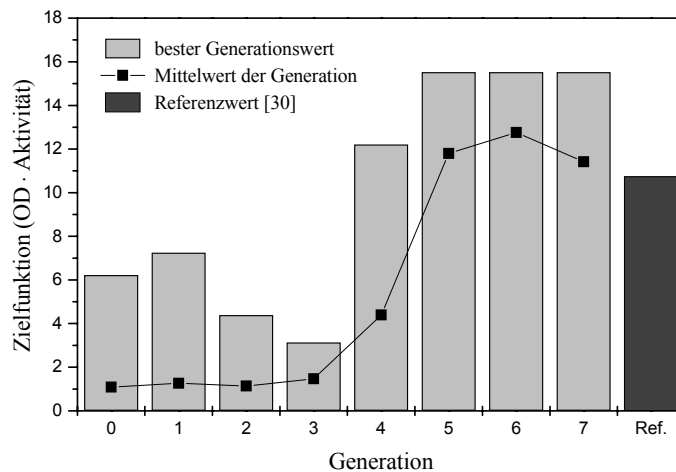


Abb. 4.14: Zielfunktion der Generationsbesten im Vergleich zu den Mittelwerten der Generationen und zum Referenzwert (Ref.)

Während sich die durchschnittliche Güte bis einschließlich der dritten Generation auf einem annähernd konstanten Niveau von etwa eins präsentiert, erreicht der Wert des Generationsbesten der jeweils betrachteten Generation – nachdem in der ersten Generation eine relativ hohe Güte erreicht wurde – in der dritten Generation seinen Minimalwert von drei. Die nachfolgenden Versuche führten sowohl zu besseren Mittelwerten als auch zu einer Steigerung der Zielfunktionswerte der Generationsbesten. Ab der 5. Generation ist eindeutig eine Tendenz zur Konvergenz des Generationsbesten zu beobachten. Die Verbesserung der Zielfunktion hinsichtlich der Mittelwerte ist der erhöhten Reproduktion der besten Individuen einer Generation geschuldet. Zur Verdeutlichung des Konvergenzverhaltens sind die Mediumszusammensetzung, die hiermit erzielten Optischen Dichten, die gemessene Enzymaktivität im Rohextrakt sowie die Zielfunktion in Tab. 4.6 dargestellt. Die vom Algorithmus per Zufall generierte Startge-

neration zeigt die größte Varianz in der gesamten Nährmediumszusammensetzung, alle Parameter sind ausgewogen auf den voreingestellten Suchraum verteilt.

Tab. 4.6: Mediumszusammensetzungen und resultierende Werte der einzelnen Funktionen der Startgeneration vs. „Endgeneration“ (Abbruch erfolgte nach der Durchführung der Experimente zur 7. Generation)

Individuum (Startgen.)	Hefeextrakt [g/L]	Pepton [g/L]	KPP [mmol]	OD ₆₀₀	Aktivität [U/mL]	Ziel- Funktion
1	15,2	10,2	52,4	0,056	0,703	0,039
2	2,9	18,7	74,6	0	0	0
3	10,2	8,9	38,1	0,102	2,557	0,262
4	0,6	13,3	55,6	0	0	0
5	12,7	11,7	71,4	0	0	0
6	14,9	3,5	34,9	1,084	5,743	6,226

Individuum („Endgen.“)	Hefeextrakt [g/L]	Pepton [g/L]	KPP [mmol]	OD ₆₀₀	Aktivität [U/mL]	Ziel- Funktion
1	17,5	7,6	23,8	0,838	5,01	4,198
2	15,2	7,6	0	1,509	10,291	15,527
3	17,5	7,6	0	1,525	9,605	14,645
4	19,7	2,2	0	0,736	4,621	3,401
5	15,2	7,6	0	1,520	10,101	15,354
6	15,2	7,6	0	1,489	10,343	15,401

Im Verlauf der durchgeführten Optimiersequenz wurde durch die auftretende Konvergenz der Zielfunktion – was eine Eigenschaft des Algorithmus ist – diese Varianz verringert. Abb. 4.15 verdeutlicht die Konvergenz durch Darstellung der Konzentrationen der einzelnen Mediumsbestandteile der jeweiligen Generationsbesten.

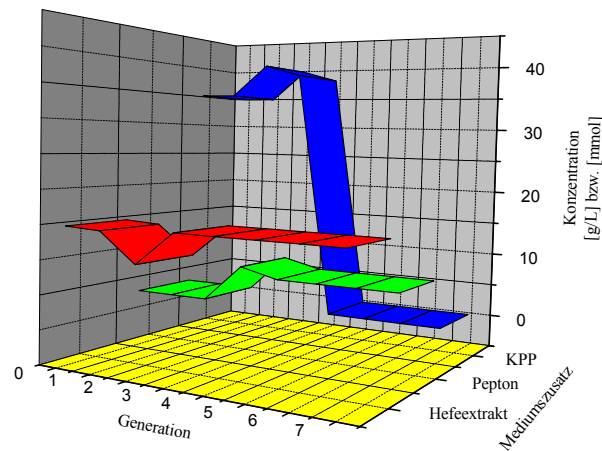


Abb. 4.15: Konzentrationsverlauf der Mediumsbestandteile der Generationsbesten

Der Generationsbeste der Generation 5 wurde, wie Abb. 4.15 belegt, bis zum Abbruch der Optimierung in den nachfolgenden Versuchen wiederholt untersucht und als beste Nährmediumszusammensetzung definiert. Das optimierte Nährmedium setzte sich hinsichtlich der variablen Bestandteile aus 15,2 g/L Hefeextrakt und 7,6 g/L Pepton zusammen, ein positiver Einfluss von Phosphatpuffer auf das Wachstum von *P. seriniphilus* sowie die Enzymproduktion konnte nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Referenzmedium konnte mit Hilfe dieser Optimierung die Zielfunktion um fast 50 % erhöht werden (vgl. Abb. 4.14). Auffällig ist auch der Anstieg der Zielfunktion des Generationsbesten zwischen Generation 4 und 5. Obwohl, wie Abb. 4.15 veranschaulicht, der Generationsbeste die gleiche Zusammensetzung hat, steigt die Zielfunktion von ca. 12 auf fast 16. Dieser Zuwachs liegt darin begründet, dass ab der 5. Generation eine neu angesetzte Stammlösung Hefeextrakt zum Einsatz kam. Da als Quelle für die Stammlösungen jeweils Hefeextrakt aus derselben Charge diente, ist der Anstieg jedoch weniger das Ergebnis einer fehlerhaften Zusammensetzung der Stammlösungen, sondern basiert vielmehr auf Veränderungen der Lösung selbst während des Autoklavierens. Bereits geringfügige Modifikationen des für den Sterilisationsprozess verwendeten Temperaturgradienten können eine unterschiedliche Zusammensetzung herbeiführen. Der Wert der Zielfunktion des Referenzmediums wurde mit dieser zweiten Stammlösung an Hefeextrakt ermittelt. Vergleicht man die Zusammensetzung des Referenzmediums (5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Pepton) mit dem optimierten Medium, so fällt die deutlich höhere Konzentration an C-Quellen auf, wobei die Hefeextraktkonzentration verdreifacht und der Zusatz von Pepton um etwa 50 % erhöht wurde. Wird dieses Ergebnis unvoreingenommen betrachtet, ist der Wert der erzielten Optimierung der Gütefunktion im Vergleich zum deutlich höheren Einsatz an Kohlenstoffquellen nicht direkt zu erschließen. Zunächst muss betont werden, dass in dem hier betrachteten Versuch die Optimierung des Produkts aus Biomasse und Enzymaktivität Gegenstand

der Untersuchungen war und eine Kosten-Nutzen-Analyse in diesem frühen Stand der technischen Entwicklung nicht in die Zielfunktion implementiert wurde. Wie schon in der Einleitung zu diesem Kapitel erwähnt, ist es von enormer Bedeutung, das Optimierziel bereits zu Beginn eindeutig zu definieren, da spätere Änderungen nur schwer in die Optimierung einzubauen sind bzw. eine objektive Betrachtung unmöglich wird, da die zuvor durchgeführten Versuche in der Entscheidungsfindung des Algorithmus als obsolet zu betrachten sind. Die Optimierung sollte dann besser komplett neu begonnen werden.

Interessant ist neben der deutlichen Steigerung der Zielfunktion, insbesondere die in der Optimiersequenz erkennbare zunehmende Konzentration an Kohlenstoffquellen. Eine Vielzahl mariner Mikroorganismen reagiert sehr sensitiv auf eine hohe Nährstoffkonzentration, da der gesamte Enzymapparat keinerlei Adaption an hohe Nährstoffkonzentration für das Überleben im Meer erforderte. Häufig treten auch Inhibierungen bei der Kultivierung auf so genannten „fetten“ Nährböden auf. Vor diesem Hintergrund erscheint es daher denkbar, dass der verwendete Organismus bei dem vom GA ermittelten Optimum im oberen Bereich der stoffwechselphysiologisch sinnvollen Konzentrationen liegt, welche vermutlich nicht in einem üblicherweise verwendeten Screeningverfahren zum Einsatz gekommen wären. Ob tatsächlich bereits an dieser Grenze gearbeitet wurde, war jedoch nicht Zielsetzung dieser Versuche und wurde im Rahmen der Arbeit nicht explizit untersucht.

Aufgrund des illustrierten Konvergenzverhaltens wurde nach Abschluss der einzelnen Versuche der 7. Generation von einer weiteren Optimierung hinsichtlich der L-Serindehydrataseproduktion abgesehen. Eine nachträgliche Verbesserung der Zielfunktion hätte, unter den vorgegebenen Software-Einstellungen bezüglich der Crossover- als auch der Mutationswahrscheinlichkeit, einen zu hohen zeitlichen Aufwand erfordert. Zudem wurde im Rahmen der durchgeführten Versuche bereits unter Verwendung der besten Nährmediumszusammensetzung der 5. Generation eine als ausreichend zu betrachtende Steigerung der Zielfunktion im Vergleich zur Zusammensetzung des von Laroche [30] eingesetzten Referenzmediums erreicht.

Bei den in Tab. 4.6 dargestellten Werten der Zielfunktion für das wiederholt zu testende Wertepaar der Medienbestandteile des Generationsbesten, ist eine leichte Varianz zu erkennen. Im Rahmen einer Mehrfachbestimmung (10-fach) konnte der Zielfunktion ein Fehler von 3 % zugewiesen werden, was eine sehr gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens belegt. Die Güte dieses Wertes wird deutlich, wenn die einzelnen Operationen betrachtet werden, die vor der Berechnung der Zielfunktionen durchzuführen sind, wie beispielsweise Zusammensetzen der Medien, Messung der OD, Einhaltung konstanter Kultivierungszeiten / -bedingungen bzw. Verwendung gleich bleibender Inocula. Die resultierende Varianz ist in Abb. 4.16, in welcher die erzielten Optischen Dichten bzw. die detektierten Enzymaktivitäten sowie die daraus zusammengesetzte Zielfunktion dargestellt sind, erkennbar.

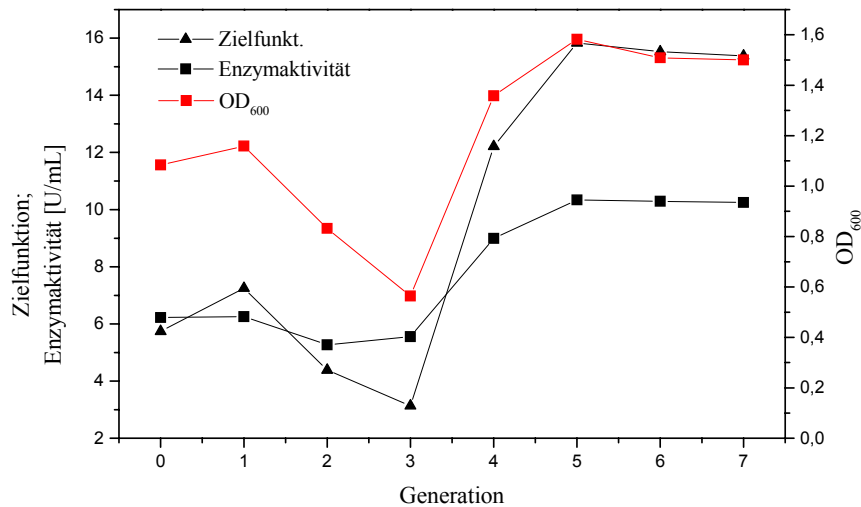


Abb. 4.16: Vergleich der Messwerte von Optischer Dichte, der Enzymaktivität und der aus diesen Werten gebildeten Zielfunktion

Ab der 5. Generation präsentieren sich die Generationsbesten bezüglich ihrer Nährmediumszusammensetzung einheitlich, die geringe Abweichung innerhalb der Generationen fünf, sechs und sieben steht daher im Einklang mit dem oben beschriebenen Fehler. Weiterhin beschreibt die Abbildung den „multiplikativen“ Effekt, welcher durch die Generierung der Zielfunktion als Produkt aus OD und Enzymaktivität auftritt. Dies wird besonders deutlich in den Generationen eins und drei. Während der Gradient der Enzymaktivität zwischen den betrachteten Generationen weniger stark variiert, hat die größere Varianz des OD-Werts einen stärkeren Einfluss auf den Kurvenverlauf der Zielfunktion.

Nachfolgend wird die weitere Optimierung der Zielfunktion mit Hilfe eines Simplex-Algorithmus beschrieben, welcher der Verfeinerung der mit dem GA erzielten besten Nährmediumszusammensetzung dient.

4.3.5 Folgeoptimierung mit einem Simplex-Algorithmus

Basierend auf der in Kap. 4.3.4 mit Hilfe des Genetischen Algorithmus aufgefundenen besten Nährmediumszusammensetzung hinsichtlich der Optimierung der L-Serindehydrataseexpression sollte nachfolgend untersucht werden, ob eine weitere Verbesserung unter Anwendung der „hill-climbing“-Strategie eines Simplex-Algorithmus möglich ist.

Zur Anwendung kam dabei ein in MATLAB[®] per Toolbox implementierter Simplex-Algorithmus mit variabler Schrittweite nach Nelder und Mead, dem einige Programmschritte hinzugefügt wurden (vgl. Anhang 6.10.2).

Als zu optimierende Bestandteile wurden im Vergleich zum vorigen Kapitel lediglich die Konzentrationen der Kohlenstoffquellen Hefeextrakt und Pepton untersucht, da die besten Individuen aus der GA-Optimierung keinen Zusatz des Phosphatpuffers erforderten. Ein Zusatz von L-Serin und Natriumchlorid zum Kultivierungsmedium sowie Cystein zum Aufschlusspuffer wurde dagegen unverändert übernommen wie auch die kompletten Bedingungen der Kultivierung und der im vorherigen Kapitel beschriebene Aufschluss der Zellen. Die erhaltene Optimiersequenz des Simplex-Algorithmus für fünf Versuchsbedingungen ist in Abb. 4.17 dargestellt.

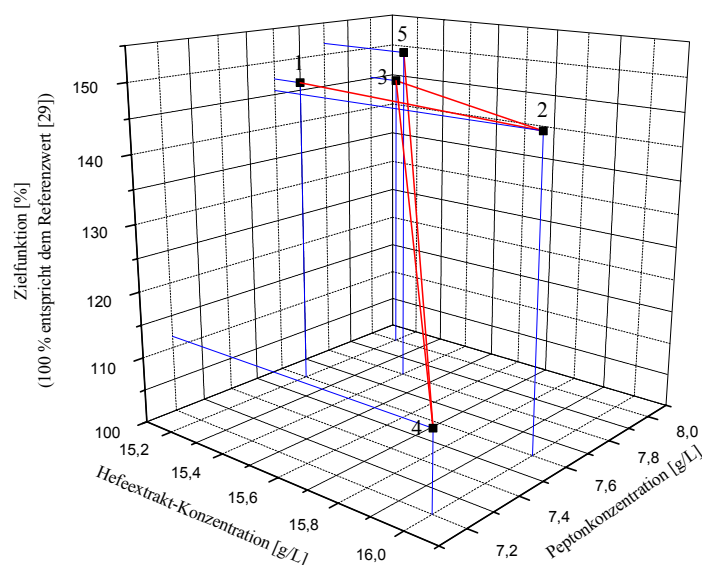


Abb. 4.17: Sequenz der dem GA nachgeschalteten Simplex-Optimierung für fünf durchgeführte Versuche

Um die Endbedingungen der GA-Optimierung (Versuchsbedingung 1) generierte der Simplex-Algorithmus zunächst den Start-Simplex, wobei die Bedingungen 2 und 3 jedoch geringere Antworten bezüglich der Zielfunktion lieferten. Während die Bedingung 4 ein deutliches Absinken des Zielfunktionswertes zeigt, konnte mit einem weiteren Experiment die Gütefunktion auf ein ähnlich hohes Niveau gebracht werden, welche durch die Ausgangsbedingungen definiert waren. Der geringfügig erhöhte Zielfunktionswert der 5. getesteten Nährmediumszusammensetzung unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von den Anfangsbedingungen, die Verbesserung von 147,4 % auf 151,8 % liegt im Bereich des zuvor bestimmten Fehlers von 3 %. In Anbetracht des relativ hohen Versuchsaufwandes, der für die Durchführung eines Optimierschrittes bei Anwendung eines Simplex-Algorithmus notwendig ist – Anzucht der Vorkultur, Kultivierung der Hauptkultur, Aufarbeitung der Zellen – wurde nach dem 5. Versuch die Optimiersequenz beendet. Im Vergleich zur vorigen GA-Optimierung ist damit die deutlich geringere Informationsdichte über den Suchraum in Relation zum etwa vergleichbaren experimentellen Aufwand erkennbar.

4.3.6 Synopsis

Ziel der in diesem Unterkapitel beschriebenen Versuche war, eine Nährmediumsoptimierung des marinen Stammes *Paracoccus seriniphilus* hinsichtlich der Expression einer L-Serindehydratase durchzuführen. Hierzu wurden zwei komplexe Kohlenstoffquellen (Hefeextrakt und Pepton) sowie Kaliumphosphatpuffer jeweils in den vom Genetischen Algorithmus vorgegebenen Verhältnissen den Fermentationskolben steril hinzugefügt und nach erfolgter Kultivierung des Bakteriums für 16 h die Enzymaktivitäten nach dem Zellaufschluss der resultierenden Biomassen detektiert. Insgesamt konnte für diese Bestimmungsmethode ein Fehler von 3 % ermittelt werden und die Zielfunktion, bestehend aus dem Produkt aus maximal erreichter Zelldichte und detektierter Enzymaktivität, im Vergleich zur Referenz um ca. 47 % gesteigert werden. Der dem Genetischen Algorithmus vorgegebene Suchraum hatte eine Größe von 262.144 möglichen Einzelexperimenten. Im Verlauf der Optimiersequenz zeigte sich der nur geringfügige Einfluss des Kaliumphosphatpuffers auf die Zielfunktion, weshalb der Algorithmus in der späteren Optimierphase nur noch mit zwei Variablen operierte. Dieses Ergebnis indiziert zum einen, dass nicht alle Suchraumgrenzen absolut vor der Durchführung bekannt sein müssen. Beispielsweise hätte der Einfluss des zugesetzten Kaliumphosphatpuffers bei geringer konzentrierten optimalen Kohlenstoffquellenzusätzen durchaus stärker ins Gewicht fallen können als der experimentell aufgefundenen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Einstellung der „Generationslücke“ auf den Wert 1 um eine vorausschauende Maßnahme handelte, da sich die Zielfunktionen bei gleicher Nährmediumszusammensetzung und gleichem Aufschluss der Zellen deutliche Unterschiede ergeben, wenn mit neu angesetzten Lösungen weitergearbeitet wurde. Dieser Effekt resultiert durch geringe Variationen in der Sterilisationsprozedur, welche sich jedoch nicht vermeiden lassen. Da somit jeweils nur die aktuelle Generation vom Algorithmus für die Neuberechnung betrachtet wurde, konnten Fehler des Programms, welche durch eine Skalierung über mehrere Generationen aufgetreten wären, komplett ausgeschlossen werden. Die nachgeschaltete, auf zwei Variablen reduzierte, Optimierung mit einem Simplex-Algorithmus lieferte keine weitere signifikante Verbesserung der Zielfunktion.

Das optimierte Medium mit einer Zusammensetzung von 15,4 g/L Hefeextrakt und 7,8 g/L Pepton ist für ein marines Bakterium als „fett“ einzustufen, was vermutlich unter vorher definierten Grenzen bei one-factor-at-a-time-Experimenten nicht aufgefunden worden wäre. Insgesamt ist die resultierende Gesamtsteigerung der vorgegebenen Zielfunktion um fast 50 % sehr positiv zu bewerten.

4.4 Entwicklung eines repetitiv geführten Batch-Verfahrens zur Optimierung von Wachstumsbedingungen

Das Auffinden günstiger Wachstumsbedingungen eines Organismus ist häufig ein mühsamer Weg, bei dem in der Regel die Kapazitäten an Inkubatoren und Fermentern den „Flaschenhals“ darstellen. High-Throughput-Systeme existieren zwar, doch sind sie bislang noch recht kostspielig und somit für die meisten Anwender nicht verfügbar. Sollen jedoch mit Hilfe von Algorithmen Reihenversuche durchgeführt werden, sind Alternativen zu suchen. Das Auffinden geeigneter Wachstumsbedingungen ist besonders bei der Kultivierung mariner Mikroorganismen, die als Produzenten antimikrobiell, cytotoxisch oder antiviral wirksamer Metabolite von Interesse sind, von Bedeutung, da sie häufig sehr geringe Wachstumsraten besitzen und während der Optimierung viele verschiedene Prozessbedingungen und Nährmediumszusammensetzungen zu testen sind. Gegenstand dieses Kapitels ist daher die Entwicklung eines neuartigen Optimierverfahrens, welches eine schnelle Identifizierung der Güte von Prozessparametern zulässt.

4.4.1 Vorüberlegungen zur Kultivierung im repetitiven Batch-Modus

Üblicherweise finden Kultivierungen bzw. Reihenuntersuchungen in Schüttelkolben bei definierten Temperaturen und voreingestellten pH-Werten statt. Schätzungen gehen davon aus, dass weltweit bei über 90 % der durchgeführten Fermentationen Schüttelkolben zum Einsatz kommen [127]. Eine online-Kontrolle der Fermentationsbedingungen ist dabei jedoch, wie bereits in der Einleitung zum Kap. 4 erwähnt, nur mit speziell entwickelten Equipments möglich, wie sie beispielsweise von der Firma Precision Sensing GmbH auf Basis optischer Sensoren für den pH-Wert und die Gelöstsauerstoffkonzentration bzw. von der Firma BlueSens zur Abgasanalytik angeboten werden (vgl. Abb. 4.18). Diese Systeme sind jedoch erst seit kurzem auf dem Markt und müssen sich dementsprechend noch etablieren.

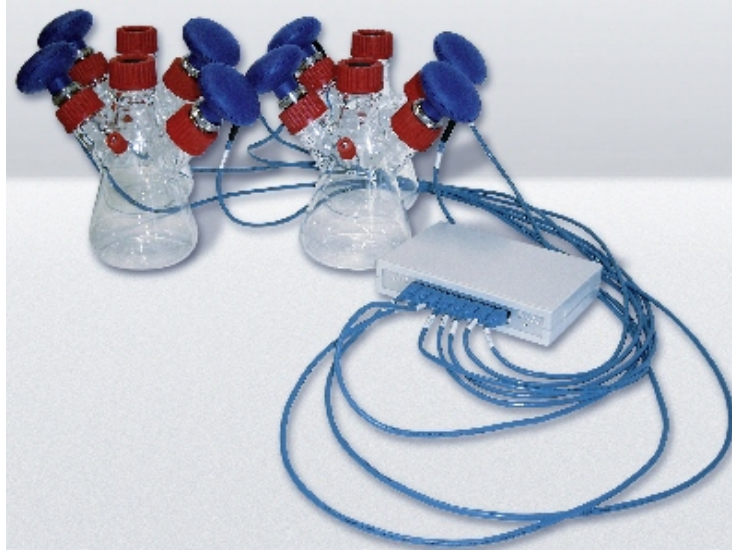


Abb. 4.18: Fermentationskolben mit angekoppelten CO₂- und O₂-Sensoren der Firma BlueSens [84]

Kultivierungen in Schüttelkolben, die im Batch-Verfahren durchgeführt werden, gleichen deshalb in der Regel mehr oder weniger einer „Black-Box“, je nachdem in welchen Zeitintervallen Proben für die offline-Kontrolle entnommen werden. Problematisch kann zudem eine mangelnde Sauerstoffversorgung der zu kultivierenden Spezies im Fermentationskolben sein, da eine Begasung nicht möglich ist und der Phasenübergang des Sauerstoffs allein an der Grenze der Flüssigkeit zur Luft erfolgt. Ebenso hinderlich ist die mangelnde Übertragbarkeit der im Schüttelkolben gewonnenen Ergebnisse auf nachfolgende (industrielle) Prozesse in Fermentern. Aus diesem Grunde bieten sich Fermentationen in (kleinen) Bioreaktoren an, bei denen eine Kontrolle und Regelung der bedeutenden Prozessparameter Temperatur, pH, Begasungsrate sowie die Kopplung an eine Abgasanalytik möglich ist. Problematisch ist hierbei der hohe Anschaffungspreis für solche Systeme und die relativ langen Rüstzeiten, wenn im Batch-Verfahren gearbeitet wird. Die Vor- und Nachteile der Fermentation in Schüttelkolben und Bioreaktoren sind in Abb. 4.19 zusammenfassend aufgeführt.

In der Regel zählen Fermenter unterschiedlicher Volumina zur Ausstattung eines Biotechnikums. Für Versuche zu Beginn eines Projektes sollte jedoch allein schon aufgrund der Kosten auf möglichst kleine Bioreaktoren zurückgegriffen werden, obwohl eine spätere Maßstabsvergrößerung häufig Probleme hinsichtlich des Sauerstoff- oder des Leistungseintrags mit sich bringen kann, wenn beispielsweise Magnetrührkerne zum Mischen der Zellsuspension verwendet werden.

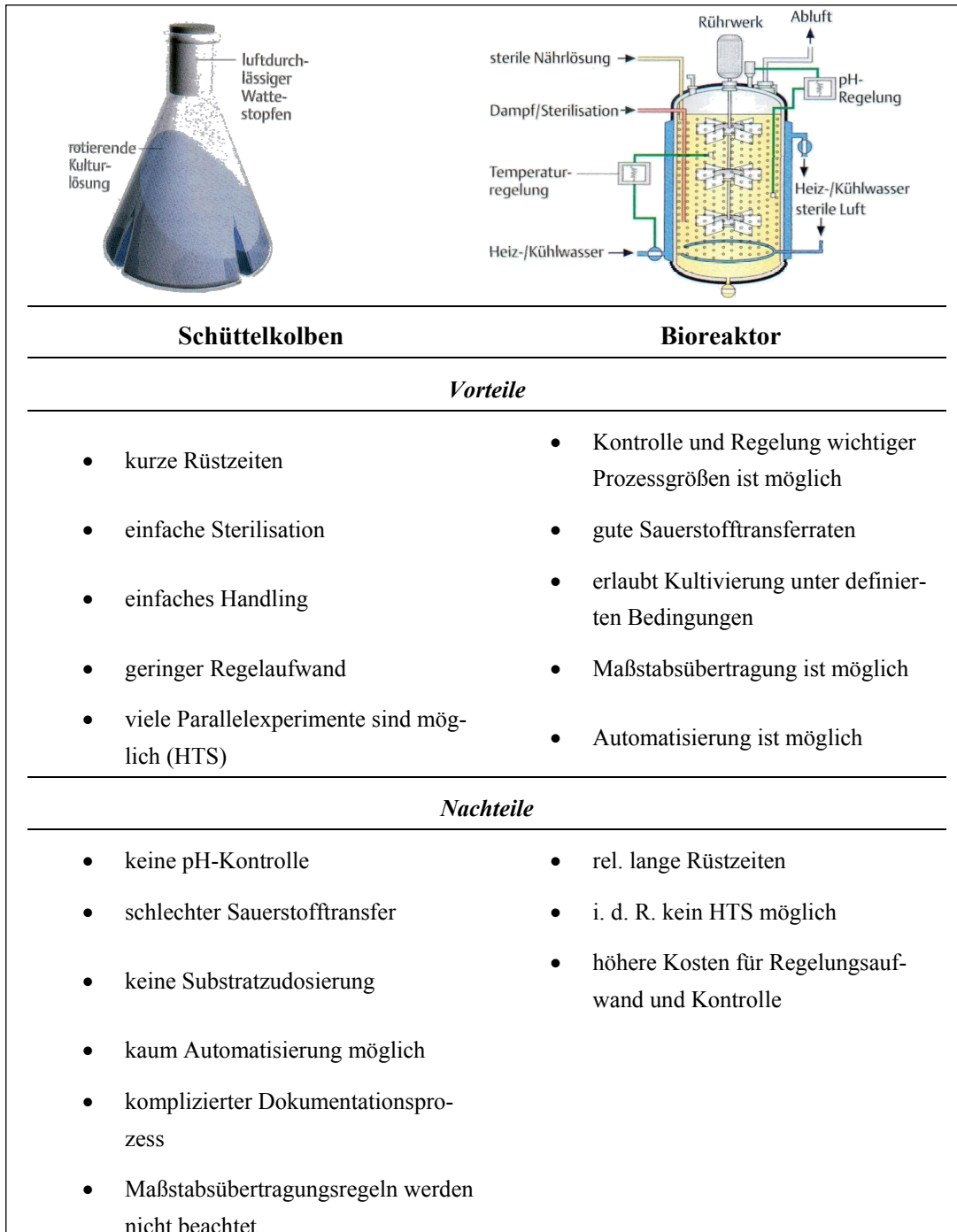


Abb. 4.19: Vergleich von Schüttelkolben und Bioreaktor [128]

Vorteilhaft bei einem Fermentersystem sind die unterschiedlichen Betriebsweisen, welche für den Prozess gewählt werden können. Der Reaktor kann dabei im diskontinuierlichen, kontinuierlichen sowie im repetitiven bzw. repeated-batch Modus eingesetzt werden, wohingegen eine Kultivierung im Schüttelkolben i. d. R. lediglich einen diskontinuierlichen Einsatz erlaubt. Kontinuierliche Prozesse in Fermentationskolben sind zwar prinzipiell möglich [129], doch ist ihr Einsatz bislang wenig

verbreitet. Ein Vergleich der möglichen Betriebsarten von Bioreaktoren – mit Ausnahme des kontinuierlichen Prozesses – ist in Abb. 4.20 dargestellt.

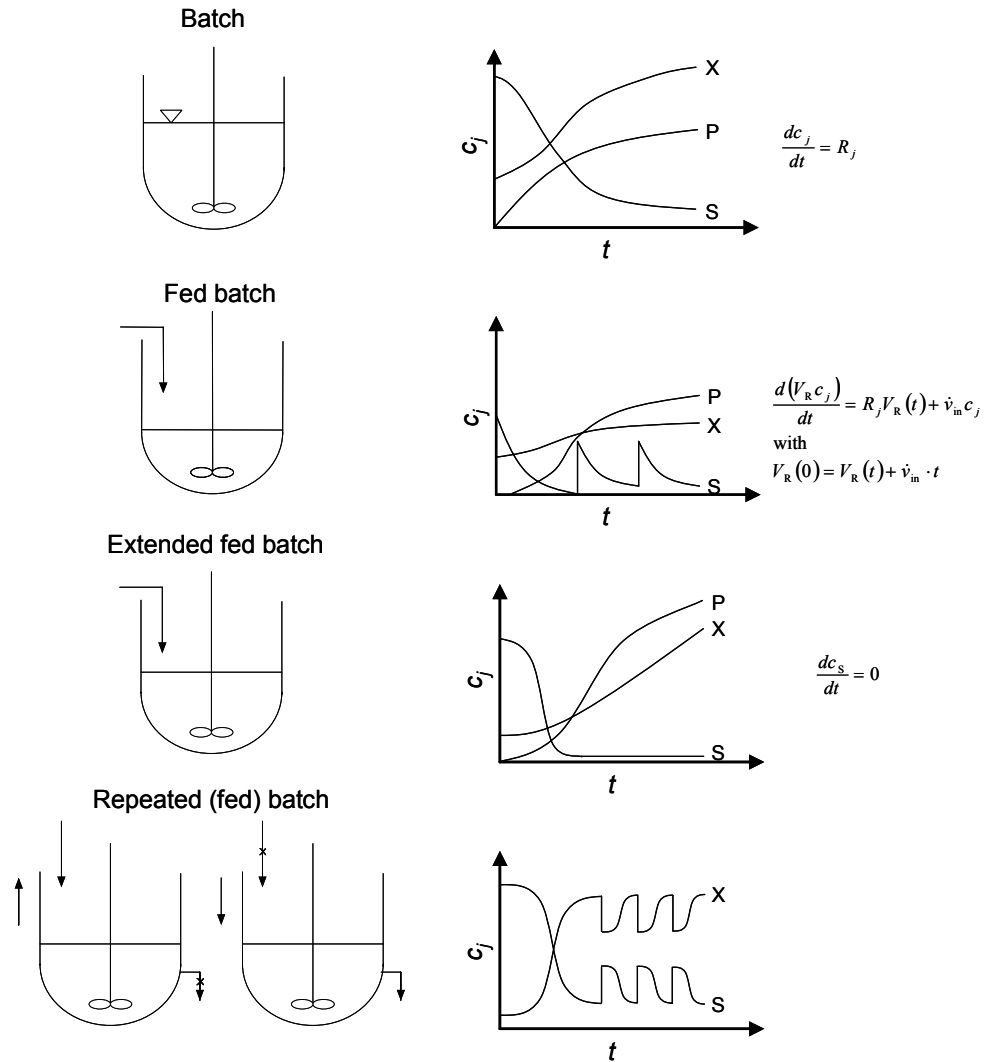


Abb. 4.20: Mögliche dis- und semikontinuierliche Betriebsarten von Bioreaktoren; dabei ist S die Substratkonzentration, X die Biomassekonzentration und P die Produktkonzentration [130]

Als mit Abstand am häufigsten eingesetzte Betriebsart eines Bioreaktors gilt sicherlich der diskontinuierliche Batch-Betrieb. Vorteilhaft ist hier im Gegensatz zu anderen Fermentations-Modi die Flexibilität hinsichtlich verschiedener Produkte, Substrate und Mikroorganismen, hinderlich sind jedoch häufig auftretende Substrat- oder auch Produkthemmungen. Zur Vermeidung von Substrathemmungen und hiermit verbundenem Overflow-Metabolismus bzw. einer katabolischen Repression von Sekundärmetaboliten, kommen häufig Fed-Batch-Verfahren zum Einsatz [131]. Diese erfordern zwar einen deutlich höheren Regelaufwand falls die Zudosierung der Substrate an ein online-Analysensystem gekoppelt ist, jedoch sind mit diesem Verfahren deutlich höhere Ausbeuten erzielbar, bei gleichen Rüstzeiten für den Kultivierungsbetrieb.

Eine Möglichkeit, die Vorteile des Batch- mit dem Fed-Batch-Prozess zu verknüpfen, besteht in der Anwendung einer so genannten Repeated-Batch-Betriebsweise bzw. eines repetitiven Batch-Prozesses bei der nach einem Batch-Zyklus Zellsuspension samt Produkt (das Produkt kann ebenso die gebildete Biomasse darstellen) dem Bioreaktor entnommen wird und anschließend durch Zugabe von sterilem Medium ein neuer Fermentationszyklus beginnt, wobei die zuvor im Reaktor verbliebenen Zellen als Inokulum für den nachfolgenden Zyklus dienen (vgl. Abb. 4.20). Die im Reaktor verbliebene Biomasse berechnet sich damit wie folgt:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t} - v \cdot X_0 \cdot e^{\mu t} \quad (4.10)$$

mit: $X_0 \cdot e^{\mu t}$ = Gesamtbiomasse nach einem Zyklus
 $v \cdot X_0 \cdot e^{\mu t}$ = entfernte Biomasse aus dem Reaktor
 X_0 = Biomasse zum Zeitpunkt t_0

Vorteilhaft ist bei dieser Betriebsweise die im Vergleich zum Batch-Verfahren äquivalente Rüstzeit des Reaktors, da die gesamte Reaktorperipherie (pO₂-Elektrode, pH-Elektrode, Fermenterkessel, etc.) dabei nicht verändert wird. Das zusätzlich benötigte Medium, welches für die repetitiven Zyklen verbraucht wird, kann zum einen mit dem Reaktorsystem zusammen oder separat autoklaviert werden. Sind Mikroorganismen zu kultivieren, die einen Selektionsmarker auf einem Plasmid tragen, so ist das entsprechende Antibiotikum, frisch präpariert, nach der Mediumsaddition für einen neuen Zyklus (sterilfiltriert) hinzuzufügen. In der Anwendung fristet diese Betriebsweise jedoch ein eher „stiefmütterliches“ Dasein, aufgrund der in der Literatur immer wieder genannten Probleme wie beispielsweise [95]:

- die gesamte Mikroorganismenkultur bekommt „Geschichte“, d. h. es können Adaptionen an die vorliegenden Bedingungen stattfinden
- mögliche Mutationen können in späteren Zyklen dominieren
- keine Übertragbarkeit auf kontinuierliche Prozesse.

Sollen unter Anwendung eines Repeated-Batch-Prozesses Optimierungen von Nährmedien oder der Kultivierungsbedingungen vorgenommen werden, ist unbedingt auf die besondere Fähigkeit vieler Mikroorganismen zur Adaption (phänotypische Veränderung) an sich verändernde Umweltbedingungen zu achten bzw. diese Möglichkeit nicht aus dem Blickwinkel bei der Bewertung der durchgeführten Versuche zu verlieren. Die Adaption durch Mutation kann nur im Falle der Fermentation auf Selektivmedien ausgeschlossen werden, da dementsprechende Nachkommen vermutlich durch Exkretion der Selektionsmarker keine entsprechende Vitalität mehr auf den eingesetzten Nährmedien oder den veränderten Kulturbedingungen zeigen. Werden dagegen Optimierungen mit Wildisolaten oder gentechnisch nicht modifizierten Reinkulturen unternommen, können Mutationen nicht ausgeschlossen werden. Durch die im Vergleich zum Batch-Prozess bedeutend längeren Fermentationszeiten steigt zudem das Infektionsrisiko. Unter der Voraussetzung, dass Infektionen durch die Sterilisationsprozesse und der Addition sterilfiltrierter Lösungen sowie des biologischen „Containments“ der Fermen-

teranlage ausgeschlossen werden können, liegt der Fokus auf möglichen genetischen Variationen der zu kultivierenden Organismen, was im Folgenden anhand einer Beispielrechnung abgeschätzt wird.

Die genetische Instabilität bzw. das Auftreten von Mutationen (genotypische Veränderung) ist eine natürliche Erscheinung, die durch eine fehlerhafte Replikation der DNA oder durch eine zuvor erfolgte Modifikation des Erbgutes ausgelöst werden kann. Die Wahrscheinlichkeit für den Austausch eines Basenpaares pro Replikationsschritt beträgt unter natürlichen Bedingungen etwa 10^{-7} - 10^{-11} [80]. Unter der Annahme, dass die durchschnittliche Länge eines Gens ca. 1.000 Basenpaare beträgt, kann von einer Wahrscheinlichkeit für eine Mutation innerhalb eines Gens von 10^{-4} - 10^{-8} ausgegangen werden, wobei die meisten Mutationen letal sind und somit nur ein geringer Anteil zu besser wachsenden / angepassten Nachkommen führt. Erstaunlicherweise sind Mutationsraten für die spontan auftretende Mutation bislang nur von wenigen Organismen bestimmt worden, wobei die Mutationswahrscheinlichkeit des Genoms interessanterweise unabhängig vom Organismus ca. 0,0033 % beträgt [132]. Diese kann aber bei Bedarf (z. B. bei der klassischen Stammoptimierung) durch mutagene Agenzien, Temperaturerhöhung oder energiereiche elektromagnetische Strahlung um ein Vielfaches erhöht werden.

In welchem Umfang ein Repeated-Batch-Prozess sinnvoll durchgeführt werden kann, ohne dass der Gesamtprozess von Mutationen dominiert wird, soll nachfolgend mit Hilfe der folgenden Annahmen abgeschätzt werden:

- die Mutationswahrscheinlichkeit bei der Replikation des Genoms soll $3,3 \cdot 10^{-3}$ % betragen (Literaturwert für die mittlere Mutationswahrscheinlichkeit [132])
- keine Mutation soll letal sein
- nicht-limitiertes Wachstum von Mutante und Ursprungsorganismus.

Des Weiteren werden für die Berechnung drei Grenzfälle betrachtet:

- I. die entstandenen Mutanten können sich nicht vermehren
- II. 1 % der beim ersten Replikationsschritt entstandenen Mutationen weisen eine 1,1-fache Wachstumsrate auf; weitere entstehende Mutationen sind nicht vermehrungsfähig
- III. alle entstehenden Mutationen jedes Replikationsschrittes pflanzen sich mit 1,1-facher Wachstumsrate fort.

Während der erste und der letzte Grenzfall ein eher unwahrscheinliches Ereignis im Fermentationsverlauf repräsentieren, entspricht die zweite Annahme vermutlich mehr der Realität. Die Auswahl des Anteils replikationsfähiger mutierter Zellen und der für die Modellrechnung postulierte Wert für die Wachstumsrate der Mutanten erfolgte dabei auf der Basis von Literaturdaten [133, 134].

Ferner gelten für die Abschätzung folgende Randbedingungen:

- eine Mutation von bereits vorhandenen Mutanten wird ausgeschlossen (beispielsweise Rückmutation, weitere Mutation)
- das Wachstum sowohl des Ursprungsorganismus als auch der exponentiell wachsenden Zellen beginnt nach dem Beimpfen bzw. sofort nach jedem repetitiven Zyklus ohne lag-Phase
- für die sich vermehrenden Zellen (mutiert / nichtmutiert) wird eine Verdopplung der Zellzahl für einen Generationsschritt angenommen:

$$N = N_0 \cdot 2^n \quad (4.11)$$

mit N = Zellzahl nach der Generation n ,
 N_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt t_0 ,
 n = Generationszähler.

Die Berechnung der zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandenen vermehrungsfähigen Mutationen erfolgt durch Anwendung des exponentiellen Wachstumsgesetzes:

$$N_{m,t} = N_{0,m} \cdot e^{1,1 \cdot \mu \cdot (t - t_d)} \quad (4.12)$$

mit $N_{m,t}$ = Anzahl der replikationsfähigen mutierten Zellen zum Zeitpunkt t ,
 $N_{0,m}$ = Anzahl der replikationsfähigen mutierten Zellen nach der ersten Zellteilung des Ursprungsorganismus,
 t_d = Zeit für die Verdopplung des Ursprungsorganismus.

Die Gesamtzahl mutierter Organismen ergibt sich durch Addition der replikationsfähigen Mutanten und der aus der fehlerhaften Verdopplung der DNA der Ursprungsorganismen hervorgegangenen Mutanten.

Der mit Hilfe dieser Annahmen ermittelte rein theoretisch abgeschätzte Anteil der Mutationen im Kulturmedium, wenn das Inokulum komplett homogen ist und das Kulturmedium mit $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL beimpft wurde, ist für die drei Grenzfälle in Abb. 4.21 dargestellt.

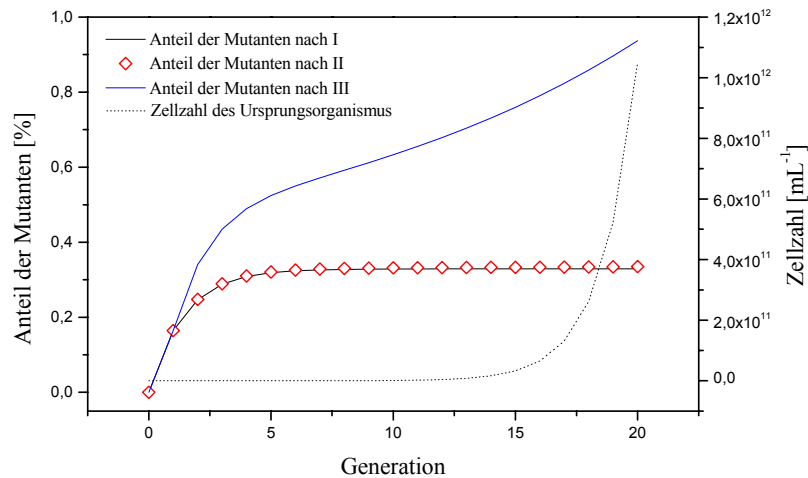


Abb. 4.21: Zellzahl des nichtmutierten Organismus im Verlauf einer Fermentation sowie Gesamtanteil mutierter Zellen im Verlauf einer Kultivierung unter der Annahme, dass I) die entstehenden Mutationen keine Reproduzierbarkeit besitzen, II) sich 1 % der bei der ersten Replikation entstandenen Mutationen exponentiell mit 1,1-facher Wachstumsrate wie die Ursprungskultur fortpflanzt; alle weiteren entstehenden Mutationen sind stoffwechsellinaktiv, III) sich alle entstehenden Mutationen exponentiell mit 1,1-facher Geschwindigkeit wie die Ursprungskultur fortpflanzen

Die Abbildung verdeutlicht, dass ein Einfluss von Mutationen auf die Ursprungskultur – unter den vorgegebenen Annahmen – bei einem Batch-Betrieb eines Fermentationssystems nur bedingt vorhanden ist, da dabei üblicherweise das Wachstum über einen Zeitraum von 20–25 Generationen durchgeführt wird [135]. Bei der theoretischen Betrachtung des Mutationsanteils ist nur im dritten Fall (alle entstehenden Mutationen wachsen mit 1,1-facher Wachstumsrate wie der Ursprungsorganismus) eine erwähnenswerte Steigerung des Mutationsanteils (auf etwa 0,9 %) sichtbar, während die beiden anderen Grenzfälle nach 20 Generationen einen Anteil mutierter Zellen von etwa 0,3 % aufweisen. Eine weiterführende Diskussion dieser Daten muss daher vor dem Hintergrund des Umstiegs auf die Repeated-Batch-Betriebsweise erfolgen, wobei zwei grundsätzliche Ziele verfolgt werden könnten:

- hohe Ausbeute an Produkt (z. B. Biomasse)
- Optimierung von Kultivierungsbedingungen

Zum Erreichen des ersten Ziels würde man pro Kultivierungszyklus die möglichen 20 Generationszyklen durchlaufen, bevor weitere Repeated-Batch-Zyklen folgen. Unter den vorgenommenen Randbedingungen würde sich damit im Grenzfalle III ein Mutationsanteil von 1 % im Fermentationsmedium einstellen, welcher jedoch in weiteren Schritten nicht mehr tolerabel wäre (vgl. Abb. 4.22).

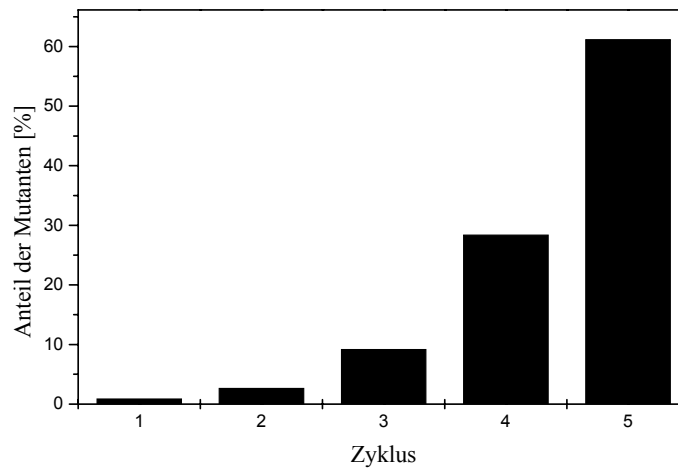


Abb. 4.22: Verlauf des Mutationsanteils bei repetitiver Batch-Fahrweise, wenn jede bei der Zellteilung entstehende Mutation mit 1,1-facher Geschwindigkeit wie der Ursprungsorganismus wächst; im Rahmen eines repetitiven Zyklusses werden dabei 20 Generationszyklen des Organismus durchlaufen

Bereits nach der vierten Generation würde in diesem Falle ein Mutationsanteil von fast einem Drittel bezogen auf die Gesamtzellzahl im Reaktor vorliegen, der sich im nachfolgenden Schritt auf 61 % erhöht. Betrachtet man dagegen die Grenzfälle I und II ebenso über einen Zeitraum von fünf Zyklen so fällt der Mutationsanteil vergleichsweise moderat aus, wie Abb. 4.23 zeigt.

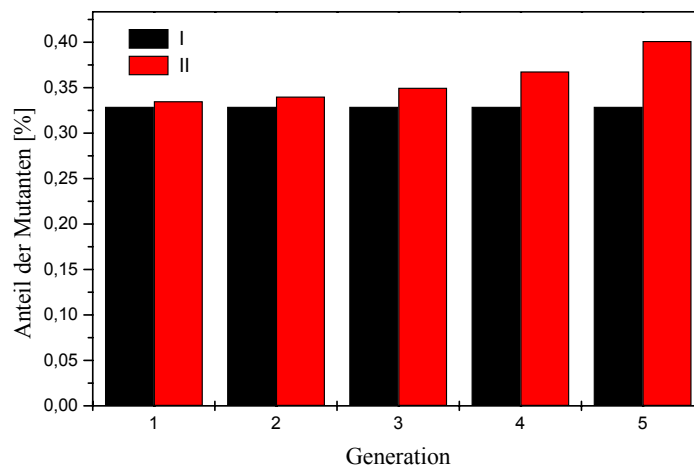


Abb. 4.23: Verlauf des Mutationsanteils bei repetitiver Batch-Fahrweise, wenn I) keine Mutation zur Reproduktion befähigt ist bzw. II) ein Anteil von 1 % der beim ersten Replikationsschritt entstandenen Mutanten mit 1,1-facher wie der Ursprungsorganismus wachsen

Können sich keine Mutanten fortpflanzen, so läuft der Anteil der modifizierten Organismen schon im Verlauf des ersten Zyklus gegen den Grenzwert von 0,33 %, der auch

in nachfolgenden Zyklen konstant bleibt. Ist dagegen von einem Wachstum von 1 % der beim ersten Replikationsschritt entstandenen Mutationen mit 1,1-facher Wachstumsrate auszugehen, nimmt die Gesamtzahl an Mutanten pro Zyklus in etwa um den Faktor 1,86 zu. Von einem bedeutenden Einfluss auf den ursprünglich zu kultivierenden Organismus ist daher bei diesen geringen Anteilen an modifizierten Organismen nicht auszugehen.

Sollen mit Hilfe der Repeated-Batch-Betriebsweise von Bioreaktoren Wachstumsoptimierungen hinsichtlich der Fermentationsbedingungen durchgeführt werden, bieten sich kürzere Zyklen an, die auch beim „worst-case-scenario“ (Grenzfall III) eingesetzt werden könnten. Bei einem durchschnittlichen Wachstum von 4 Generationen über fünf Zyklen hinweg, was einem jeweiligen Anstieg der Zellzahl der unmutierten Organismen von $1 \cdot 10^6$ auf $1,6 \cdot 10^7$ entspricht, würde man auf einen Mutationsanteil kommen, der gleich dem bereits beschriebenen Anteil bei der Batch-Fahrweise nach 20 Generationen ist (ca. 1 %).

Einem Einsatz dieser Betriebsweise sollte nach diesen Vorüberlegungen kein Bedenken hinsichtlich möglicher auftretender genotypischer Variation gegenüberstehen. Während die Grenzfälle I und III sicherlich kaum Relevanz in der Realität haben, sollte man sich eher an Grenzfall II orientieren, da nur die wenigsten Mutationen überhaupt die Fähigkeit zur Reproduktion besitzen und diese höhere Wachstumsraten als der Ursprungsorganismus aufweisen müssten, um überhaupt eine Erhöhung des Anteils modifizierter Organismen zu forcieren. Zudem treten die meisten Mutationen aufgrund der Degeneration des Genetischen Codes kaum in Erscheinung. Somit würde bei dieser Art der Betriebsweise lediglich eine zuvor erfolgte phänotypische Adaption auf zuvor konditionierte Bedingungen den Erfolg der Optimierung negativ beeinflussen („Geschichte der Kultur“), absolut aseptisches Arbeiten vorausgesetzt.

Vorteilhaft ist diese Art der Betriebsweise, wenn modulare Bioreaktorsysteme vorhanden sind, die den parallelen Betrieb mehrerer Reaktoren erlauben, wie beispielsweise das Reaktorsystem Biostat[®]Q (Fa. B. Braun, Melsungen). Mit diesem können vier Reaktoren von 750 mL bzw. 350 mL Füllvolumen gleichzeitig betrieben werden. Durch die Ankopplung eines sterilen Mediumbehälters sowie eines Erntegefäßes für das Entleeren der Reaktoren nach jedem Kultivierungszyklus sind die einzelnen Bioreaktoren sehr einfach auf den repetitiven Batch-Prozess umzurüsten (vgl. Abb. 4.24). Die Verwendung solch eines Reaktorsystems bietet sich insbesondere an, wenn eine hohe Informationsdichte gefordert ist, wie es beispielsweise Genetische Algorithmen bei der parallelen Optimierung erfordern.

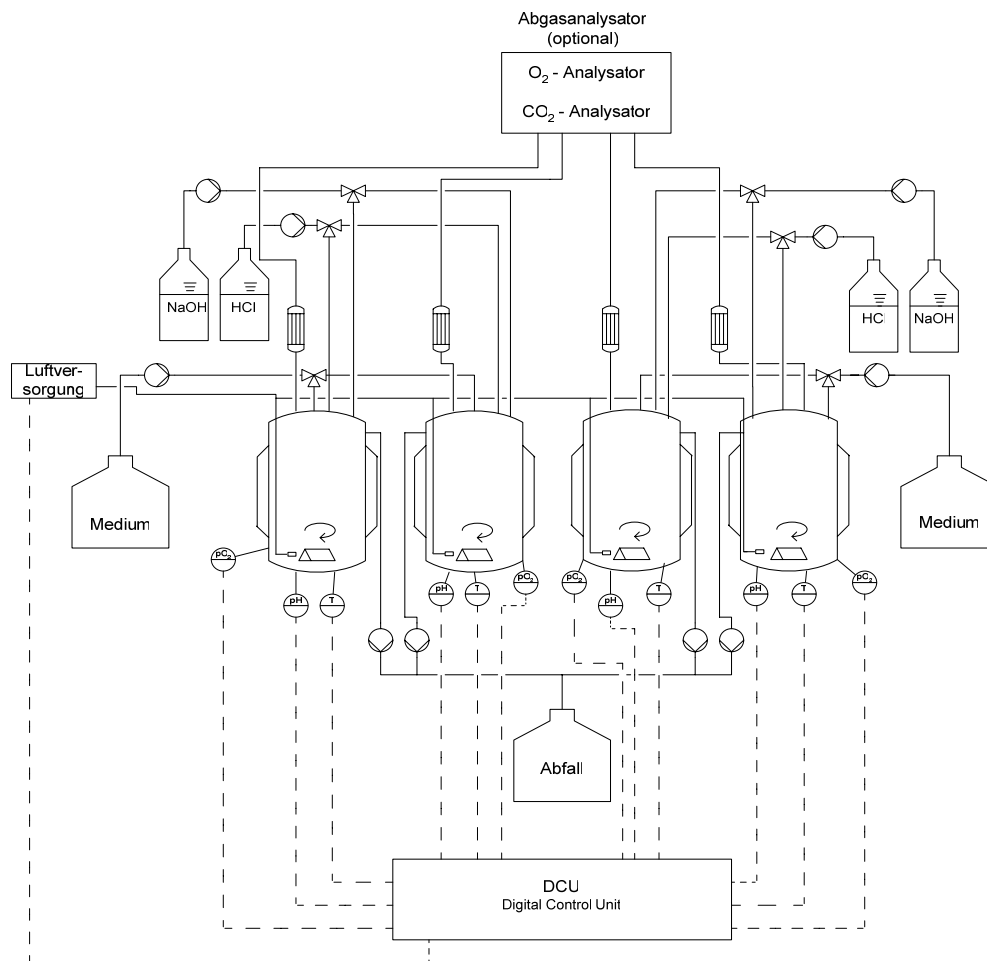


Abb. 4.24: Fermentersystem Biostat[®] Q zur parallelen Kultivierung in vier Bioreaktoren

Im weiteren Verlauf der Arbeit folgen Untersuchungen über den rechnergestützten Einsatz eines repetitiven Batch-Prozesses zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen (pH und T) an einem *E. coli*-Stamm. Nach Verifizierung dieser Ergebnisse wird eine Übertragung auf ein marines Bakterium (*Halomonas marina*) beschrieben.

4.4.2 Repetitiver Batch-Prozess – Stand der Technik

Die sequentiell betriebene Batch-Betriebsweise, auch Repeated-Batch oder repetitive Batch-Betriebsweise genannt, hat in den letzten Jahren eine weite Anwendung erfahren und hat bereits Eingang in klassische Lehrbücher gefunden [136]. Hierbei spielen jedoch in der Regel hauptsächlich solche Verfahren eine Rolle, bei denen Enzyme oder Mikroorganismen als immobilisierte Biokatalysatoren eingesetzt werden. Aufgrund der möglichen Wiedergewinnung wie auch der Wiederverwendbarkeit der Biokatalysatoren wird dabei die Effizienz respektive die Wirtschaftlichkeit des „normalen“ Batch-Prozesses enorm gesteigert. Zudem liegen die Katalysatoren in der Regel stabilisiert vor und zeichnen sich durch gute Raum-Zeit-Ausbeuten aus.

Eine weite Verbreitung hat die Anwendung dieser Betriebsweise zur Kultivierung nativer Zellen bislang nicht erfahren, was zum einen vermutlich an den hohen GMP-konformen Anforderungen industrieller Prozesse und zum anderen an den vorhandenen Bedenken des Experimentators hinsichtlich einer möglichen genetischen Variation der kultivierten Zellpopulation bzw. an dem Risiko Kontaminationskeime in das Medium einzutragen liegen mag. Aus der Sicht des Entwicklers liegen jedoch hinsichtlich der im vorigen Kapitel diskutierten Wahrscheinlichkeit der Mutationen der Fermentation einer Mikroorganismenpopulation keine Beschränkungen für solch eine Betriebsweise – auch für industrielle Anwendungen – vor. Gestützt werden kann diese Aussage durch die in der Literatur nachgewiesene prinzipielle Anwendbarkeit dieses Betriebsmodus. So wurde bereits vor über zwanzig Jahren der Einsatz der flockulierenden Hefe *S. diastaticus* zur Produktion von Ethanol in einem semikontinuierlichen Prozess beschrieben, wobei sich die Zellen nach dem Wachstum und dem Abschalten des Rührwerks innerhalb von 1 min absetzten, der Überstand direkt dekantiert und weiter für die Destillation verwendet wurde [137]. Dieser gesamte Prozess konnte mehr als zehn Mal repetitiv gefahren werden, womit eine hohe Produktivität an Ethanol innerhalb kürzester Zeit erzielt wurde. Schwarz et al. zeigten 1995 für die Gewinnung von Algenbiomasse im Pilotmaßstab von 250 L, dass auch unter unsterilen (allerdings hochselektiven) Bedingungen, ein sequentiell geführter Fed-Batch-Prozess angewendet werden kann, um reproduzierbar Tryptophansynthese aus *Euglena gracilis* zu gewinnen [138].

Von besonderer Relevanz für die Anwendbarkeit auch bei bakteriellen Fermentationen kann eine Publikation zur beschleunigten natürlichen Milchsäureproduktion in der Fermentation bestimmter Süßgräser für die Säuglingsnahrung angesehen werden. Nout berichtet dort von der Anwendung eines Repeated-Batch-Prozesses zur Anreicherung von Milchsäurebakterien und realisierte dabei eine stabile Mischpopulation über einen Zeitraum von 60 Zyklen à 24 h [139].

4.4.3 Parameteroptimierung mittels Simplex-Algorithmus einer *E. coli*-Fermentation

Mit Hilfe eines am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover vorhandenen rekombinanten *Escherichia coli*-Sicherheitsstammes (*E. coli* 5K (pHM12)) sollte die Anwendbarkeit einer repetitiven Batch-Betriebsweise zur Optimierung der Wachstumsrate respektive Kultivierungsbedingungen hinsichtlich pH und Temperatur im Bioreaktor überprüft werden. Die Betriebsweise wurde dahingehend erweitert, dass auch innerhalb eines Zyklus eine Variation der einzustellenden Bedingungen erfolgen kann, sofern eine annähernd konstante Wachstumsrate des Organismus vorliegt. Hiermit sollte überprüft werden, ob sich die im Vergleich zur Batch-Fermentation höhere Informationsdichte noch weiter steigern lässt. In Hinblick auf eine mögliche Automatisierung solch eines Verfahrens wurde für das Optimierproblem ein kommerziell erhältlicher Simplex-Algorithmus (MultiSimplex[®] Lite, Fa. Grabitech Solutions, Schweden) verwendet. Ausgehend von den in der Literatur veröffentlichten optimalen

Wachstumsparametern für *E. coli*-Stämme (40 °C, pH 7,3) [140, 141], wurden im Bioreaktor vom Optimum differierende Bedingungen eingestellt. Anschließend wurde verfolgt, inwiefern das kommerzielle Simplex-Verfahren von diesen Bedingungen zu den publizierten optimalen Daten gelangt.

Vorkulturen des rekombinanten *E. coli*-Stammes wurden auf LB-Medium (vgl. Kap. 6.1.9) in 500 mL Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen und einem Füllvolumen von 100 mL für 16 h bei 37 °C und 120 rpm angezogen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde in den Bioreaktoren (Biostat[®] Q, Fa. B. Braun, Melsungen) eine Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingestellt.

Für die Fermentation der Hauptkultur bzw. der Anwendung der repetitiven Betriebsweise mussten die Fermenter mit einem Substrat-Vorratsgefäß sowie einem Sammelgefäß für die abzulassende Zellsuspension gekoppelt werden. Hierfür wurden je 10 L-Schottflaschen eingesetzt, wobei der Erntebehälter erst nach dem Autoklavieren des Reaktorsystems (inkl. Feed-Behälter) in die Reaktorperipherie integriert wurde. Um zu gewährleisten, dass das Zu- wie auch das Abführen der Zellsuspension für jeden Repeated-Batch-Zyklus nur wenig Zeit in Anspruch nimmt, wurden hierfür jeweils Schlauchquetschpumpen eingesetzt, die das Befüllen und Abpumpen der Zellsuspension in weniger als 1 min ermöglichen.

Die mit LB-Medium befüllten Reaktoren wurden vor dem Prozess mit der angekoppelten Feed-Lösung und den pH-Korrekturmittelflaschen für 20 min bei 121 °C im Dampfautoklaven sterilisiert. Die Supplementierung des Ampicillins erfolgte vor dem Beimpfen bzw. nach dem Neubefüllen mit frischem Medium im Rahmen eines erneut folgenden Batch-Zyklus.

Der Software wurden als Referenzbedingung pH 6 und 30 °C vorgegeben (detailliertere Einstellungen sind dem Anhang Kap. 6.10.1 zu entnehmen). Ausgehend von diesen Daten berechnete die Software zunächst den Startsimplex ($\text{pH}_1 = 5$, $T_1 = 29$ °C; $\text{pH}_2 = 7$, $T_2 = 30$ °C; $\text{pH}_3 = 6$, $T_3 = 31$ °C), dem in der Optimiersequenz insgesamt weitere fünf Schritte – unter Anwendung der variablen Schrittweite des Algorithmus – bis zum Auffinden des Maximums folgten. Die jeweiligen modifizierten Simplex-Anordnungen sind anhand Abb. 4.25 nachzuvollziehen. Eine Doppelbestimmung der Wachstumsraten erfolgte jeweils durch eine simultane Kultivierung in zwei Reaktoren. Während des gesamten Kultivierungsverlaufs wurden die Reaktoren mit 1 vvm steril zugeführter Pressluft bei einer Rührergeschwindigkeit von 400 rpm begast.

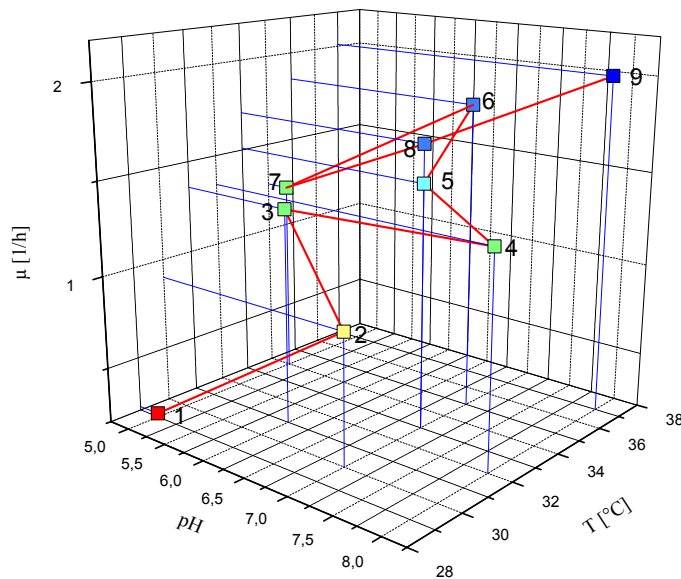


Abb. 4.25: Simplex-Sequenz für die Optimierung der Wachstumsrate von *E. coli* unter Anwendung der kommerziell erhältlichen Software MultiSimplex[®]Lite (im Rahmen der Übersichtlichkeit wurden an dieser Stelle die Fehlerbalken nicht in das Diagramm eingebunden)

Die Abbildung zeigt deutlich, mit welcher Geschwindigkeit der sequentiell arbeitende Simplex-Algorithmus von den Referenzbedingungen zu den optimalen Bedingungen wandert. Insgesamt werden ausgehend von den Startbedingungen lediglich 9 Schritte und acht repetitive Batch-Zyklen benötigt um zum Optimum zu gelangen, womit eine Steigerung der Wachstumsrate, ausgehend vom Mittelwert der Wachstumsraten des Startsimplex, um 243 % erzielt wurde. Dieses Ergebnis veranschaulicht die Stärke der „hill-climbing“-Strategie des Algorithmus, wenn einfache Versuchsräume vorliegen. Allerdings zeigt Abb. 4.25 auch eine Schwäche des Systems auf, die durch die Bestimmungsmethode der Wachstumsrate hervorgerufen wird. Werden die Bedingungen des 5. mit dem 8. Schritt miteinander verglichen, so fällt auf, dass die Wachstumsraten bei identischen Parametereinstellungen um fast 15 % voneinander abweichen. Dieser Fehler in der „biologischen Komponente“ kann zum einen darauf zurückgeführt werden, dass μ_{\max} nicht immer in dem gleichen Abschnitt der Wachstumskurve determiniert wurde, womit die Mikroorganismen möglicherweise in anderen metabolischen bzw. stoffwechselphysiologischen Zuständen verharren könnten, und zum anderen auf die vom Reaktorsystem benötigte Zeit zur Einstellung einer neuen Temperatur, welche im Vergleich zu den kurzen Generationszeiten von *E. coli* als lang angesehen werden kann (vgl. Abb. 4.26). Der Fehler in der Bestimmung der Wachstumsrate wirkt sich jedoch nicht nachteilig auf das System aus, was durch das Versuchsergebnis selbst, aber auch dadurch gezeigt wird, dass der Algorithmus den selben Anstieg und die selben weiteren Werteparameter zur Bestimmung vorgibt, wenn für die Wachstumsrate bei $pH_{5/8}$, $T_{5/8}$ identische Werte eingesetzt werden.

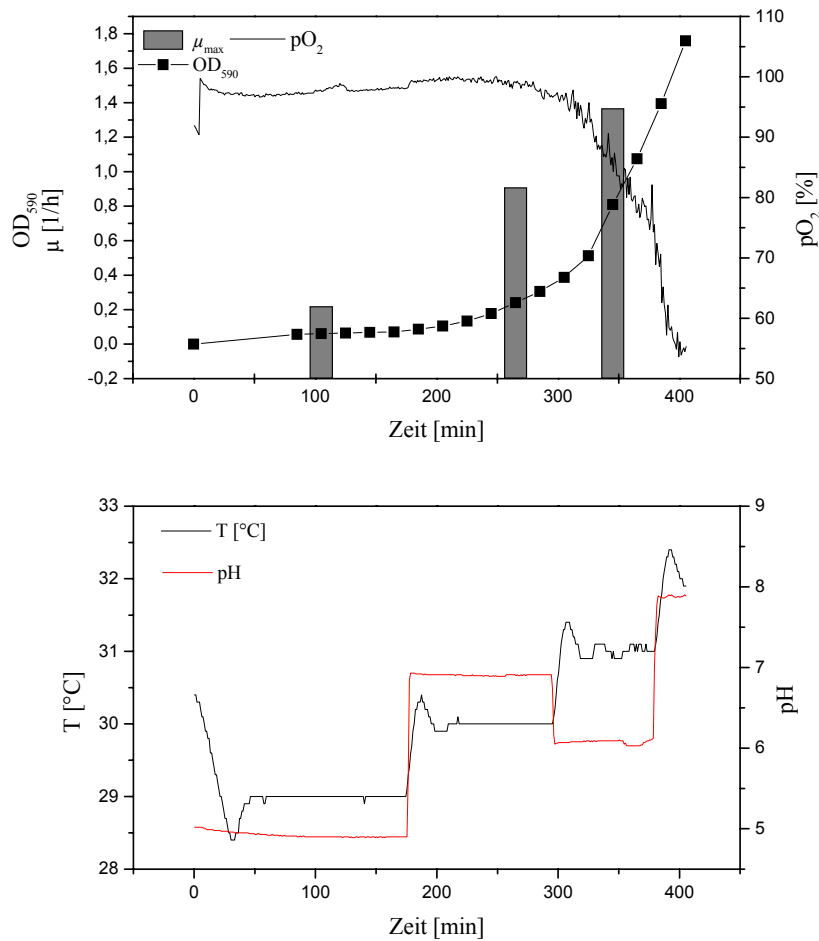


Abb. 4.26: Überblick der Messwerte des Startsimplex, die im Verlauf eines Batch-Prozesses ermittelt wurden

Wie Abb. 4.26 zeigt, werden die maximalen Wachstumsraten erst im Verlauf konstanter Temperaturführung erzielt. Während das Einstellen eines neuen pH-Wertes für das Reaktorsystem ohne Zeitverzögerung auf das biologische System übertragen werden kann, benötigt der Wärmetauscher des Bioreaktors etwa 20 min bis zur Temperaturkonstanz. Dieser Wert liegt bei optimal wachsenden coliformen Bakterien im Rahmen der Generationszeit t_d , weshalb nach Neueinstellung der Temperatur zunächst ein deutlicher Einfluss auf den Zellmetabolismus festzustellen ist. Die Wachstumsrate des Organismus ändert sich in diesem Bereich noch sprunghaft und nähert sich schließlich dem maximalen Wert. Anhand des Verlaufs der Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) können zudem weitere Rückschlüsse auf die Anwendbarkeit dieser Betriebsart gewonnen werden. So sinkt die Sauerstoffkonzentration - bei entsprechender Güte der Bedingungen - bei einer Optischen Dichte von 1,5 auf etwa 50 % des ursprünglichen Gehaltes. Deshalb sollten weiterführende Versuche zur Wachstumsratenoptimierung im Bereich $OD_{590} < 1$ durchgeführt werden, was sich zudem eleganterweise auf das verwendete Reaktorsystem transponieren lässt, da Verdünnungen von 1:10 beim verwendeten Füllvolumen des

Reaktors mit 750 mL ohne deutliche Fehlerbehaftungen durchführbar sind. Zudem liegen die dann zu messenden Zellkonzentrationen innerhalb des unverdünnt messbaren Bereichs, womit kaum Zeitverzögerungen bei der at-line-Bestimmung der Biomasse zu verzeichnen sind. Da bei dem hier beschriebenen Musterversuch eines der am schnellsten wachsenden Organismen verwendet wurde, sollten bei einer Übertragung der Versuchsanordnung auf marine Organismen mit ihren deutlich geringeren Wachstumsraten weder gravierende Probleme hinsichtlich der Verzögerung der einzustellenden Soll-Temperatur noch durch erhöhte Stoffwechselaktivität vorhandene Sauerstofflimitierungen auftreten. Trotz der Tatsache, dass der verwendete Algorithmus in der Lage ist, einen Fehler von 15 % bei der Ermittlung der Wachstumsrate zu verarbeiten, wurde in nachfolgenden Versuchen nur eine (max.) Wachstumsrate pro Zyklus bestimmt.

4.4.4 Optimierung des Wachstums am Beispiel des marinen Bakteriums *Halomonas marina*

Basierend auf den Ergebnissen der repetitiven Batch-Betriebsweise zur Optimierung des Wachstums von *E. coli* in Kapitel 4.4.3 sollten diese Ergebnisse nachfolgend auf einen marinen Organismus übertragen werden, da gerade im Bereich der Blauen Biotechnologie geringe Wachstumsraten einen technischen Einsatz verhindern. Als mariner Testorganismus zur Überprüfung der Anwendbarkeit des Prozesses wurde der bereits in Kap. 3.3.1 beschriebene Mikroorganismus *Halomonas marina* verwendet, welcher positiv in einem Wirkstoffscreening aufgefallen war [75].

Auf eine detaillierte Beschreibung der Prozessführung wird an dieser Stelle verzichtet, sie entspricht der in Kap. 4.4.3 beschriebenen.

4.4.4.1 Anwendung eines Simplex-Algorithmus zur Optimierung der Wachstumsrate

Zur Optimierung der Wachstumsrate in Abhängigkeit von pH und Temperatur wurde im Rahmen der Anwendbarkeit der algorithmenbasierten Optimierstrategie ein am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover erweiterter Algorithmencode für den Simplex nach Nelder und Mead verwendet (vgl. Kap. 6.10.2). Die Verwendung eines in MATLAB[®] implementierten Algorithmus erfolgte hinsichtlich einer möglicherweise in späteren Versuchsstadien folgenden vereinfachten Einbindung in ein vollautomatisch arbeitendes System. Um hierbei weitgehende Freiheit bezüglich der Entwicklungsumgebung zu haben, wurde in den folgenden Arbeitsschritten auf die Verwendung kommerziell zu beziehender Pakete verzichtet.

Im Rahmen dieser Versuche sollte, ausgehend von zwei offensichtlich vom Wachstumsoptimum abweichenden Parametereinstellungen, untersucht werden, inwiefern der eingesetzte Algorithmus dazu in der Lage ist, das biologische System zu einem einheitlichen Optimum zu führen. In der Regel lässt sich die Güte einer Optimierung nur vage oder in Relation zu den bereits durchgeführten Versuchen bewerten, was ein Problem

darstellen kann, sollte sich der verwendete Algorithmus an einem lokalen Optimum festlaufen. Da häufig keinerlei Referenz vorhanden ist, werden diese Daten vermutlich als das Optimum beschrieben, obwohl eine weitere Verbesserung der Zielfunktion durchaus möglich wäre. Da bereits aus den Untersuchungen zur Produktion von Wirkstoffmetaboliten in Kap 3.3.2 Versuche zur Optimierung des Wachstums von *Halomonas marina* durchgeführt wurden, konnten diese vorliegenden Daten mit in die Bewertung der einzelnen Schritte einbezogen werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass im Rahmen einer one-factor-at-a-time-Strategie erhaltene Daten aus Schüttelkolbenversuchen nicht identisch auf ein Bioreaktorsystem übertragen werden können. Aufgrund der unterschiedlichen Geometrie von Reaktor und Schüttelkolben und der voneinander differierenden Leistungseinträge können Fehlinterpretationen/-bewertungen der vom Algorithmus verwendeten Optimierstrategie und des Optimierwegs erfolgen.

Um die Bestimmung der Wachstumsrate möglichst reproduzierbar zu gestalten, konnte auf die Erkenntnisse des vorangegangenen Kapitels zurückgegriffen werden. So wurde die Wachstumsrate innerhalb eines Zyklusses bis zur Konstanz respektive dem jeweiligen Maximalwert verfolgt, anschließend folgte die Einleitung einer neuen Batch-Sequenz, d. h. pro Zyklus wurde ein repräsentativer Wert für μ_{\max} bestimmt. Ferner wurde, um annähernd gleichartige Bedingungen und vergleichbare Bestimmungsmuster anzuwenden, die Wachstumsrate innerhalb eines definierten Biomassekonzentrationsbereichs bestimmt, wobei die Optische Dichte einen Wert von 0,5 nicht überschreiten sollte. Somit war sichergestellt, dass die Mikroorganismen weder einer Substrat- noch einer Sauerstofflimitierung unterliegen. Vorteilhaft dabei war, dass dieses Verfahren eine schnelle at-line-Detektion der Zellkonzentration ermöglichte, da diese ohne vorhergehende Verdünnung direkt photometrisch bei 600 nm durchgeführt werden konnte.

Analog zu den im Kap. 4.4.3 erläuterten erweiterten Aufbau des Biostat[®]Q Fermentersystems wurden die vier Reaktoren mit einem Füllvolumen an MB20+Glu von etwa 750 mL entsprechend der dort beschriebenen Prozedur vorbehandelt. Als Container der Feed-Lösung für die repetitiven Batch-Zyklen wurde für je zwei Reaktoren eine 10 L Schott-Flasche verwendet, welche zusammen mit den Reaktoren autoklaviert wurde. Zur Regelung der vorgegebenen pH-Sollwerte wurde 1 M Salzsäure sowie 1%ige Natronlauge eingesetzt. Die Rührerdrehzahl wurde auf einen Sollwert von 600 rpm eingestellt und für die Begasungsrate mit Pressluft ein Wert von 1 vvm mit Hilfe eines Schwebekörperdurchflussmessers vorgegeben.

Für die Fermentation wurden die Reaktoren mit einer Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL aus einer Vorkultur beimpft. Hierfür wurden 100 mL des MB20+Glu-Mediums in einem 500 mL-Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen verwendet, die mit einer Kolonie beimpft wurden. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 120 rpm und 28 °C im Inkubator (Certomat[®]S, Fa. B. Braun) für 16 h kultiviert.

Als Startbedingungen wurden für den Simplex-Algorithmus $\text{pH} = 6 / T = 22 \text{ °C}$ und $\text{pH} = 6,7 / T = 25 \text{ °C}$ gewählt. Die Kultivierung erfolgte mit Hilfe des Biostat[®]Q-Systems in paralleler Doppelfermentation / Doppelbestimmung. Die Optimiersequenzen

der mittels Doppelbestimmung der OD_{600} -Messungen errechneten Zielfunktion μ_{\max} sind in Abb. 4.27 sowie in Abb. 4.28 dargestellt.

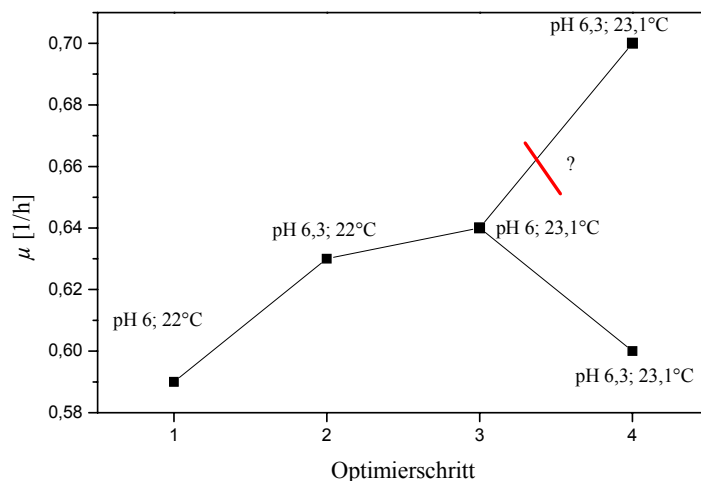


Abb. 4.27: Verlauf der Zielfunktion μ_{\max} für das repetitive Batch-Verfahren am Beispiel *Halomonas marina*; Ausgangsbedingung für den Simplex-Algorithmus: pH = 6 / T = 22 °C

Die Abbildung zeigt, dass nach den durchgeführten Versuchen, welche den Startsimplex bilden, keine weitere Optimierung erzielt werden konnte. Ausgehend von dem dritten bestimmten Wert $pH_3 = 6 / T_3 = 23,1 \text{ °C}$ zu $pH_4 = 6,3 / T_4 = 23,1 \text{ °C}$ sollte, in Relation zu den Ergebnissen aus Kap. 3.3.2, eine Verbesserung von μ_{\max} zu erwarten sein. Im Gegensatz zum Erwartungswert tritt jedoch eine Verschlechterung der Wachstumsrate ein. Aufgrund dieser Fakten wurde diese Optimiersequenz an dieser Stelle terminiert. Bevor dieses Ergebnis eingehend diskutiert werden kann, sind jedoch noch die erhaltenen Daten zu beschreiben, welche ausgehend von dem anderen Referenzpunkt erzielt wurden.

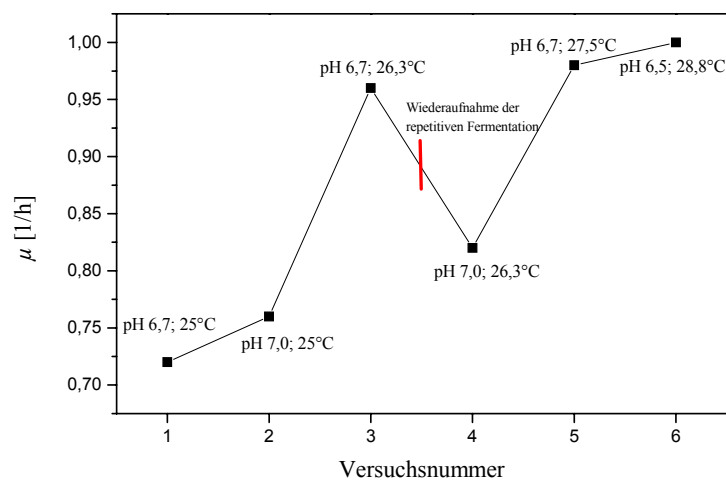


Abb. 4.28: Verlauf der Zielfunktion μ_{\max} für das repetitive Batch-Verfahren am Beispiel *Halomonas marina*; Ausgangsbedingung für den Simplex-Algorithmus: pH = 6,7 / T = 25 °C; ab dem vierten Schritt wurde die Optimierung mit neuer Vorkultur und frisch präpariertem Equipment weiterverfolgt

Basierend auf dem Startsimplex konnte ebenso wie im ersten beschriebenen Versuch (Abb. 4.27) zunächst keine weitere Verbesserung der Wachstumsrate bei der Durchführung des 4. Versuchs nachgewiesen werden. Anhand der vom Algorithmus vorgegebenen Parametereinstellungen, die eine Erhöhung des pH-Werts der Fermentationsbrühe vorgeben, wäre jedoch ein eher konstanter Wert zu erwarten gewesen, wie ein Vergleich mit den erhaltenen Referenzbedingungen aus Kap. 3.3.2 zeigt. Aufgrund dieses Absinkens kalkuliert der Algorithmus in der Sequenz für die folgenden Schritte mit geringeren pH-Werten, während die Temperatur der anzunehmenden Tendenz folgt. Basierend auf den vom Algorithmus vorgeschlagenen Kultivierungsbedingungen für den 7. Schritt wurde von einer weiteren Bearbeitung der Optimiersequenz abgesehen. Als einzustellendes Parameterpaar wären $\text{pH}_7 = 6,2$ sowie $T_7 = 28,8$ °C zu testen gewesen.

Eine Ursache für das in Abb. 4.28 dargestellte Absinken der Wachstumsrate beim Einsatz des komplett neu präparierten Reaktorsystems für die Folgeoptimierung könnte die geringe pH-Variation des Mediums sein. Hierdurch können die Bestandteile des Nährmediums in unterschiedlichen Ladungszuständen existieren, welche unterschiedliche Resorptionskinetiken aufweisen. Des Weiteren können aber auch Änderungen des Fermentationsmediums während des Sterilisationsprozesses den in Abb. 4.28 dargestellten Verlauf bewirken. Eine Abschätzung dieser beiden Einflüsse ist jedoch schwer möglich. Relevant für den beobachteten Effekt könnte zudem die unterschiedliche Kultivierungstemperatur von Vor- und Hauptkultur sein. Die Anzucht des Inokulums für die Fermenter erfolgte bei 28 °C, weshalb eine gewisse Adaption der Bakterien an diese Temperatur anzunehmen ist. Diese Vermutung scheint durch den Anstieg der Wachstumsraten bei den Versuchen 5 und 6 bzw. innerhalb des Startsimplex gestützt zu

werden. Allerdings widerspricht dieser Hypothese, dass innerhalb der jeweils drei durchgeführten Zyklen, die der Mittelwertbestimmung von μ_{\max} für einen Parametersatz dienen, keine Adaption des Bakteriums beobachtet wurde. Diese hätte in einer konsekutiven Steigerung der Wachstumsrate innerhalb dieser Zyklen zum Ausdruck kommen müssen.

Eine fast analoge Tendenz der Optimiersequenz ist beim ersten Versuch beschriebenen Versuch (vgl. Abb. 4.27) zu erkennen. Dort wurde eine Verschlechterung vom dritten Versuch der Optimierung hin zu den eingestellten 4. Parametereinstellungen beobachtet, obwohl anhand der Erfahrungswerte auch dort eine Verbesserung hätte eintreten müssen. Zur Einschätzung der Versuche ist es daher notwendig, zusätzlich auf die online-Daten der Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) zurückzugreifen (vgl. Abb. 4.29).

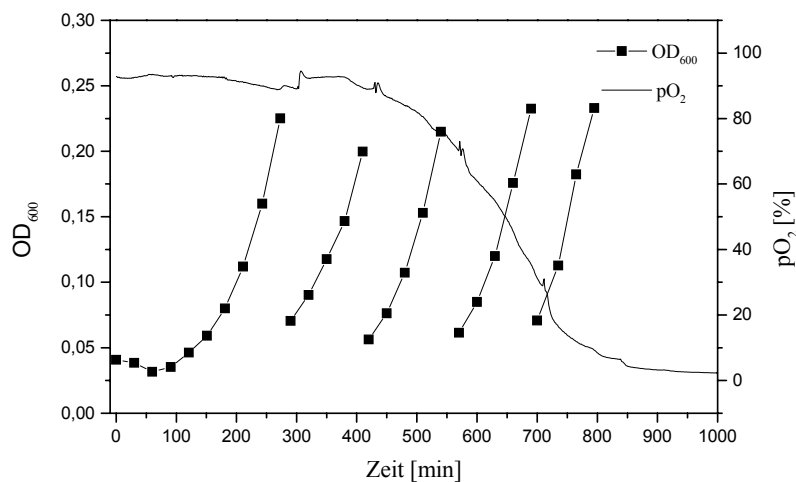


Abb. 4.29: Beispielhafter Verlauf der Optischen Dichte während der repetitiven Batch-Zyklen der Fermentation von *Halomonas marina* sowie der hierbei gemessenen Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) im Reaktor bei den verwendeten Parametereinstellungen

Die Abb. 4.29 zeigt den Verlauf der Optischen Dichten sowie der Gelöstsauerstoffkonzentration, welche mit der bestehenden Peripherie bei der repetitiven Kultivierung von *Halomonas marina* detektiert wurde. Die Darstellung der Biomassekonzentration zeigt, dass jeweils zur Bestimmung der Wachstumsrate ein Zeitraum von etwa zwei Stunden betrachtet wurde. Erwähnenswert ist jedoch insbesondere der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration. Hier ist trotz konstanter Kultivierungsparameter und gleicher Biomassekonzentrationen für jeden Zyklus ein Absinken der Sauerstoffkonzentration gemessen worden, wobei der Kurvenverlauf eine deutliche Analogie zu einem sich exponentiell vermehrenden Bakterium aufweist. Hintergrund dieses mit Hilfe einer Clark-Elektrode nachgewiesenen Reduktion der Sauerstoffkonzentration im Fermentationsmedium ist vermutlich die Bildung eines Biofilms an der Membran der Elektrode, wodurch die Diffusion des Analyten schon nach wenigen repetitiven Kultivierungszyklen unterbunden wird. Ein kompletter Bewuchs der Membran konnte nach Abbruch der

Kultivierungen in beiden Reaktoren eindeutig nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde zusätzlich ein Bewuchs der Glaswand der Fermenter beobachtet.

Eine derartige Ausbildung von Biofilmen mariner Mikroorganismen aufgrund der Expression von Exopolysacchariden wird in der Literatur häufig beschrieben. In der Regel handelt es sich dabei um einen Schutzmechanismus der Organismen, da ein solcher Biofilm ein komplett anderes Mikromillieu (besonders der pH-Werte) darstellen kann als die restliche Umgebung. Im hier betrachteten Fall ist dieses Phänomen unerwünscht und beeinträchtigt einen weiteren Optimiererfolg bzw. ein weiteres positives Voranschreiten des Simplex-Algorithmus in der Optimiersequenz. Aus diesem Grund wurde überlegt, ob alternativ ein Genetischer Algorithmus für die Optimierung der Kultivierungsbedingungen des marinen Bakteriums eingesetzt werden könnte. Dieser würde Versuchsbedingungen vorgeben, welche stochastisch im Raum verteilt sein würden. Durch die dann vorhandene wechselnde Abfolge der Kultivierungsbedingungen sollte die Ausbildung eines Biofilms minimiert werden, da rein statistisch zu Beginn gute mit ungünstigen Bedingungen alternierend zu testen wären und im Optimierverlauf schließlich hauptsächlich günstige Bedingungen vom Algorithmus vorgegeben würden. Diese Annahme lässt sich durch den in Abb. 4.29 dargestellten Verlauf des pO_2 -Wertes stützen, da ein Absinken der „gemessenen“ Gelöstsauerstoffkonzentration innerhalb des 4. repetitiven Zyklus einsetzt. Für eine Optimierung der Kultivierungsparameter mit Hilfe Genetischer Algorithmen sollte daher die Bestimmung von μ_{\max} auf zwei Zyklen beschränkt werden, um die Gefahr einer möglichen Biofilmbildung auf ein Minimum zu reduzieren und somit einem kompletten Scheitern der Optimierstrategie vorzubeugen.

4.4.4.2 Anwendung eines Genetischen Algorithmus zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen von *Halomonas marina*

Aufgrund des Misserfolgs beim Einsatz eines Simplex-Algorithmus zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen unter Anwendung einer repetitiven Batch-Betriebsweise eines Reaktorsystems sollte untersucht werden, inwiefern ein Genetischer Algorithmus in der Lage ist, bei gleich bleibender Betriebsart der Reaktoren eine Optimierung der Zielfunktion zu ermöglichen.

Die Kultivierung der Vorkultur sowie die Vorbereitung der Reaktoren erfolgte analog Kap. 4.4.4.1. Als konstante Versuchsparameter der Fermenterkultivierung wurden für die Begasungsrate 1 vvm (Pressluft) und eine Drehzahl des Magnetrührkerns der Biostat[®]Q-Fermenter von 600 rpm gewählt. Eine Modifikation der Betriebsführung erfolgte dahingehend, dass zur Vermeidung von Adaptionen des marinen Bakteriums an vom GA vorgegebene Bedingungen zur Bestimmung von μ_{\max} jeweils zwei direkt aufeinander folgende Zyklen herangezogen wurden, wobei der hierbei erhaltene Mittelwert als Eingabegröße für die Software diente.

Für die Wahl der Grenzen des von den Variablen pH und Temperatur aufgespannten Suchraums wurden im hier beschriebenen Experiment pH 5–9 bzw. 20–38 °C gewählt. Die weiteren direkt in der Software vorgenommenen Eingaben sind in Tab. 4.7 dargestellt.

Tab. 4.7: Vorgenommene Parameter-Einstellungen innerhalb des GA-Programms (MATLAB®)

Parameter	Wert
max. Generationenzahl	15
Genauigkeit	3
Generation Gap	1
Mutationsrate	0,03
Crossoverrate	0,4
Populationsgröße	4
Gütefunktion	μ_{\max}

Die Wahl der Genauigkeit entspricht der Länge eines Gens. Das bedeutet für den hier dargestellten Fall, dass jede Variable acht (2^3) unterschiedliche Werte einnehmen kann und insgesamt ein Suchraum von 64 möglichen Einzelexperimenten aufgespannt wird. Ein solcher Suchraum könnte üblicherweise recht schnell mittels one-factor-at-a-time Experimenten überprüft werden. Aus diesem Grunde wird an dieser Stelle nochmals auf den Modellcharakter des Verfahrens hingewiesen, wodurch die generelle Anwendbarkeit der Fermenter-Betriebsart für rechnergestützte Optimierungen des Wachstums mariner Bakterien überprüft werden sollte. Die Wahl der Populationsgröße orientierte sich an den vier verfügbaren Bioreaktoren des Systems, womit die parallele Untersuchung der zunächst durchzuführenden Versuche der Startgeneration gewährleistet werden konnte. Der Verlauf der Zielfunktion und μ_{\max} für den besten Wert der Generation sowie der Mittelwert der jeweils pro Generation zu testenden Bedingungen sind in Abb. 4.30 illustriert. Eine Auflistung der für die Start- sowie die Endgeneration von der Software vorgegebenen Parametereinstellungen sowie der damit erhaltenen Zielfunktion ist in Tab. 4.8 dargestellt.

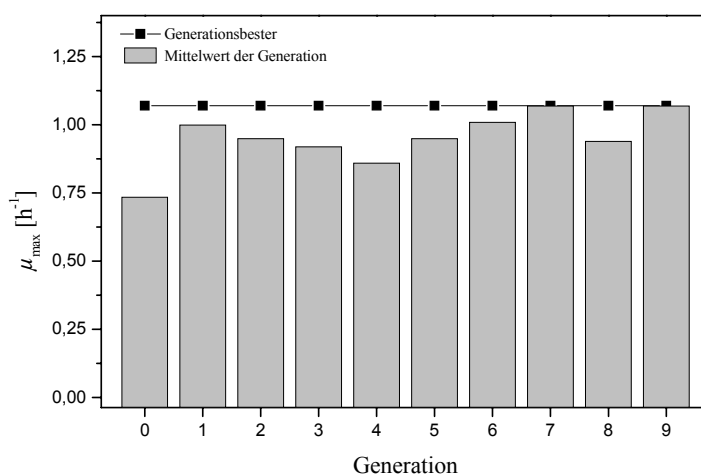


Abb. 4.30: Verlauf der Zielfunktion (μ_{\max}) für den Generationsbesten sowie des Mittelwerts der Generation für die Optimiersequenz

Tab. 4.8: Parametereinstellungen und die jeweils erzielte maximale Wachstumsrate der Start- und Endgeneration

Individuum	T [°C]	pH	μ [h ⁻¹]
1 (Gen. 0)	32,9	7,3	1,07
2 (Gen. 0)	27,7	7,3	0,79
3 (Gen. 0)	35,4	5,6	0,59
4 (Gen. 0)	22,6	6,7	0,49
1 (Gen. 7/9)	32,9	7,3	1,07
2 (Gen. 7/9)	32,9	7,3	1,07
3 (Gen. 7/9)	32,9	7,3	1,07
4 (Gen. 7/9)	32,9	7,3	1,07

Der Verlauf der Mittelwerte einer Population (vgl. Abb. 4.30) zeigt, wie die einzelnen Parametereinstellungen innerhalb einer Generation über einen Zeitraum von sieben Generationen zu dem bereits in der Startgeneration vorhandenen Wertepaar pH = 7,3 und T = 32,9 °C konvergieren. Aufgrund seiner Güte hat dieses Wertepaar im weiteren Verlauf der Optimiersequenz eine Reproduktion in jede Folgegeneration erfahren. Dies kommt durch den während der gesamten Optimierung konstanten Wert des Generationsbesten zum Ausdruck. Die komplette Konvergenz ist dabei auch das Ergebnis der sehr kurzen Chromosomen der einzelnen Individuen. Durch die geringe Länge eines Binarstrangs ist dem Crossover-Operator nur ein geringer Spielraum zur Generierung neuer Versuchsparameter vorgegeben. Die Wirkung des Mutationsoperators wird ersichtlich beim Betrachten der Ergebnisse für die achte Generation: da innerhalb der siebten Generation eine totale Konvergenz vorliegt, führen jegliche Crossover zum identischen, vor der Ausführung der Operation vorhandenen Individuum; durch eine Mutation versucht der Algorithmus eine Konvergenz zu verhindern, welche jedoch durch den vorhandenen Datensatz und den hiermit erzielten Wachstumsraten unvermeidbar wird. Daher wurde von einer Fortführung der Optimierung nach der Durchführung der Versuche der 9. Generation abgesehen und der Algorithmus terminiert. Insgesamt wurden mit dieser Methode bis zur Konvergenz 12,5 % bzw. bis zur zweiten Konvergenzerscheinung 14,1 % des Suchraums getestet.

Während die Optimierung des Wachstums von *Halomonas marina* mit Hilfe des Simplex-Algorithmus aufgrund der Biofilmbildung scheiterte, konnte unter Anwendung des Genetischen Algorithmus diese Komplikation vermieden werden. So resultierte während des gesamten Versuchszeitraums nur ein sehr geringer Bewuchs der Reaktorwände wie auch der Membran der pO₂-Elektrode. Die Werte für die Gelöstsauerstoffkonzentration lagen dabei während der gesamten Versuchsdauer bei annähernd 100 %, weshalb auf eine explizite Darstellung dieser Daten verzichtet wurde. Die Verminderung der Biofilmbildung ist jedoch weniger eine Ursache des Softwarepakets, sondern darauf zurückzuführen, dass für die Mehrfachbestimmung von μ_{\max} eine Re-

duktion der Zyklusintervalle von drei auf zwei vorgenommen wurde. Durch diese Maßnahme kann eine Anpassung der Mikroorganismen an die vorgegebenen Bedingungen deutlich reduziert werden. Vorteilhaft an der Arbeitsweise des Genetischen Algorithmus ist zudem, dass im Vergleich zum Simplex-Algorithmus eine größere Veränderung zwischen zwei durchzuführenden Untersuchungen auftritt. Sollten in einem Optimierprozess zwischenzeitlich ungünstige Wachstumsbedingungen vorliegen, ist die Wahrscheinlichkeit beim GA größer, dass beim darauf folgenden Schritt bessere Konditionen vorgegeben werden, während die „hill-climbing“-Strategie des Simplex bei ungünstigen Bedingungen häufig ein kaum zu verhinderndes „Festlaufen“ des Algorithmus auslöst.

Von Bedeutung für die Reproduzierbarkeit dieses Optimierungsmodells ist die Ermittlung des Fehlers von μ_{\max} . Anhand einer über fünf Zyklen durchgeführten Bestimmung der maximalen Wachstumsrate konnte μ_{\max} ein Fehler von etwa 2 % zugeordnet werden. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass dieser geringe Fehler nur zu verwirklichen ist, wenn die Einstellung der regelbaren Parameter nur ein kurzes Zeitintervall in Anspruch nimmt, d. h. die hierfür benötigte Zeit sollte deutlich kürzer als die Generationszeit des Organismus sein. Des Weiteren dürfen nur Wachstumsraten miteinander verglichen werden, die bei ähnlichen Zellmassekonzentrationen ermittelt wurden.

Aufgrund der vom verwendeten Genetischen Algorithmus dargestellten Konvergenz müssten für eine weitere Optimierung (falls dies überhaupt noch möglich ist) eine Vielzahl von Generationen getestet werden, damit durch den Mutationsoperator überhaupt die Möglichkeit besteht, neue Versuchparameter einbringen zu können. Eine gezieltere Methode besteht in dem Ansatz, dass basierend auf den durch die Konvergenz bereitgestellten Daten des GA, diese Werte als Referenz für einen Simplex-Algorithmus dienen können. Inwiefern anhand dieser Kombination für die Wachstumsoptimierung ein Fortschritt erzielt werden kann, wird Gegenstand des folgenden Kapitels sein.

4.4.4.3 Folgeoptimierung mit einem Simplex-Algorithmus

Im Folgenden wird beschrieben, inwiefern das mit Hilfe des im vorigen Kapitel genutzten GA aufgefundene Optimum unter nachfolgender Anwendung eines Simplex-Algorithmus weiter verbessert werden kann. Zu diesem Zweck wurde der in Kap. 6.10.2 angegebene in MATLAB[®] implementierte Simplex-Algorithmus mit variabler Schrittweite verwendet, der in Kooperation mit Dr. Dörte Solle entwickelt wurde [142]. Als Referenzpunkt diente der Software die Konvergenzbedingung aus der GA Optimierung (pH 7,3, 32,9 °C).

Für die Betriebsweise der Reaktoren wurde die in Kap 4.4.4.2 beschriebene Technik aufgrund der überzeugenden Reproduzierbarkeit übernommen. Als konstante Kultivierungsparameter wurde eine Rührerdrehzahl von 600 rpm und eine Begasungsrate von 1 vvm an der DCU (Digital Controlling Unit) des Fermentersystems voreingestellt. Das Handling der Vorkultur erfolgte wie das ebenda beschriebene.

Der Verlauf der ersten fünf Schritte dieses nachgeschalteten Simplex-Verfahrens ist in Abb. 4.31 dargestellt.

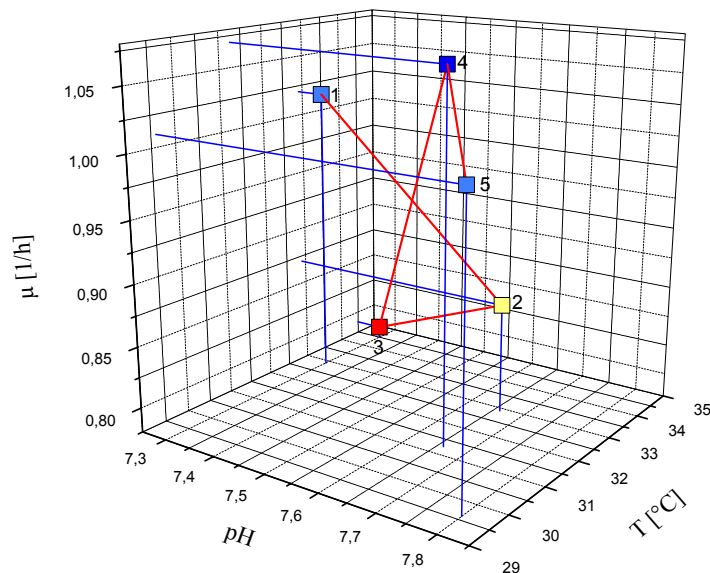


Abb. 4.31: Simplex-Sequenz der weiteren Optimierung der Wachstumsrate

Wie der Abb. 4.31 zu entnehmen ist, konnte im Vergleich zur Referenzbedingung (1) eine weitere Verbesserung der Zielfunktion erreicht werden. Die Durchführung der Kultivierungen zur Bestimmung der Wachstumsraten für die 5. Bedingung zeigten ein Absinken der Wachstumsrate, weshalb die Sequenz an dieser Stelle abgebrochen wurde, zumal nach einem Vergleich mit den im Wirkstoffscreening erhaltenen Daten in etwa das Wachstumsoptimum erreicht war. Auffällig erscheint, dass μ_{\max} der ersten zu testenden Bedingung geringer ausfällt als die unter gleichen Bedingungen erhaltene aus dem vorigen Kapitel. Dieser Fehler von etwa 4,6 % ist jedoch aufgrund der komplexen Nährmedienbestandteile bzw. hinsichtlich des Autoklavierverfahrens nicht zu verhindern und muss toleriert werden. Dies wirkt sich jedoch nicht auf den Messfehler aus, der unter Anwendung der repetitiven Betriebsweise von der Methodik und dem biologischen System vorgegeben wird, wobei dieser mit 2 % für ein biologisches System als minimal einzustufen ist. Die hier präsentierte weitere Optimierung lieferte innerhalb der ersten vier Versuche eine Verbesserung der Wachstumsrate von 1,02 auf 1,07, was einer Steigerung von etwa 5 % entspricht. Dieser Wert liegt somit außerhalb des Fehlerbereichs und kann als signifikant eingestuft werden.

4.4.5 Synopsis

Anhand einer Modellrechnung konnte der Einfluss von Mutationen auf einen repetitiv betriebenen Batch-Betrieb eines Fermentersystems dokumentiert werden. Hierdurch wurde deutlich, dass bei einer üblicherweise vorhandenen Mutationsrate von 0,0033 pro Replikation des Genoms, unter den in der Regel eingesetzten Kultivierungsbedingungen, kaum Auswirkungen auf den Gesamtprozess zu erwarten sind. Daher können lediglich Änderungen im Phänotyp sowie einer hierdurch vermittelten Adaption der zu kultivierenden Spezies zu einer Behinderung führen. Dies ist insbesondere im Falle der Anwendung solch eines Betriebsmodus zu beachten, wenn zwischen den einzelnen Kultivierungszyklen die Versuchsbedingungen verändert werden.

Basierend auf der Anwendung eines Modellverfahrens, bei dem ein *E. coli* K5 (pHM12)-Sicherheitsstamm repetitiv kultiviert wurde, konnte gezeigt werden, dass eine Adaption des Bakteriums unter den vorgegebenen Parametereinstellungen nicht vorlag. Die kombinierte Modelloptimierung mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Simplex-Software MultiSimplex[®] Lite führte innerhalb weniger Schritte zum in der Literatur beschriebenen Wachstumsoptimum. Ausgehend von der Referenzbedingung $\text{pH} = 6 / T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Optimiersequenz innerhalb von neun durchzuführenden Einzelversuchen abgeschlossen und die optimalen Bedingungen $\text{pH} = 8$ und $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ erreicht. Der Messfehler von μ_{\max} lag aufgrund der noch nicht eindeutig definierten Bereiche der Zellmassekonzentration, in welchen diese Methode eine erhöhte Validität zulässt, bei etwa 15 %. Für nachfolgende Versuche wurde zudem empfohlen, jeweils pro repetitiven Zyklus nur eine Bedingung zu testen.

Die Übertragung dieser Betriebsweise auf das marine Bakterium *Halomonas marina* scheiterte zunächst, da ausgehend von ungünstigen Wachstumsbedingungen ein Biofilm gebildet wurde, der eine Optimierung durch die entstandenen Zellagglomerationen verhinderte. Aus diesem Grund wurde der Simplex-Algorithmus gegen einen Genetischen Algorithmus ausgetauscht und untersucht, inwiefern sich die komplett andere Arbeitsweise des Optimierverfahrens auf den Prozess auswirkt. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass mit einer Reduktion der zur Bestimmung der Wachstumsrate herangezogenen Zyklen von drei auf zwei sowie der Eingrenzung des zur Berechnung von μ herangezogenen Biomassebereichs ($\text{OD}_{600} < 0,25$) eine Minimierung des Fehlers von μ_{\max} (auf 2 %) möglich ist. Zudem wirkten sich vermutlich die alternierenden Einstellungen bzw. die größeren Schrittweiten negativ auf die Biofilmbildung aus. Die unter Anwendung des Genetischen Algorithmus ermittelten optimalen Werte der Wachstumsrate konnten bei einem pH-Wert von 7,3 und einer Temperatur von 32,9 °C ermittelt werden.

Unter Anwendung eines Simplex-Verfahrens konnte die vom GA ermittelte Parametereinstellung weiter verbessert und μ_{\max} um weitere 5 % gesteigert werden.

Die beschriebenen Versuche zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, mit Hilfe einer computergestützten repetitiv geführten Betriebsweise das Auffinden des Wachstumsoptimums mariner Bakterien zu gewährleisten. Die hier beschriebene Kombination der beiden Algorithmen leistet dabei eine wertvolle Unterstützung im Suchprozess. Aller-

dings handelt es sich bislang nur um eine Modellstudie, weshalb weitere marine Mikroorganismen zur Validierung dieser Methode zu untersuchen sind.

Die besondere Bedeutung dieses Prozesses liegt sicherlich im geringen Zeitbedarf, der zur Bestimmung der Güte von Wachstumskriterien notwendig ist. Für einen repetitiv geführten Batch-Zyklus war für die Bestimmung der Wachstumsrate pro Versuch ein Zeitraum von etwa 120 min notwendig. Im Vergleich zur üblicherweise angewandten Methode, welche eine Betrachtung des gesamten Prozesses voraussetzt, ist dies eine Reduktion der notwendigen Zeit um den Faktor 10. Letztendlich ist die minimal mögliche Bestimmungszeit jedoch an die bei den vorgegebenen Bedingungen vorhandene Wachstumsrate des Organismus gekoppelt.

4.5 Enzymatische Halogenierung

Die gezielte Einführung von Halogenatomen in organische Verbindungen ist in der Regel nur schwer durchzuführen. Üblicherweise kommen dabei reaktive, toxische Halogenierungsreagenzien wie Thionylchloride oder Sulfurylhalogenide zum Einsatz, wobei eine Vielzahl von Nebenprodukten gebildet wird. Mit der Entdeckung halogenierender Enzyme stehen auch auf diesem Gebiet chemischer Reaktionen biologische Äquivalente zur Verfügung, die zudem eine regioselektive Halogenierung erlauben, wobei an Stelle der toxischen Halogenierungsmittel die unbedenklichen Halogenidionen treten.

Basierend auf dem Potential, welches halogenierende Enzyme im Bereich der Weißen Biotechnologie bieten, soll in diesem Kapitel exemplarisch die Aufreinigung einer rekombinant produzierten Tryptophan-5-Halogenase beschrieben werden. Des Weiteren wird die rechnergestützte Optimierung eines Aktivitätstests für das Enzym erläutert.

4.5.1 Halogenierende Enzyme in der Übersicht

Das Vorkommen halogenerter organischer Metabolite ist als ubiquitär zu bezeichnen. Waren bis 1961 lediglich 29 Organohalometabolite beschrieben, stieg deren Zahl inzwischen auf mehr als 4.000 an [143, 144]. Als besondere Quelle solcher Halometabolite sind marine Habitate zu erwähnen, die in der Regel bromierte Metabolite generieren. Terrestrische Halometabolite sind dagegen üblicherweise in der chlorierten Form vorzufinden, was auf die vergleichsweise hohe Konzentration von Bromid-Ionen im Meerwasser zurückzuführen ist. Iodierte bzw. fluorierte Verbindungen kommen dagegen nur in vergleichsweise geringer Anzahl vor. Bis zum Jahr 2005 waren 2.320 natürlich vorkommende Chlor-, 2.050 Brom-, 115 Iod- und 34 Fluorverbindungen dokumentiert [145]. Für die Pharmabranche interessant ist das Phänomen, dass die biologische Aktivität eines Naturstoffes oftmals mit dem Vorhandensein von Halogenatomen korreliert [146]. Zwei natürlich vorkommende Organohalometabolite sind in Abb. 4.32 aufgeführt.

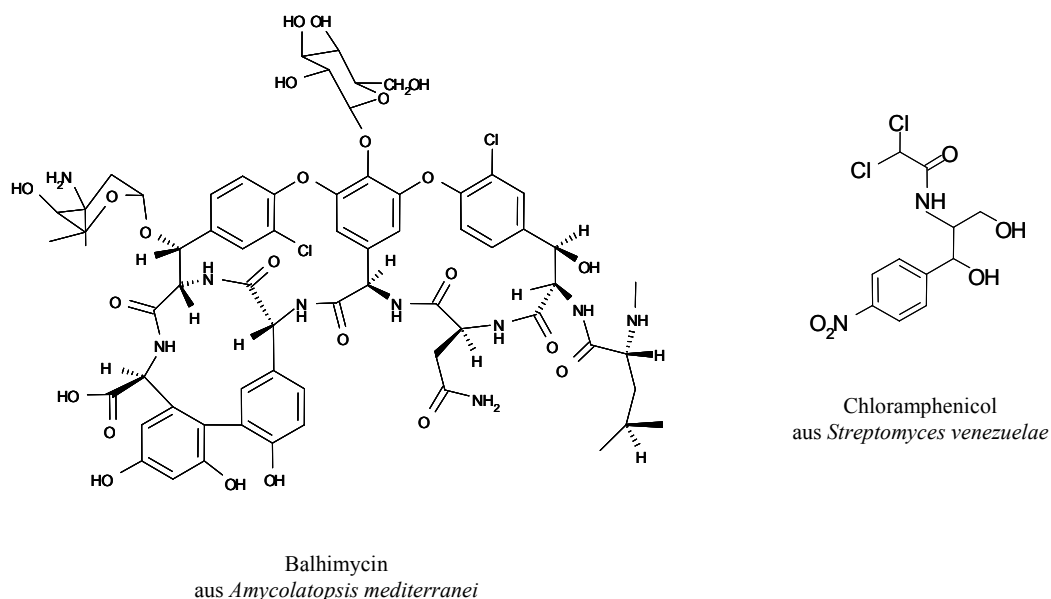


Abb. 4.32: Strukturformeln zweier natürlich vorkommender Halometabolite mit antimikrobieller Wirksamkeit

Die Entstehung halogener Verbindungen kann unter natürlichen Umweltbedingungen beispielsweise durch freie Halogenmoleküle, die durch Oxidation von Salzwassertröpfchen mit Ozon über der Meeresoberfläche und nachfolgender Reaktion mit organischen Substanzen gebildet werden bzw. über biogene Reaktionswege erfolgen, welche das Vorhandensein von Enzymen voraussetzen. Solche Enzyme, die eine Einführung von Halogenatomen in Substrate erlauben, lassen sich wie folgt klassifizieren [147]:

- Haloperoxidasen
- Methyl-Transferasen
- Fluorinasen
- FADH₂-abhängige Halogenasen

Die Haloperoxidasen bilden dabei die am längsten bekannte Gruppe halogenierender Enzyme. 1959 wurde von Shaw und Hager bei Untersuchungen zur Synthese des Caldariomycins eine Chlorperoxidase aus dem marinen Pilz *Caldariomyces fumago* beschrieben [148]. Ob das Enzym jedoch an der Biosynthese des Naturstoffs beteiligt ist, konnte bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden [149]. Haloperoxidasen benötigen für die Halogenierungsreaktion eines organischen Substrates Wasserstoffperoxid sowie ein Halogenid-Ion (Chlorid, Bromid oder Iodid). Verantwortlich für die Halogenierungsreaktion ist das im Reaktionsverlauf (vgl. Abb. 4.33) auftretende frei diffundierende Hypohalogenit, wodurch weder eine Substratspezifität noch eine Regioselektivität des Enzyms vorliegt [150, 151]. Dabei ist der Typ der Haloperoxidase, eine Untereinteilung kann in Häm-, Vanadium-haltige bzw. Häm- und Metallionenunabhängige Enzyme (Perhydroxidasen) vorgenommen werden, irrelevant.

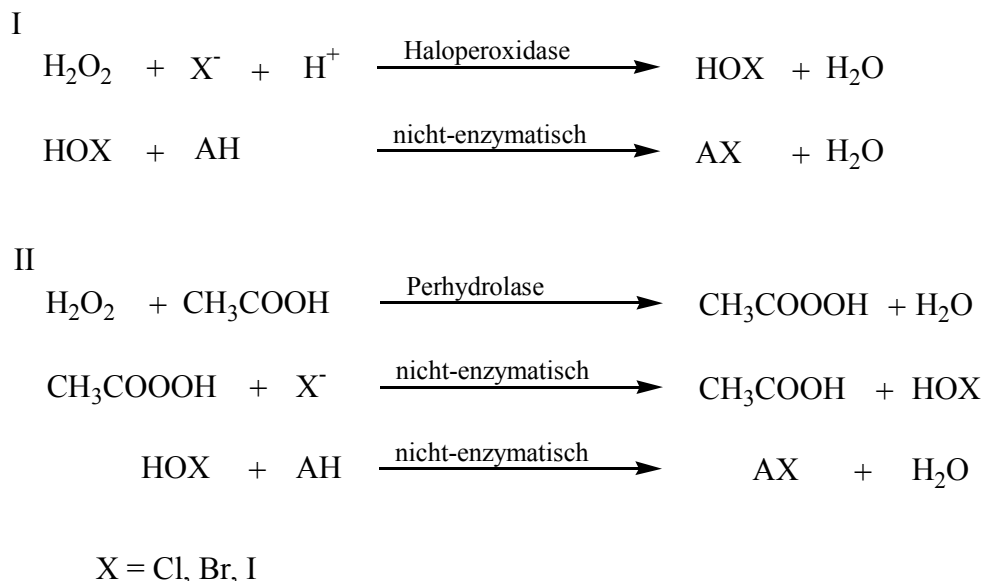


Abb. 4.33: Halogenierungsreaktion von Häm- bzw. Vanadium-enthaltenden Haloperoxidasen (I) und Perhydrolasen (II)

Trotz der fehlenden Spezifität und Selektivität dieser Gruppe halogenierender Enzyme, besitzen sie ein biokatalytisches Potential in der pharmazeutischen Synthesechemie. Zhang et al. berichten von der Biotransformation von Indol zu 1*S*, 2*R*-Indoloxid mit Hilfe eines Rohextrakts des Pilzes *Curvularia protuberata*. Der oxidierte Bicyclus dient als Grundbaustein des von Merck KGaA vertriebenen HIV-1-Protease Inhibitors Crixivan[®] [152].

Im Vergleich zu den Haloperoxidasen besitzen Methyltransferasen ein noch geringeres Potential für Anwendungen in der Synthesechemie. Diese Gruppe von Enzymen katalysiert die Übertragung einer Methylgruppe von *S*-Adenosylmethionin (SAM) auf ein Chlorid-, Bromid- oder Iodidion [153, 154]. Die Reaktion einer SAM-Transferase ist in Abb. 4.34 illustriert.

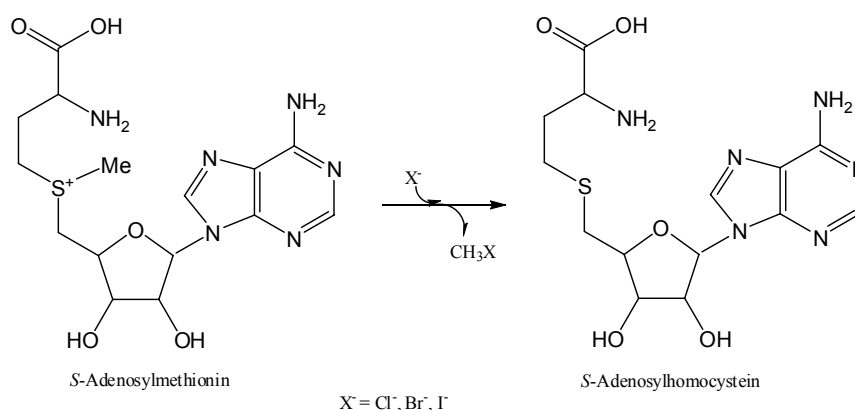


Abb. 4.34: Übertragung einer Methylgruppe auf ein Halogenidion durch eine *S*-Adenosylmethionintransferase

Aufgrund der Instabilität der Methyltransferasen gestalten sich Downstream-Prozesse recht kompliziert, weshalb Charakterisierungen in der Literatur weitgehend unbeschrie-

ben sind. Jedoch lässt sich aus kinetischen Messungen ein bevorzugter Transfer wie folgt feststellen: $I^- > Br^- > Cl^-$ [147].

Fluorierte Metabolite kommen – wie bereits erwähnt – in der Natur äußerst selten vor, obwohl deren Anteil an der Zusammensetzung der Erdkruste im Vergleich zu den anderen Halogenen recht hoch ist (Gew. %: 0,06 (F), 0,11 (Cl), 0,0006 (Br), 0,00005 (I) [155]). Aufgrund der relativ schlechten Löslichkeit von Fluorid-enthaltenden Mineralien ist die Bioverfügbarkeit des Fluors gering. Hinzu kommt, dass das Fluorid-Ion aufgrund der enormen Hydratationsenthalpie in wässriger Umgebung eine sehr geringe Nucleophilie besitzt sowie durch das relativ hohe Redoxpotential ein Einsatz in Halogenierungsreaktionen unter Beteiligung von Haloperoxidasen nicht möglich ist. Deshalb ist es umso interessanter, dass bei höheren Pflanzen und Bakterien wie beispielsweise *Streptomyces cattleya* fluorierte Metabolite nachgewiesen wurden, bei deren Entstehung Fluorinasen beteiligt sind. Man geht davon aus, dass in einer Vorstufe das Fluorid zunächst durch einen nucleophilen Angriff die Methylgruppe am C-5' SAM das Methionin substituiert und unter der Anwesenheit von NAD^+ -abhängigen Dehydrogenasen die in dem Organismus detektierten Metabolite gebildet werden (vgl. Abb. 4.35) [147].

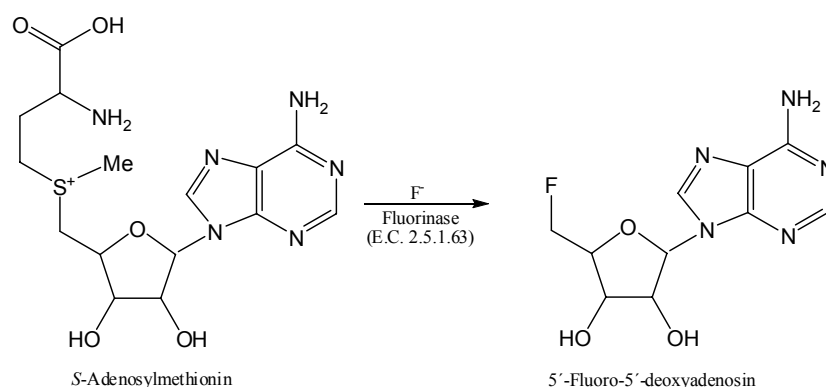


Abb. 4.35: Erster Reaktionsschritt bei der Bildung halogener Metabolite in *S. cattleya* [147]

Neuere Studien zeigen, dass es sich bei der beschriebenen Fluorinase ebenfalls um eine Chlorinase handelt und selbst die Fluorierungsreaktion reversibel ist [156]. Dies ist insbesondere erwähnenswert, da die C-F-Bindung die stärkste Bindung in der organischen Chemie überhaupt ist. Zechel et al. entdeckten zudem, dass Glycosidasen die Bildung von C-F-Bindungen katalysieren können, wenn durch eine so genannte „active site mutation“ ein Austausch eines nucleophilen Glutamat-Rests im aktiven Zentrum durch Glycin, Alanin oder Serin vorgenommen wird [157].

Flavin-abhängige Halogenasen wurden erstmalig 1995 von Dairi et al. beschrieben [158]. Bei Studien zur Biosynthese des 7-Chlortetracyclins konnte der für die Synthese verantwortliche Gencluster sequenziert werden, wobei die aus der Nucleotidsequenz resultierende Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Haloperoxidasen, Peroxidasen oder Perhydrolasen aufwies [149]. Eine Beschreibung der Expression des Enzyms sowie der Aktivität *in vitro* wurde jedoch nicht dokumentiert. Anhand von molekularbiologischen Untersuchungen zur Biosynthese des antifungal

wirksamen Metaboliten Pyrrolnitrin konnte die Beteiligung von Halogenasen sowie eine *in vitro* Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden [159, 160]. Initialschritt der Pyrrolnitrin-Biosynthese ist dabei die Halogenierung des Tryptophans unter Beteiligung einer Tryptophan-7-Halogenase (PrnA), wodurch zunächst der intermediär auftretende Metabolit 7-Chlortryptophan gebildet wird (vgl. Abb. 4.36). Das Endprodukt entsteht schließlich durch die Enzyme der Gesamtkaskade PrnB, PrnC und PrnD.

Eine *in vitro* Aktivität der Trp-7-Hal konnte unmittelbar nach dem Zellaufschluss im erhaltenen Rohextrakt nur detektiert werden, wenn NADH hinzugefügt wurde. Folgten weitere Aufreinigungsschritte, musste ferner FAD sowie eine Flavinreduktase zum Enzym-Assay hinzugegeben werden, um eine Enzymaktivität nachweisen zu können [161]. Dabei generiert die Flavinreduktase reduziertes FAD unter NADH-Verbrauch. Diese Abhängigkeit der Halogenierungsaktivität des Enzyms lässt sich auch in der Sequenz des Enzyms wiederfinden: alle bislang gefundenen Flavin-abhängigen Enzyme besitzen eine konservierte „flavin binding site“ (GxGxxG) nahe des Amino-terminalen-Endes des Proteins [162]. Bemerkenswert ist zudem, dass fast alle bislang entdeckten Halometabolit produzierenden Organismen einen oder mehrere identische Gencluster besitzen [149].

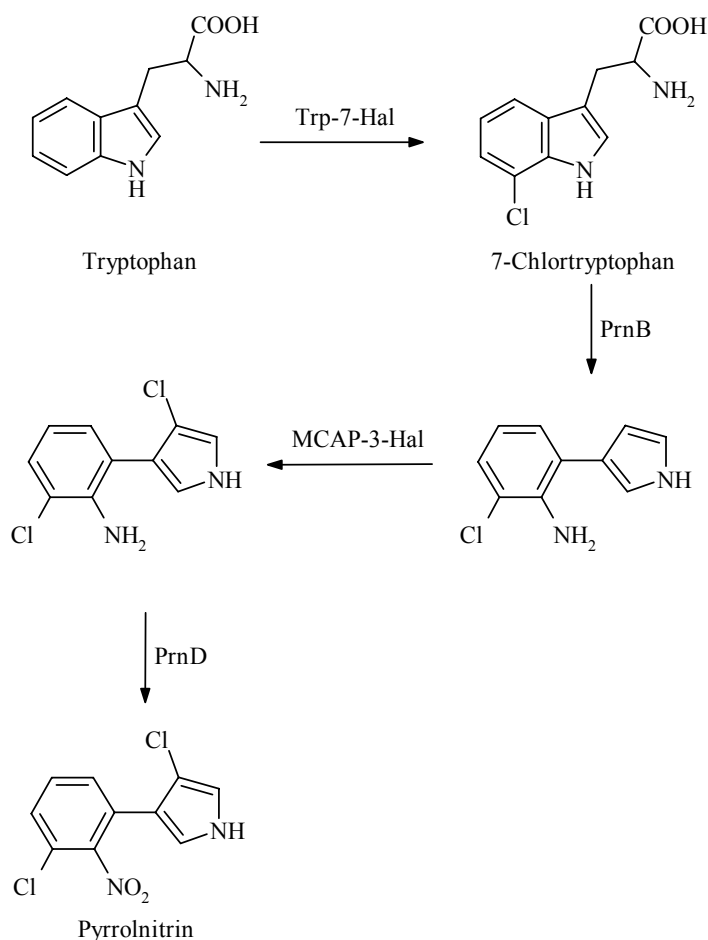


Abb. 4.36: Biosynthese des Pyrrolnitrins [163]

Von einigen Monooxygenasen ist bekannt, dass sie FADH_2 als Co-Faktor benötigen, wobei dies als frei diffundierendes Molekül an der Reaktion teilnimmt und es sich bei der Reaktion um ein 2-Komponenten System handelt [149]. Daher sollte keine spezifische Wechselwirkung zwischen der Flavinreduktase und dem halogenierenden Enzym vorliegen. Dies konnte durch die rekombinante Expression der auf einem Plasmid befindlichen Enzym-Kaskade PrnA-PrnD in *E. coli* nachgewiesen werden. Da der Gencluster aus *P. fluorescens* isoliert wurde, muss die für den Halogenierungsschritt notwendige Flavinreduktase co-exprimiert werden und daher aus dem Wirtsorganismus selbst stammen. Für die Halogenierungsreaktion kann aber auch chemisch reduziertes FADH_2 eingesetzt werden. Versuche, bei denen das System Flavinreduktase/NADH durch einen Organometall-Katalysator ((Pentamethylcyclopentadienyl)Rhodium-Bipyridin) substituiert wurde, der durch die Zugabe des Elektronendonors Formiat reduziertes FAD generierte, zeigten allerdings nur einen verminderten Umsatz des zu halogenierenden Substrats, was vermutlich auf einen inhibierenden Effekt des Formiats auf die Trp-7-Hal zurückzuführen ist [164]. Des Weiteren ist die Instabilität von freiem FADH_2 für die Verfügbarkeit der Halogenase problematisch, da es bei Gegenwart von Sauerstoff zum Flavinhydroperoxid (FADHOOH) reagiert, welches sehr instabil ist und spontan zu Wasserstoffperoxid und FAD zerfällt. Die Geschwindigkeitskonstante der Zerfallsreaktion wird in der Literatur mit 260 s^{-1} angegeben [165].

Alle bekannten Flavin-abhängigen Halogenasen besitzen eine Primärstruktur aus etwa 500 Aminosäuren mit zwei konservierten Regionen: das bereits genannte GxGxxG Motiv sowie in der Mitte der Aminosäuresequenz zwei Trp-Reste (WxWxIP). Diese sind in der Nähe der Flavinbindungsstelle und verhindern vermutlich die Bindung eines Substrates in der Nähe des Flavins, wodurch eine Monooxygenase-Reaktion der Halogenase ausgeschlossen wird [166].

Die Tatsache, dass fast alle bereits bekannten Halogenasen die genannten konservierten Struktur motive aufweisen, muss jedoch vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass sich ein Screening in der Regel auf bereits bekannte Strukturen und Sequenzhomologien stützt.

In vitro konnte bislang nur für folgende Enzyme die Aktivität einer Halogenase beobachtet werden:

Tryptophan-7-Halogenase

- PrnA; Biosynthese des Pyrrolnitrins [160]
- RebH; Rebeccamycin Biosynthese [167, 168]

Tryptophan-5-Halogenase

- PyrH; Pyrroindomycin Biosynthese [169]

Tryptophan-6-Halogenase

- Thal; Thienodolin Biosynthese in *Streptomyces albogriseolus* [167]

Monodechloraminopyrrolnitrin-3-Halogenase

- PrnC; Pyrrolnitrin Biosynthese [163]

HalB

- HalB; Pentachloropseudilin Biosynthese in *Actinoplanes* sp. ATCC 33002 [170]

Somit ist die Anzahl der bislang entdeckten Halogenasen, welche eine Aktivität *in vitro* aufweisen, noch sehr überschaubar. Ursache hierfür ist vermutlich das (noch) mangelnde Verständnis der Biosynthesewege der Metabolite.

Für die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Tryptophan-5-Halogenase existiert bislang kein validierter Reaktionsmechanismus, weshalb an dieser Stelle auf den aufgeklärten Mechanismus der Trp-7-Hal (PrnA) eingegangen werden soll, da ein ähnlicher Mechanismus für die bearbeitete Trp-5-Halogenase anzunehmen ist.

Aufgrund fehlender Daten aus der Röntgenstrukturanalyse des Kristalls der Trp-7-Halogenase ging man bis vor kurzem davon aus, dass die Halogenase entweder einen nukleophilen oder elektrophilen Angriff des Halogenatoms forciert und Hypochlorit aufgrund der vorhandenen Regioselektivität des Enzyms als halogenierendes Agens nicht in Betracht kommt (vgl. Abb. 4.37). Die nukleophile Variante beschreibt, ausgehend von dem bis dahin gemeinsamen Zwischenprodukt Flavinhydroperoxid, eine Reaktion des Hydroperoxids mit einer Doppelbindung des Substrats Tryptophan unter Ausbildung eines Epoxids, welches in einem Folgeschritt nukleophil von einem Chlorid oder Bromid angegriffen wird. Das entstandene Halohydrin eliminiert schließlich H_2O , wobei das Ringsystem des Tryptophans unter Energiegewinn rearomatisiert [161]. Beim elektrophilen Mechanismus würde das Flavinhydroperoxid hingegen mit einem Halogenid-Ion zu einem FAD-O-Cl-Intermediat reagieren. Ein nachfolgender Angriff der aromatischen π -Elektronen am Intermediat würde zu einem halogenierten Zwischenprodukt führen, welches nach Deprotonierung das halogenierte Endprodukt bildet [168]. Mit Hilfe von Daten zur Kristallstruktur der Tryptophan-7-Halogenase konnte im Jahr 2005 ein weiterer Mechanismus vorgeschlagen werden. Demnach kann das gebildete FADHOOH nicht im aktiven Zentrum des Enzyms mit dem Tryptophan interagieren, da sie 10 Å voneinander entfernt gebunden sind. Da Chlorid in direkter Nachbarschaft zum Flavin gebunden werden kann, geht man davon aus, dass dieses durch das Flavinhydroperoxid oxidiert wird und dadurch das eigentliche halogenierende Agens – Hypochlorit – entsteht. Aufgrund der vorhandenen Regioselektivität des Enzyms muss das Hypochlorit am aktiven Zentrum gebunden sein. Es kann daher nur über einen im Enzym

vorhandenen Tunnel vom Flavin zum Substrat gelangen, der das Agens vor anderen Reaktanden schützt [166].

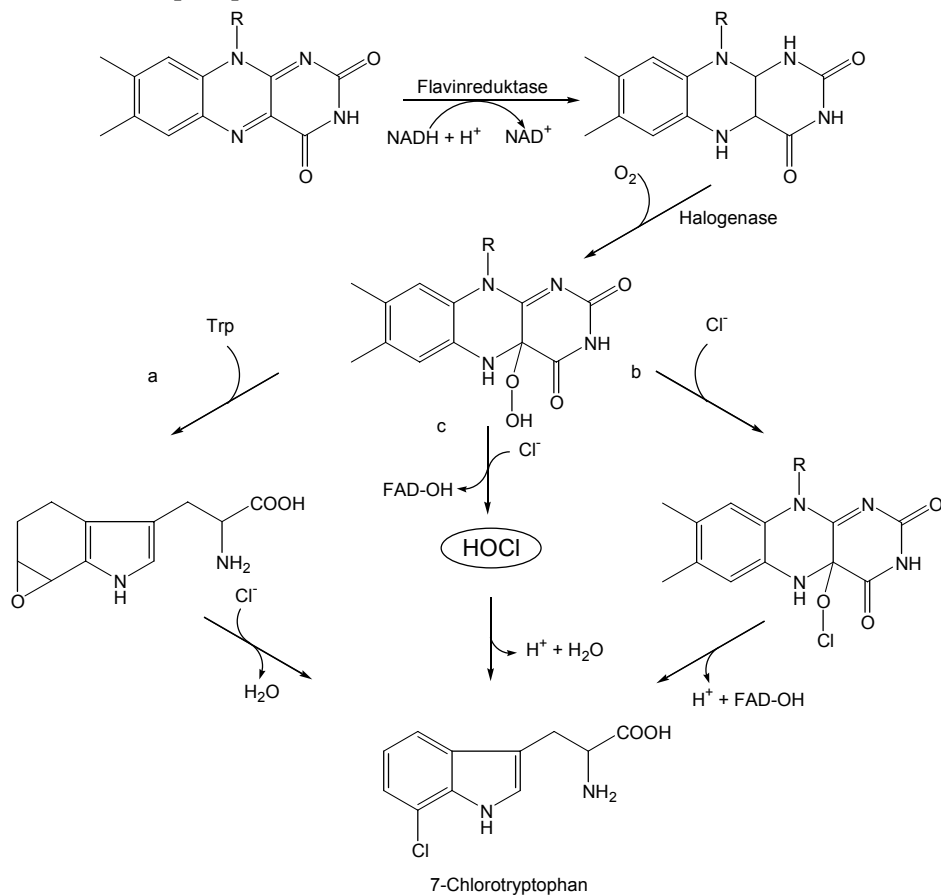


Abb. 4.37: Hypothetische Reaktionsmechanismen Flavin-abhängiger Halogenasen; a) nukleophiler Mechanismus nach Keller et al. [161], b) elektrophiler Mechanismus nach Yeh et al. [168], c) vorgeschlagener Mechanismus nach Dong et al. [166], basierend auf der Kristallstruktur von PrnA und biochemischen Daten des Enzyms; das umrandete Hypochlorit beschreibt ein an die Halogenase gebundenes HOCl-Molekül

Sollen Flavin-abhängige Halogenasen zur Synthese von Organo-Halogeniden in der organischen Feinchemie eingesetzt werden, muss das Substrat eine Doppelbindung besitzen, die für eine elektrophile Substitution zugänglich ist. Ferner muss beachtet werden, dass die Substrate vermutlich in einigen Fällen nicht in der freien Form halogeniert werden, sondern nur, wenn sie an Peptidyl- oder Acyl-Carrier-Proteine gebunden sind [149].

Derivate des Tryptophans spielen eine große Rolle im Stoffwechsel aller Organismen. Im menschlichen Stoffwechsel ist es nicht nur am Aufbau von Proteinen beteiligt sondern kann über Pyridin-2,3-dicarbonsäure zu Nicotinsäureamid metabolisiert werden oder beispielsweise über 5-Hydroxytryptophan zu Serotonin und Melatonin verstoffwechselt werden [171]. Hinsichtlich der Physiologie hat der Neurotransmitter Serotonin einen besonderen Einfluss auf das Zentralnervensystem. Ist der Serotoninspiegel im Blut zu gering, können Symptome wie Schizophrenie, Depression, Ängstlichkeit, Essstörungen oder erhöhter Blutdruck resultieren. Beschrieben wurde dieses Phänomen

auch unter dem Namen „Serotonin Deficiency Syndrome“ [172, 173]. Eine Linderung der genannten Symptome kann durch Verabreichung von 5-Hydroxytryptophan (5-HTP, Oxitriptan) erfolgen, das in der Lage ist, durch die Blut-Hirn-Schranke hindurchzutreten und in einem nachfolgenden Schritt *in vivo* durch eine 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase zu Serotonin umgewandelt wird. Eine Medikation durch Serotonin selbst ist dagegen nicht möglich, weil es nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

Bisher wird das hierfür benötigte 5-HTP aus dem Samen der afrikanischen Schwarzbohne (*Griffonia simplicifolia*) gewonnen. Der Gehalt an hydroxyliertem Tryptophan schwankt dabei zwischen 6-10 % bezogen auf das Frischgewicht der Samen [174]. Die chemische Totalsynthese (via eines 5-benzyloxy-Derivats) ist zwar in der Literatur beschrieben, aber aufgrund der mehrstufigen Synthese und der geringen Gesamtausbeute wirtschaftlich nicht etablierbar [175, 176, 130]. Des Weiteren ist auch die fermentative Gewinnung mit *Chromobacterium violaceum* sowie mit einem patentierten *Bacillus subtilis* dokumentiert [177, 178]. Problematisch bei der Fermentation von *C. violaceum* ist jedoch die vorhandene Pathogenität und die geringe Produktausbeute. Die Patentschrift U.S. 3,830,696 (Fa. Schering) verweist hingegen auf die Verwendung eines unbedenklichen Stammes und gibt Ausbeuten für 5-HTP von knapp 70 % an. Allerdings zeigte der beschriebene *B. subtilis* ein Ausbeuteoptimum bei einer Startkonzentration von 80-250 mg/L Tryptophan, was den Downstream-Prozess aufgrund der enormen Mengen an abzutrennendem Wasser, extrem kostspielig werden lässt. Ein weiteres Indiz hinsichtlich der Unwirtschaftlichkeit dieses Verfahrens offenbart sich vor dem Hintergrund, dass trotz des großen Verkaufserfolgs des hydroxylierten Tryptophans bislang keine Produkte der Firma kommerziell verfügbar sind. Eine elegante Alternative der Produktion von 5-Hydroxytryptophan eröffnet sich durch den Einsatz einer Trp-5-Halogenase aus *Streptomyces rugosporus* [169]. Die mögliche Synthesekette könnte dabei beim kommerziell verfügbaren Indol und L-Serin beginnen, die mit Hilfe einer Tryptophansynthase zunächst L-Tryptophan zur Verfügung stellen, welches in einem nachfolgenden Schritt mittels einer Flavin-abhängigen Trp-5-Hal an der Position 5 des Tryptophans halogeniert wird (vgl. Abb. 4.38). Das somit funktionalisierte Tryptophan ließe sich anschließend über eine nukleophile Substitution in das Target 5-Hydroxytryptophan umwandeln [34]. Vorteilhaft gegenüber allen anderen beschriebenen Verfahren sind hier vordergründig die sehr gute Regioselektivität des Enzyms, die unbedenkliche Kultivierung des Produktionsstammes bzw. die Isolierung der Enzyme selbst sowie die mögliche anderweitige Verwendung des funktionalisierten Tryptophans beispielsweise in Pd-Kupplungsreaktionen.

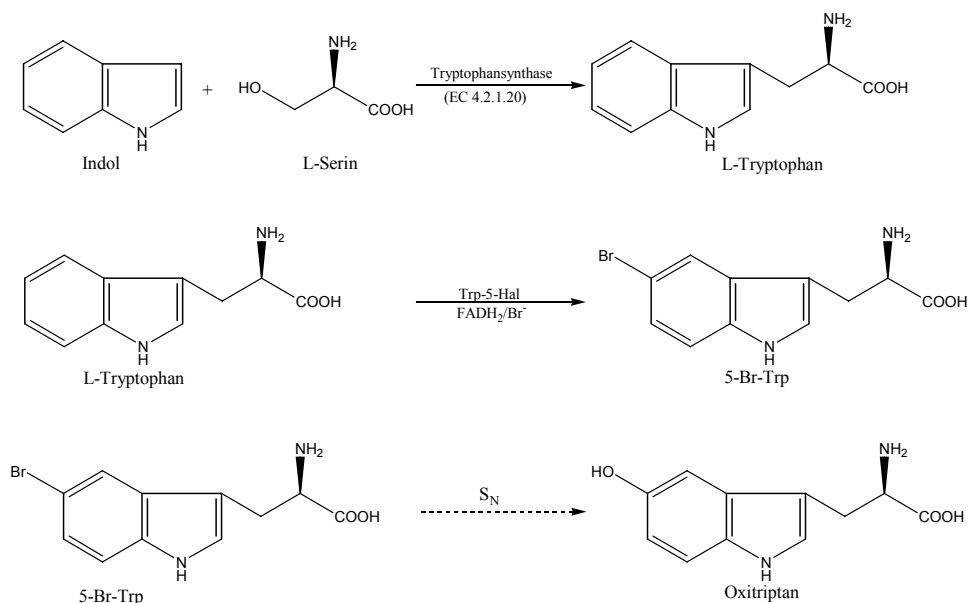


Abb. 4.38: Mögliche Reaktionssequenz zur Produktion von 5-Hydroxytryptophan [34]

Mit der vom Arbeitskreis van Pée bereitgestellten Tryptophan-5-Halogenase werden daher in diesem Abschnitt der Arbeit Versuche hinsichtlich der Verfügbarkeit der einzusetzenden Halogenase für diesen Prozess sowie eine Optimierung der Enzymaktivität beschrieben.

4.5.2 Aufreinigung einer NAD(P)H Flavin-Oxidoreduktase aus *E. coli* JM 109 (DE) pEE 1001 JRL1

Für die Halogenierungsreaktion benötigt die in dieser Arbeit verwendete Tryptophan-5-Halogenase FADH₂, das von einer Flavinreduktase bereitgestellt werden muss. Solche Reduktasen sind üblicherweise im Cytoplasma vorhanden. Im Zuge der Aufreinigung der Halogenase bis zur Homogenität werden im Rohextrakt vorhandene Flavinreduktasen jedoch abgetrennt und müssen bei nachfolgenden Aktivitätstests der Halogenase zur Verfügung gestellt werden. Eine Addition von reduziertem FADH₂ zum Halogenase-Assay ist nicht möglich, da es sehr reaktiv in Gegenwart von Luftsauerstoff ist (vgl. Kap. 4.5.1) und deshalb keine kommerzielle Verfügbarkeit besteht. Im Rahmen der hier beschriebenen Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe van Pée (TU Dresden) ein rekombinanter *E. coli*-Stamm (*E. coli* JM 109 (DE) pEE 1001 JRL1) zur Verfügung gestellt, aus dem eine teilgereinigte Flavinreduktase (FLR) gewonnen wird. Die Aufreinigungsstrategie wird im Folgenden detailliert beschrieben.

Für die Kultivierung des Stammes wurden zunächst 100 mL LB-Medium in 500 mL-Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen für 20 min bei 121 °C autoklaviert und nach dem Einstellen einer Ampicillinkonzentration von 100 µL/mL (Amp₁₀₀) mit 100 µL einer Stammhaltungskultur von *E. coli* beimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einem Schüttelschrank bei 37 °C und 120 rpm. Als Inokulum der Hauptkultur (1,5 L-Medium + Amp₁₀₀ in 5 L Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen) dienten 15 mL der

Vorkultur. Die Hauptkulturen wurden nachfolgend für 24 h bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Die Optische Dichte der Hauptkultur entsprach einer OD₅₉₅ von etwa 0,45–0,55 bei einer 1:10 Verdünnung mit 3%iger Natriumchlorid-Lösung.

Die Zellernte erfolgte, indem die Zellsuspension in Zentrifugengefäße à 50 mL überführt und für 30 min bei 4 °C und 3.345 g zentrifugiert wurde. Nach dem Verwerfen des Überstands wurden die Pellets im doppelten Volumen Kaliumphosphatpuffer (0,01 M, pH 7,2) resuspendiert, gewaschen und nachfolgend unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert.

Die Bestimmung der Biofeuchtmasse lieferte eine Ausbeute von 4,24 g Zellmasse pro Liter Kultivierungsmedium. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -80 °C gelagert bzw. direkt nach der Kultivierung für weitere Versuche eingesetzt.

Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Hilfe eines FastPrep[®] FP 120-Systems (Fa. Thermo Electron, Dreieich), welches in Vorversuchen eine quantitative Desintegration der Zellen zeigte [179]. Hierzu wurden die erhaltenen Pellets im doppelten Volumen Aufschlusspuffer (0,1 M KPP, 7,2) bei 4 °C suspendiert und je 1,8 mL Aliquots hiervon in die FastPrep-Gefäße Lysing Matrix B überführt. Der Aufschluss erfolgte für 3 x 20 s auf Stufe 6 des FastPrep FP120-Geräts. Zwischen den Intervallen wurden die Proben jeweils für 3 min im Eisbad gekühlt, um eine zu starke Erwärmung der Probe zu vermeiden. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 30 min und 10.000 g bei 4 °C abzentrifugiert. Die Proteinbestimmung im Überstand ergab eine Ausbeute von 653 mg Protein pro L Medium (vgl. Kap. 6.5.2).

Für die Teil-Aufreinigung der FLR sollte die Verwendung einer Größenausschlusschromatographie untersucht werden. Als Säulenmaterial diente Sephacryl[®] S-200 (Fa. GE Healthcare). Die Auswahl des Materials erfolgte aufgrund der Herstellerangaben, die eine Auftrennung mittelgroßer Proteine im Bereich von $5,0 \cdot 10^3$ – $2,5 \cdot 10^5$ Da mit dieser Matrix empfehlen, dabei liegt die FLR mit einem Molekulargewicht von 28 kDa genau im Trennbereich [180]. Zur Vorbereitung des Säulenbetts wurden 300 mL Sephacryl[®] S-200 verwendet (Säulendurchmesser ca. 2,5 cm). Dann wurde die Chromatographiesäule in ein FPLC-System (Fa. Bio-Rad) eingebunden. Zur Vorbereitung für die Wahl eines geeigneten Laufprofils des Elutionspuffers (0,15 M KCl in 10 mM Tris, pH 8) wurden Vorversuche mit vier Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts durchgeführt (BSA, 66 kDa; Ovalbumin, 45 kDa; Myoglobin, 18,8 kDa; Lysozym, 14,3 kDa). Das ermittelte Elutionsprogramm wurde schließlich für die Aufreinigung der Flavinreduktase übernommen.

Für die Aufreinigung der Flavinreduktase wurde in einem ersten Test 3 mL des nach dem FastPrep[®]-Aufschluss erhaltenen, zentrifugierten Rohextrakts (Gesamtproteingehalt 100 mg) auf die Säule aufgetragen und ein Volumenstrom von 0,12 mL/min für den Elutionspuffer vorgegeben. Anschließend wurden über einen Zeitraum von 8 h bei Raumtemperatur Fraktionen à 3 mL gesammelt. Die Überprüfung der Reduktaseaktivität erfolgte mit Hilfe des qualitativen DCPIP-Tests (vgl. Kap. 6.4.4), bei dem die blaue Farbe der eingesetzten Lösung bei Anwesenheit von Reduktasen zu einer farblosen

Leuko-Verbindung reduziert wird. Das Elutionsprofil des aufgetragenen Rohextrakts ist in Abb. 4.39 dargestellt.

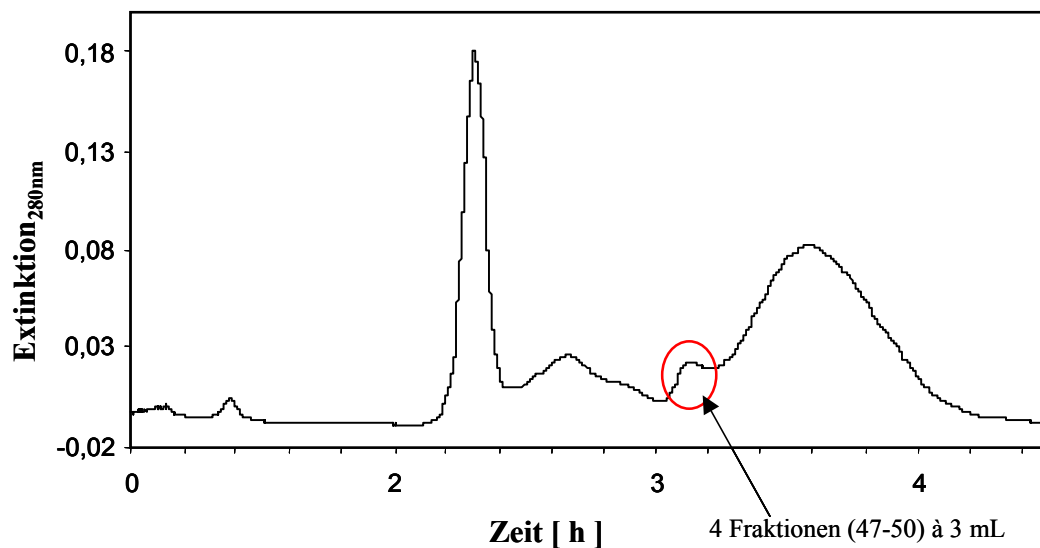


Abb. 4.39: Elutionsprofil der Gelfiltration des FLR-Rohextrakts über einen Zeitraum von 8 h bei einer Flussrate von 0,12 mL/min, aufgetragen wurden 100 mL Gesamtprotein; die Flavinreduktase eluierte dabei über vier Fraktionen [179]

Jede Fraktion, die aufgrund der UV-Absorption bei 280 nm einen Proteingehalt aufwies, wurde mit Hilfe des DCPIP-Tests auf Flavinreduktaseaktivität getestet, dabei fielen vier Fraktionen positiv im Test auf. Abb. 4.40 illustriert die getesteten Elutionsfraktionen.

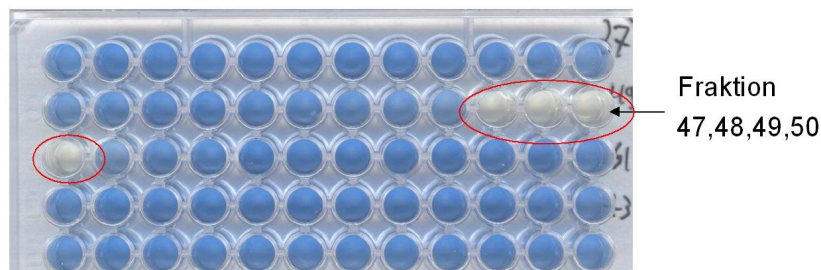


Abb. 4.40: DCPIP-Test der Fraktionen aus der Gelfiltration auf einer 96er-Well-Platte; die Fraktionen 47–50 indizieren durch die Entfärbung der Lösung das Vorhandensein von Reduktasen [179]

Fraktionen, die eine Reduktaseaktivität aufwiesen, wurden nachfolgend mit Hilfe einer SDS-PAGE auf die Reinheit der isolierten Flavinreduktase untersucht. Das Ergebnis der Proteinanalytik der aus der Gelfiltration erhaltenen Proben ist in Abb. 4.41 dargestellt.

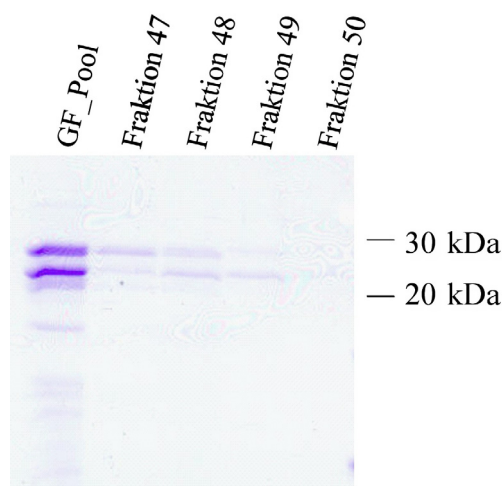


Abb. 4.41: SDS-PAGE-Gel der aktiven Fraktionen 47–50 der Gelfiltration; aufgetragen wurden 20 μ L pro Bahn (zur Durchführung vgl. Kap. 6.5.3) [179]

Wie Abb. 4.41 zeigt, konnte unter Anwendung des beschriebenen Elutionsprofils eine fast vollständige Isolierung der Flavinreduktase von den anderen Proteinen im Rohextrakt erzielt werden. Bis auf ein Begleitprotein mit ähnlichem Molekulargewicht ist die FLR eindeutig im Gel identifizierbar. Der schwache Kontrast der Proteinbanden im Gel resultiert aus dem geringen Proteinanteil der aufgetragenen Fraktionen. Die Aufkonzentrierung der gepoolten Fraktionen 47–50 erfolgte mit Hilfe eines ViVaspin Zentrifugalkonzentrators mit einer Ausschlussgröße von 5 kDa in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C und 3.345 g. Um zusätzlich die gepoolten Fraktionen umzupuffern, wurde beim erhaltenen Konzentrat ein zweimaliger Pufferaustausch (0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,2) mit Hilfe des Zentrifugalkonzentrators unter den genannten Bedingungen durchgeführt, wobei der Reduktasepool von 12 auf 1,6 mL eingengt werden konnte. Somit konnte eine Aufkonzentrierung um den Faktor 7,5 erzielt werden. Die Proteinkonzentration, bestimmt nach Whitaker und Granum (vgl. Kap. 6.5.2), betrug im konzentrierten Gelfiltrationspool 0,6 mg/mL, was einem Proteingehalt von 6,53 mg Reduktase pro L Zellsuspension aus der Kultivierung entspricht.

Aufgrund der geringen Ausbeute an aufgereinigtem Protein, wurde die Aufreinigungsstrategie für die Bereitstellung der Flavinreduktase unter leicht veränderten Bedingungen durchgeführt. Bei einer Verdopplung der aufgetragenen Proteinmenge konnten bei einer äquivalenten Flussrate von 0,12 mL/min des Elutionspuffers 33,9 mg Protein bei sehr guter Trennleistung (verifiziert mit Hilfe des DCPIP-Tests) isoliert werden. Aus einem Liter Fermentationsmedium konnten daher mit dieser Strategie 110 mg teilgereinigte Flavinreduktase gewonnen werden. Die gesteigerte Menge an isoliertem Enzym ist darauf zurückzuführen, dass die erhaltenen Fraktionen geringe (tolerierbare) Verunreinigungen anderer Proteine enthalten.

Die Volumenaktivität des mit Hilfe dieser Aufreinigungsstrategie erhaltenen aufkonzentrierten Gelfiltrationspools wurde mit Hilfe des in Kap. 6.4.3 beschriebenen Flavinreduktase-Assays ermittelt. Hierbei wurde nach Zugabe von FAD und NADH zur

Proteinprobe die Abnahme der Absorption des NADH bei 340 nm photometrisch detektiert und anhand der Anfangssteigung die Aktivität des Enzyms berechnet. Die nach diesem Test ermittelte Aktivität der Flavinreduktase im Gelfiltrationspool beträgt 13,72 mU/ μ L. Pro Liter Kultivierungsmedium lassen sich daher mit der hier beschriebenen Methode 89,6 U isolieren. Die erhaltenen Ausbeuten der einzelnen Aufreinigungsschritte sind zusammenfassend in Tab. 4.9 aufgeführt.

Tab. 4.9: Resultierende Ausbeuten für die einzelnen Aufreinigungsschritte; die Angaben beziehen sich jeweils auf einen L Kultivierungsmedium

Biofeuchtmasse pro L Medium	4,24 g/L
Proteinmenge pro L Medium	653 mg/L
Proteinmenge nach der Gelfiltration	110 mg/L
isolierbare Units der FLR	89,6 U/L

Insgesamt konnte mit der hier beschriebenen Methode die Flavinreduktase mit einer spezifischen Aktivität von 0,82 U/mg isoliert werden.

Die Aufbewahrung der gepoolten und aufkonzentrierten FLR-Fractionen aus der Gelfiltration erfolgte nach Verdünnung mit 0,01 M Kaliumphosphatpuffer + 10 % Glycerin (v/v) und nachfolgender Aliquotierung bei -18 °C. Während der Lagerung wurde ein Aktivitätsverlust von ca. 10 % pro Monat beobachtet.

4.5.3 Aufreinigung einer FADH₂-abhängigen Trp-5-Halogenase aus *Pseudomonas fluorescens* BL 915 + pSZexM2

Der für die Isolierung der Tryptophan-5-Halogenase verwendete Expressionsorganismus *Pseudomonas fluorescens* BL 915 + pSZexM2 wurde dem Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik (TU Kaiserslautern) im Rahmen von Projektvorarbeiten von der Arbeitsgruppe van Pée (TU Dresden) zur Verfügung gestellt. Bei diesem Stamm lag das für die Halogenierung von Tryptophan in Position 5 verantwortliche DNA-Fragment, (*pyrH*) aus *Streptomyces rugosporus* LL-42D005, auf dem in Abb. 4.42 dargestellten Plasmid vor. Da der Wirtsorganismus *Pseudomonas fluorescens* BL 915 Δ ORF1 ursprünglich einen für die Tryptophan-7-Halogenase (PrnA) kodierenden Abschnitt enthält, musste dieser vor der Transformation deaktiviert werden [181].

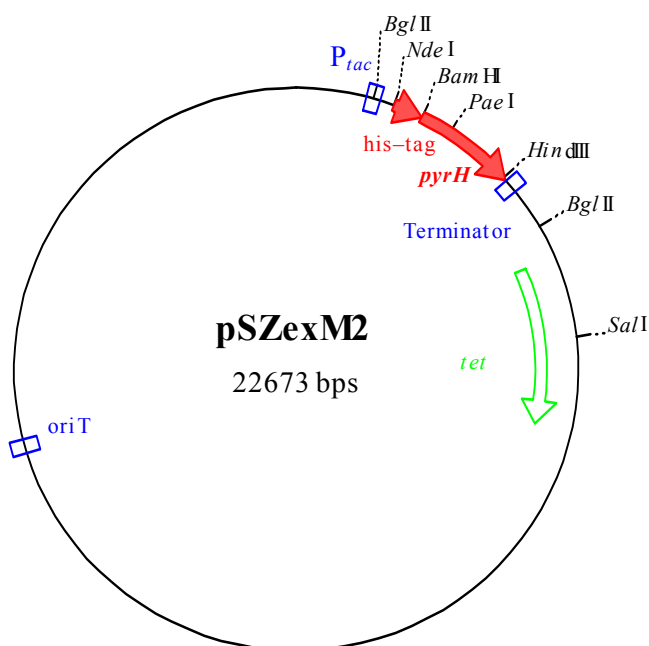


Abb. 4.42: Restriktionskarte des Expressionsvektors pSZexM2; Vektor zur Expression der Trp-5-Hal (PyrH) in *Pseudomonas fluorescens* [181]

Wie anhand der Abbildung ersichtlich ist, besitzt das transformierte Plasmid als Selektionsmarker eine Tetracyclinresistenz sowie eine Poly-His-Region, die es erlaubt, das exprimierte Protein elegant mit Hilfe der Immobilisierten Metallionen Affinitäts Chromatographie (IMAC) aufzureinigen.

Die Zellzucht des rekombinanten *P. fluorescens* erfolgte im HNB-Medium, dem nach dem Autoklavieren (20 min, 121 °C) 30 µg/mL Tetracyclin (Tet₃₀) supplementiert wurden. Für die Vorkultur wurde 1 mL einer bei -80 °C gelagerten Stammhaltungskultur von *P. fluorescens* in 100 mL HNB + Tet₃₀ über Nacht bei 30 °C und 120 rpm in einem 500 mL-Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen inkubiert. Als Inokulum der Hauptkultur (1,5 L HNB + Tet₃₀ in 5 L Erlenmeyerkolben) dienten 15 mL der Vorkultur. Die Inkubation erfolgte für 72 h bei den gleichen Bedingungen, die für die Vorkultur verwendet wurden.

Die Bestimmung der Optischen Dichte, gemessen bei 595 nm, nach dem Abschluss der Fermentation lag bei einer 1:10 Verdünnung mit 3%iger Kochsalzlösung bei 0,6-0,7.

Die Zellernte erfolgte durch Überführen der Zellsuspension in 50 mL Zentrifugenröhrchen und nachfolgendem Zentrifugieren für 45 min bei 4 °C mit 3.345 g. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets im doppelten Volumen eiskalter Saline (vgl. Kap. 6.2.1) resuspendiert und gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen konnte eine Biofeuchtmassenausbeute von 8,28 g/L Fermentationsmedium gewonnen werden. Die Lagerung der Pellets erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

Aufgrund bislang nicht vorhandener Daten und Testreihen bezüglich der Effizienz verschiedener Aufschlussmethoden der Zellen von *P. fluorescens*, wurden im Rahmen dieser Arbeit vier Methoden getestet, welche im Folgenden beschrieben werden. Hierzu zählen ein Ultraschall-, ein enzymatischer sowie ein FastPrep[®]-Aufschluss.

Der Ultraschallaufschluss wurde bei bisherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe van Pée als Standardmethode zur Freisetzung des Enzyms angewandt und sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den anderen Aufschlussmethoden untersucht werden. Hierfür wurde die Biofeuchtmasse in 3 mL Aufschlusspuffer (0,1 M KPP, pH 7,2) resuspendiert und in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Desintegration der Zellen erfolgte unter Eiskühlung bei 80 W mit einer Frequenz der Pulse von $0,2 \text{ s}^{-1}$ für 5 min. Die Zelltrümmer wurden anschließend für 30 min in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C und 10.000 g abzentrifugiert. Der gelbliche Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die lichtmikroskopische Analyse des Zellaufschlusses zeigte aufgrund des Vorhandenseins intakter Zellen einen unvollständigen Aufschluss an.

Für den Zellaufschluss mit dem FastPrep[®]-System FP120 (Fa. Thermo Electron, Dreieich) wurden die Zellen ebenfalls mit 3 mL Aufschlusspuffer pro Gramm Feuchtmasse versetzt. Nachfolgend wurden Aliquots von etwa 1,5 mL der Zellsuspension in die Aufschlussgefäße überführt und für 3 x 20 s aufgeschlossen. Verwendet wurde die Lysing Matrix C. Nach dem Homogenisieren wurden die Zelltrümmer im selben Gefäß bei 4 °C mit 10.000 g für 45 min zentrifugiert. Die lichtmikroskopische Untersuchung, direkt nach dem Zellaufschluss durchgeführt, indizierte einen quantitativen Aufschluss der Zellen.

Ein Zellaufschluss unter weniger harschen Bedingungen kann mit Hilfe des Enzyms Lysozym durchgeführt werden. Dieses Enzym ist als Glycosidase in der Lage, den Polysaccharidanteil der Zellwände zu spalten und somit ein Platzen der Zellen aufgrund des intrazellulären osmotischen Drucks auszulösen, wodurch schließlich intrazelluläre Proteine freigesetzt werden. Hierdurch wird eine mechanische Beanspruchung, wie sie bei anderen Aufschlussmethoden vorkommen können, vermieden, was sich positiv auf die Proteinstabilität auswirken kann. Für den enzymatischen Aufschluss wurden 135 mg Lysozym (50.000 U/mg), das in 10 mL 0,05 M Tris-EDTA-Puffer (pH 8) gelöst wurde, in Fraktionen à 1,5 mL zu jeweils 1 g Feuchtmasse gegeben. Nach der Resuspendierung der Zellen erfolgte die Desintegration der Zellen für 30 min bei Raumtemperatur und geringen Schüttelgeschwindigkeiten in einem Inkubationsschüttler. Anschließend wurden zur Reduktion der Viskosität der Lösung 8 µL Benzoase[®] pro Ansatz addiert. Dabei handelt es sich um eine DNase-Stammlösung (25 U/µL) der Fa. Merck, welche die freigesetzten Nukleinsäuren in kleinere Oligonukleotide verdaut, wodurch die Viskosität der Lösung herabgesetzt wird. Nach einer weiteren Inkubation von 30 min wurden die Zelltrümmer für 30 min und 10.000 g bei 4 °C abzentrifugiert. Die direkt nach dem Aufschluss durchgeführte lichtmikroskopische Analyse des Rohextrakts zeigte auch in diesem Fall einen vollständigen Aufschluss der Zellen.

Da die mikroskopische Betrachtung des Rohextrakts nur eine qualitative Aussage über die Güte des Zellaufschlusses zulässt, wurden die erhaltenen Rohextrakte auch hinsichtlich der Menge an freigesetzten Proteinen untersucht. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der mit Ultraschall aufgeschlossenen Probe erfolgte nach dem Protokoll von Lowry (vgl. Kap. 6.5.1), die Bestimmung des Proteingehalts der Probe aus dem FastPrep[®] und des Lysozymbaufschlusses nach der Methode von Whitaker und Granum (vgl. Kap. 6.5.2). Bei der Proteinbestimmung im Lysozymbaufschluss enthielt die Referenzküvette jedoch abweichend von der allgemeinen Vorschrift zusätzlich die gleiche Menge an Lysozym und Benzoase[®] wie der Rohextrakt selbst.

Die hierbei ermittelten Werte sind in Tab. 4.10 dargestellt, wobei sich die angegebenen Proteinkonzentrationen auf die pro L Medium erhaltene Zellmasse beziehen.

Tab. 4.10: Vergleich der eingesetzten Aufschlussverfahren und der resultierenden Proteingehalte im Rohextrakt [179]

Aufschlussart	Proteinkonzentration [mg/L Medium]	Relativer Proteinanteil [%]
Ultraschall	608,1	100
FastPrep	779,9	128
Lysozym	1002,2	165

Die Verwendung eines enzymatischen Aufschlusses zeigte einen im Vergleich zum bislang vom Kooperationspartner an der TU Dresden verwendeten Ultraschallaufschluss einen um den Faktor 1,65 höheren Proteinanteil im Rohextrakt. Neben der relativ sanften Methode des Zellaufschlusses bietet die enzymatische Desintegration zudem den Vorteil, dass dieses Verfahren im Labormaßstab relativ leicht up-scalebar ist, sollten größere Mengen an Zellmasse aufzuschließen sein. Durch den gerätetechnischen Aufbau ist man sowohl bei der Ultraschallsonde als auch beim FastPrep[®]-System hingegen auf recht kleine Volumina beschränkt. Inwiefern die gewählten Aufschlussmethoden einen Einfluss auf die Aktivität der zu isolierenden Halogenase haben, wurde im Rahmen dieser beschriebenen Vorversuche nicht eingehender untersucht. Allerdings kann, da der enzymatische Aufschluss die größte Menge an Protein freisetzt, davon ausgegangen werden, dass das Zielprotein ebenso mit dem größtmöglichen Anteil im Rohextrakt vorhanden ist. Da für die Aufreinigung der Halogenase eine Affinitätschromatographie zum Einsatz kommt, ist der hohe Anteil an Begleitproteinen im Rohextrakt unproblematisch für den Downstream-Prozess.

Bei der aufzureinigenden Tryptophan-5-Halogenase handelt es sich um ein rekombinantes Fusionsprotein mit sechs Histidin-Resten am N-Terminus, weshalb sich zur Aufreinigung ein IMAC-System anbietet. Das in dieser Arbeit verwendete System bestand aus einer kommerziell erhältlichen, vorgepackten HisTrapTMHPP Säule (Fa. GE Healthcare). Bei diesem Modul besteht die Matrix des Säulenmaterials aus hochvernetz-

ter Agarose, welche unter dem Handelsnamen Sepharose™ bezogen werden kann. Die Teilstruktur von Agarose in einem solchen Gel ist in Abb. 4.43 dargestellt.

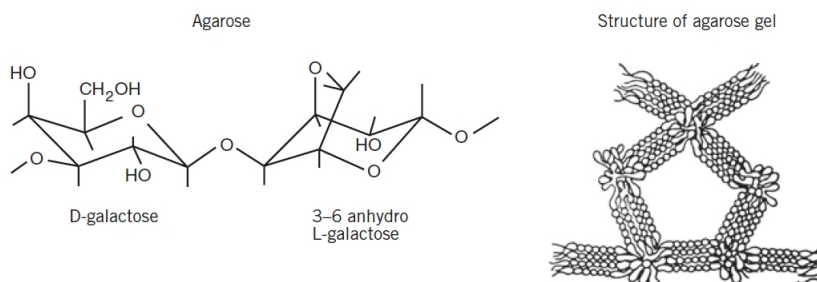


Abb. 4.43: Teilstruktur von Sepharose™ [182]

Für eine Aufreinigung His₆-getagter Fusionsproteine müssen jedoch Sepharosematerialien eingesetzt werden, welche die Fähigkeit zur Chelatisierung von Metallionen besitzen. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Sepharose war bereits Iminodiessigsäure kovalent an die quervernetzte Agarose gebunden, welche als Chelat zu Ni²⁺-Ionen vorlag. Die Teilstruktur der kovalent gebundenen Iminodiessigsäure ist in Abb. 4.44 illustriert.

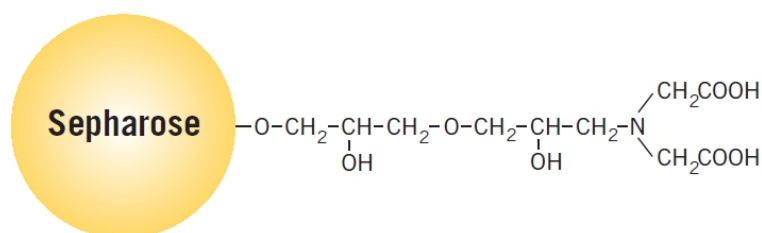


Abb. 4.44: Teilstruktur des verwendeten, vorgepackten Sepharose-Säulenmaterials, an das Iminodiessigsäuregruppen kovalent gebunden sind [182]

Die mit Nickel-Ionen beladene Matrix bietet aufgrund noch unbesetzter Koordinationsstellen die Möglichkeit der Komplex-Bindung mit bestimmten Aminosäuren, wie beispielsweise Cystein oder Histidin, wobei letztere die bedeutendste Bindung als Nickel-Chelat eingeht. Deshalb bindet bei der Durchführung einer Affinitätschromatographie zur Isolierung eines Fusionsproteins dieses am stärksten von allen anderen Proteinen des aufgetragenen Rohextrakts an die stationäre Phase, Begleitproteine binden dagegen nur in einem deutlich geringeren Anteil. Durch eine Konzentrationserhöhung eines Elutionspuffers kann die koordinative Bindung zum Zielprotein gelöst werden, da der Eluent eine stärkere Affinität zur Koordinationsstelle aufweist, man spricht von kompetitiver Elution.

Die Aufreinigung der Trp-5-Halogenase erfolgte direkt aus dem Rohextrakt, wobei die gesamte Elution bei 4 °C durchgeführt wurde, um eine Denaturierung des Enzyms zu vermeiden.

Für die Aufreinigung der Trp-5-Hal bis zur Homogenität wurden 28 mg Protein enthaltender Rohextrakt auf eine in ein FPLC-System eingebundene 1 mL HisTrap™ Säule aufgetragen. Für die Auftragung wurde der Elutionspuffer A verwendet (20 mM Natri-

umphosphat, 0,5 NaCl, 5 mM Imidazol, pH 7,4). Die Elution erfolgte durch einen Gradienten mit einer Flussrate von 4 mL/min auf bis zu 100 % Elutionspuffer B (20 mM Natriumphosphat, 0,5 NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4). Hierbei resultierte das in Abb. 4.45 dargestellte Elutionsprofil.

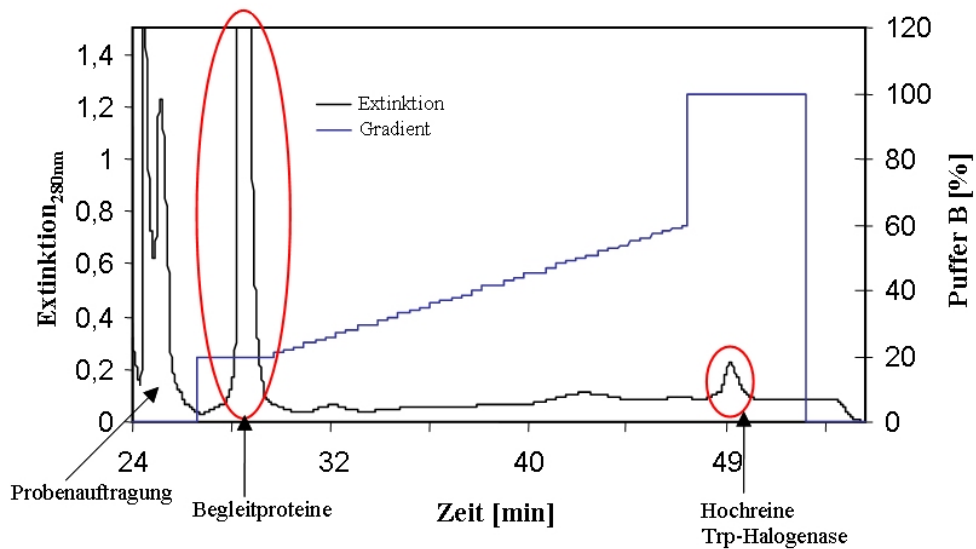


Abb. 4.45: FPLC-Chromatogramm der Aufreinigung der Trp-5-Halogenase zur Homogenität unter Verwendung einer HisTrap™ HP Säule (Säulenvolumen 1 mL); Elutionsbedingungen: Flussrate 4 mL/min; aufgetragene Proteinmenge 28 mg (Rohextrakt). Puffer A: 20 mM Natriumphosphat, 0,5 NaCl, 5 mM Imidazol, pH 7,4; Puffer B: 20 mM Natriumphosphat, 0,5 NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4 [179]

Die Abbildung zeigt, dass innerhalb von 25 min nach Auftragung von ca. 30 mg Protein auf die Säule hochreine Trp-5-Halogenase erhalten wurde. Dies konnte mit Hilfe eines SDS-PAGE-Gels, wie in Abb. 4.46 dokumentiert ist, verifiziert werden. Das dargestellte Elutionsprofil verdeutlicht jedoch auch, dass unter Anwendung dieser Aufreinigungsstrategie lediglich eine geringe Menge an hochreinem halogenierendem Enzym isoliert werden konnte. Verdeutlicht wird diese Tatsache dadurch, dass sich der Elutionspeak kaum von der Basislinie abhebt und nur etwa 1/10 einer Absorptionseinheit beträgt. Somit ist diese Strategie für eine effiziente Durchführung der Aufreinigung nur sinnvoll, wenn weitere Untersuchungen eine hochreine Qualität des Enzyms zwingend erfordern (z. B. Kristallisation des Enzyms).

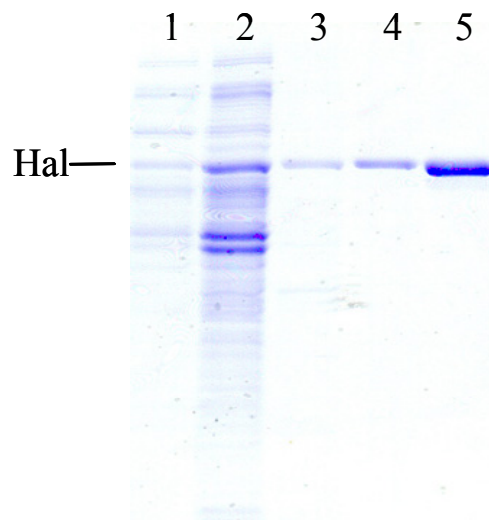


Abb. 4.46: SDS-PAGE-Gel nach Coomassiefärbung; aufgetragen wurden Proteinfractionen der Aufreinigung der Halogenase bis zur Homogenität; Bahn 1–3: Auftragung von je 20 μL aus dem Begleitproteinpool; Bahn 4–5: Auftragung von je 20 μL aus dem Halogenasepool (zur Durchführung vgl. Kap. 6.5.3) [179]

Aufgrund der geringen Ausbeute an isolierbarem, hochreinem Enzym wurde die Aufreinigungsstrategie leicht variiert. Die bislang verwendete 1 mL HisTrapTM wurde durch eine äquivalente Säule mit einem Volumen von 5 mL ersetzt und der Gradient stufenweise variiert. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die gesamte Tryptophan-5-Halogenase zu einem Zeitpunkt eluiert und es somit nicht schon, wie bei der Anwendung des linearen Gradienten, zu einer vorzeitigen Teilelution der Halogenase kommt. Nachteilig bei dieser Strategie ist dafür die geringe Verunreinigung der Halogenasefraktion durch Begleitproteine, deren vollständige Separierung nach diesem Protokoll nicht möglich ist. Da möglicherweise jedoch der Anteil an isolierbarer Halogenase deutlich erhöht werden kann, sollte diese Möglichkeit der Aufreinigung untersucht werden. Hierzu wurden 1,4 g Protein des mit dem Lysozymaufschluss erhaltenen Rohextrakts auf die Säule aufgetragen, wobei unter Verwendung der Elutionspuffer A und B bei einer Flussrate von 4 mL/min das in Abb. 4.47 dargestellte Elutionsprofil resultierte.

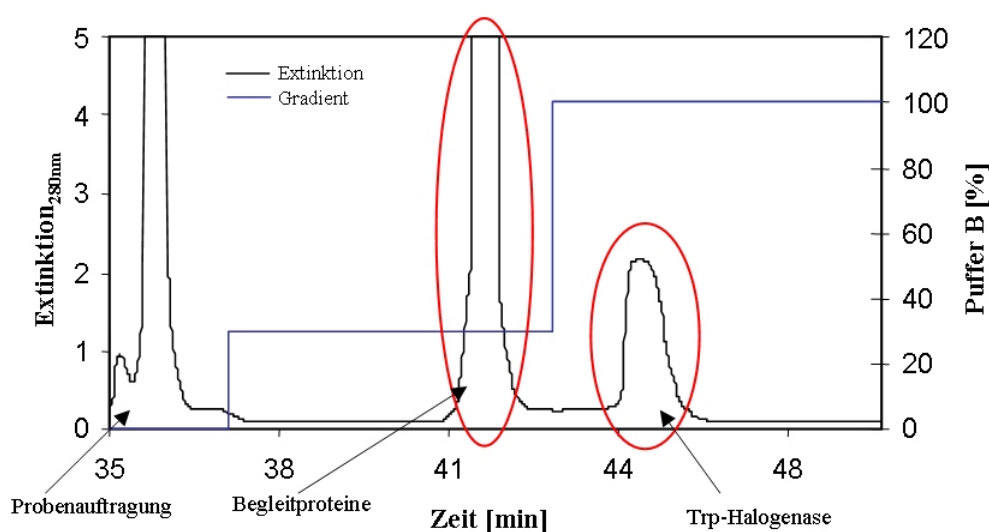


Abb. 4.47: Elutionsprofil bei der Aufreinigung der Trp-5-Halogenase mit einer 5-mL-HisTrap™-Säule (Fa. GE Healthcare), Elutionsbedingungen: Flussrate 4 mL/min; aufgetragene Proteinmenge 1,4 g (Rohextrakt); Puffer A: 20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 5 mM Imidazol, pH 7,4; Puffer B: 20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4 [179]

Die Anwendung dieser Aufreinigungsstrategie lässt, wie Abb. 4.47 verdeutlicht, eine Isolierung der Halogenase innerhalb von ca. 10 min zu. Beim Vergleich mit der Aufreinigung des Enzyms bis zur Homogenität (vgl. Abb. 4.45) fällt der deutlich höhere Proteinanteil auf, der im letzten Schritt des Stufenprofils eluiert wird. Dieser ist ca. um den Faktor 10 höher, bedingt zum einen durch eine größere Menge an aufgetragenem Protein aus dem Rohextrakt, zum anderen aber auch durch den Wechsel des verwendeten Elutionsprofils. Insgesamt konnten mit Hilfe der hier beschriebenen Aufreinigungsstrategie 36,7 mg Protein während des letzten Elutionsschrittes isoliert werden. Bedenkt man, dass aus dem Lysozymbaufrschluss 1 g Protein pro L an eingesetztem Fermentationsmedium gewonnen werden kann, können mit der hier dargestellten Methode 26,2 mg Trp-5-Hal pro Liter Medium erhalten werden. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 2,6 % bezogen auf den Gesamtproteingehalt des Rohextrakts. Aussagen bezüglich der Aktivität der Halogenase lassen sich auf dieser Stufe der Enzymaufbereitung nicht machen und sind Gegenstand der folgenden Kapitel.

Die Tryptophan-Halogenase enthaltenden Fraktionen aus der IMAC wurden gepoolt und mit Hilfe eines VivaSpin20-Konzentrators (MWCO = 30 kDa) ein zweimaliger Pufferaustausch gegen Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,2 + 10 % Glycerin (v/v)) durchgeführt. Dabei konnte das Volumen der Proteinlösung im letzten Schritt von 9 mL auf 3 mL reduziert werden. Die Lagerung der so gewonnenen Tryptophan-5-Halogenase erfolgte bis zur weiteren Verwendung in Aliquots von 200 µL bei -20 °C. Hierbei war über einen Zeitraum von einem Monat ein Aktivitätsverlust von 8 - 10 % zu beobachten.

4.5.4 Charakterisierung der Tryptophan-5-Halogenase

Im Folgenden wird die Tryptophan-5-Halogenase aus *P. fluorescens* hinsichtlich ihres Umsatzverhaltens bzw. der Verwendung unterschiedlicher Halogenidionen für die Halogenierungsreaktion charakterisiert. Zudem erfolgt eine Beschreibung des pH- wie auch des Temperaturoptimums sowie eine detailliertere Untersuchung der Enzymstabilität. Zentraler Hintergrund ist dabei die Optimierung eines bestehenden Enzymtests, der in Tab. 4.11 angegeben ist [183]. Im Vergleich zum in der Literatur beschriebenen Assay wurde die Vorlage an L-Tryptophan von 0,6 mM auf 0,2 mM reduziert. Die einzusetzende Menge an Flavinreduktase richtet sich dabei nach deren Aktivität, die über einen FLR-Aktivitätstest zuvor bestimmt werden musste (vgl. Kap. 6.4.3). Die Endkonzentration im Test wurde durch Auffüllen des Testansatzes mit Puffer auf 200 μ L Gesamtvolumen erzielt.

Tab. 4.11: Zusammensetzung des Standard-Enzymtests [183]

#	Komponente	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im Enzymtest	Volumen [μ l]
1	Flavinreduktase		Aktivität: 6,2 mU	variabel
2	FAD	1 mM	0,005 mM	1
3	Trp-5-Hal		/	100
4	0,01 M KPP, pH 7,2		/	variabel
5	NaCl	3 M	25,5 mM	1,7
6	L-Trp	5 mM	0,2 mM	8
7	NADH	50 mM	5 mM	20
			Summe	200

Für den Test wurden die angegebenen Komponenten in der dargestellten Reihenfolge pipettiert, wobei durch Zugabe von NADH die Halogenierungsreaktion initiiert wurde. Die Inkubation erfolgte anschließend für 30 min und 30 °C in einem Thermoschüttler (Fa. Eppendorf, Hamburg) bei 800 rpm. Zum Abbruch der Reaktion wurde der Testansatz in einen weiteren Thermoschüttler mit einer Temperatur von 95 °C überführt und für weitere 5 min inkubiert. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der Enzymtestansatz für 30 min bei RT mit 10.000 g von den denaturierten Proteinen befreit. Der Überstand wurde nachfolgend mit der im Anhang beschriebenen HPLC-Methode analysiert und die Menge an halogeniertem Tryptophan bestimmt (vgl. Kap. 6.9).

4.5.4.1 Vergleich der Chlorierung und Bromierung von Tryptophan

Um zu überprüfen, ob die verwendete Halogenase ein bestimmtes Halogenid beim Einbau in den aromatischen Ring der Aminosäure Tryptophan bevorzugt, wurde nach Vorlage des in Tab. 4.11 dargestellten Tests als Halogenidquelle eine 3 M Natriumchlorid-Lösung sowie eine 3 M-Natriumbromidlösung zum Testansatz addiert und dieser nach dem dort vorgegebenen Protokoll behandelt. Des Weiteren wurden die Halogenidquellen zu gleichen Anteilen gemischt und ebenso als Halogenidquelle mit äquimolaren Anteilen Cl^- und Br^- im Testansatz vorgelegt. Die mit Hilfe der in Kap. 6.9 beschriebenen HPLC-Methode erhaltenen Daten sind in Abb. 4.48 dargestellt.

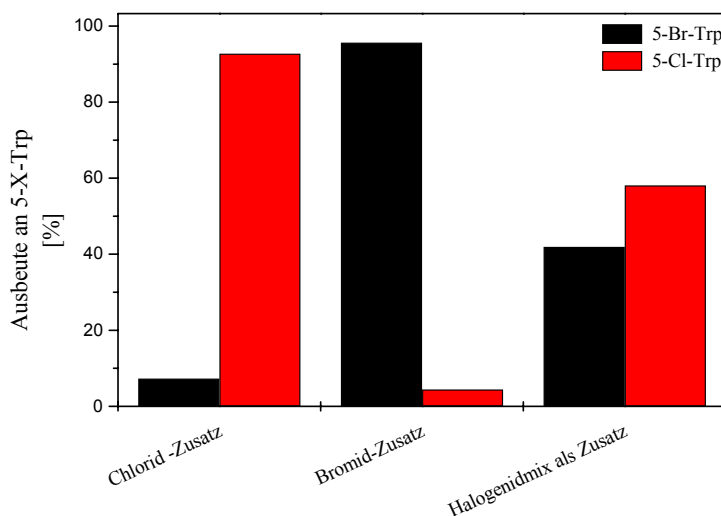


Abb. 4.48: Anteil der halogenierten Trp-Derivate im Enzymtest bei Verwendung von NaCl bzw. NaBr als Halogenidquelle sowie eines jeweiligen Anteils von 50 % der Stammlösungen in der Vorlage (eingesetzte Konzentration je 3 M); die Summe beider halogenierter Derivate bildet den 100%-Wert

Die erhaltenen Ausbeuten, unter Verwendung nur einer Halogenidquelle zeigen, dass in etwa ähnliche Gesamtausbeuten an erwünschtem halogeniertem Tryptophan erzielt werden konnten. Allerdings ist in beiden Fällen die Entstehung des analogen halogenierten Derivats unvermeidbar, obwohl die eingesetzten Testsubstanzen von p. a.-Qualität waren bzw. die verwendeten Enzymlösungen vor dem hier beschriebenen Test einem zweifachen Pufferaustausch unterzogen worden waren. Somit bewegt sich der jeweils unvermeidbare, unerwünschte Anteil des halogenierten Produkts im Bereich von 4–7 %. Da der Fehler dieser Methode bei 5 % liegt, ist allein anhand dieser Daten noch keine Präferenz des Enzyms für ein Halogenid erkennbar. Hierzu ist es notwendig, den dritten Datensatz aus Abb. 4.48 zu betrachten. Der Anteil, bei Vorlage von je 1,5 M beider Halogenidionen, führt zu einem um mehr als 15 % höheren Anteil an chloriertem Tryptophan, was auf eine leichte Präferenz des Enzyms hinsichtlich der Chlorierung des Substrats schließen lässt.

Aufgrund der günstigeren kommerziellen Verfügbarkeit des bromierten Derivats wurde jedoch für die Folgeversuche mit Bromid-Ionen als Halogenidquelle weitergearbeitet.

4.5.4.2 Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Halogenierung

Die Aktivität von Enzymen ist in der Regel sehr stark vom pH-Wert der Enzymumgebung abhängig. Basierend auf den von unserem Projektpartner (Arbeitsgruppe van Pée, TU Dresden) zur Verfügung gestellten Informationen wurden Halogenasen bislang unter Verwendung von Kaliumphosphatpuffer verschiedener Konzentration bei einem pH-Wert von 7,2 untersucht. Eine detailliertere Betrachtung der Enzymabhängigkeit bei verschiedenen pH-Werten wurde bislang nicht vorgenommen.

Aus diesem Grunde wird in diesem Kapitel das Auffinden des pH-Optimums durch Variation des pH-Werts des im Enzym-Assay eingesetzten Kaliumphosphatpuffers beschrieben. Die Untersuchung erfolgte zunächst innerhalb des Intervalls von pH 2–12 mit einer Schrittweite von eins. Nachfolgend wurde der pH des Assays in einem kleineren Intervall von pH 6–8 variiert. Da üblicherweise die Pufferwirkung einer vorgegeben Mischung einer Brönstedt-Säure mit einer Brönstedt-Base im Bereich des $pK_s \pm 1$ vorliegt, wurden hierbei teilweise Bereiche untersucht, bei denen man von dieser Vorgabe abwich. Üblicherweise werden deshalb bei solchen Untersuchungen verschiedene Puffersubstanzen verwendet, um einen Bereich zu umfassen, der diese Definition erfüllt. Jedoch können starke Wechselwirkungen bei einer Verwendung andersartiger Puffersubstanzen auftreten, weshalb diese Vorgehensweise vermieden wurde. Eine puffernde Wirkung ist schon anhand der vorgegebenen Konzentration und der Menge des eingesetzten 0,01 M Kaliumphosphatpuffers in Relation zu den anderen Komponenten des Halogenase-Assay gegeben.

Der Enzymtest erfolgte wiederum wie in Tab. 4.11 beschrieben, wobei das Volumen des Halogenase-Pools allerdings auf 10 μ L reduziert wurde, da das Eluat zuvor mit einem Zentrifugalkonzentrator (ViVaspin20; MWCO 30 kDa) auf ein Zehntel des ursprünglichen Volumens eingengt werden konnte. Die Bestimmung der Proteinkonzentration, die für die Ermittlung der spezifischen Aktivität nötig ist, erfolgte nach Whitaker und Granum (vgl. Kap. 6.5.2). Der Verlauf der pH-Wert-Abhängigkeit der spezifischen Aktivität im Bereich pH 2-12 ist in Abb. 4.49 dargestellt.

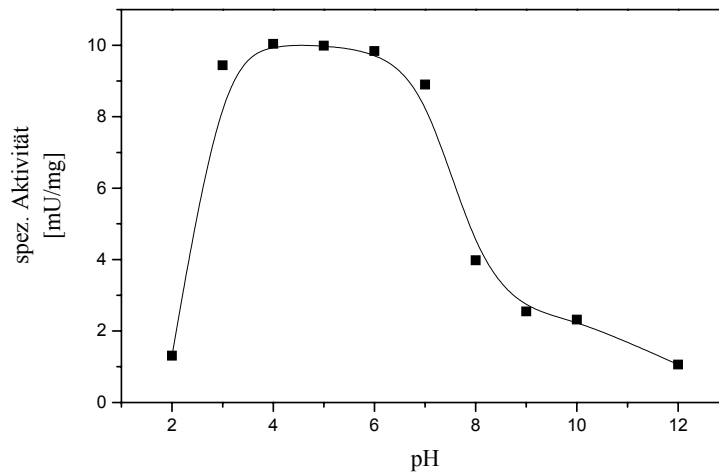


Abb. 4.49: Verlauf der Halogenase-Aktivität im pH-Intervall von pH 2–12

Die Abbildung weist ein Plateau mit fast gleich bleibender Aktivität im Intervall von pH 3–7 auf. Außerhalb dieser Grenzen führen Änderungen des pH-Werts zu einer sehr starken Verminderung der spezifischen Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase.

Die Betrachtung der Aktivität in einem kleineren Bereich von pH 6–8 bestätigt das drastische Absinken der Enzymaktivität bei pH-Werten > 7 (vgl. Abb. 4.50).

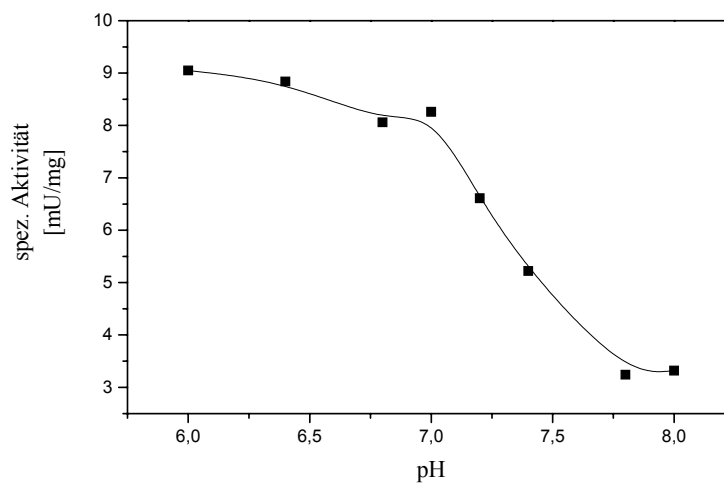


Abb. 4.50: Verlauf der pH-Wert-Abhängigkeit der Enzymaktivität im Intervall pH 6–8

Die zu beobachtende Abnahme der Halogenaseaktivität ab einem pH $> 7,6$ liegt offensichtlich an einer Ladungsänderung des Enzyms, wodurch eine Konformationsänderung des Enzyms resultiert. Die hier gezeigte pH-Toleranz bis pH ≈ 3 ist ungewöhnlich, dokumentiert jedoch, dass die Trp-5-Halogenase auch unter sauren Bedingungen stabil bzw. aktiv ist.

Der pH-Verlauf steht nicht im Widerspruch zu dem in Abb. 4.37 beschriebenen Mechanismus der enzymatischen Halogenierung. Da das Enzym bei geringen pH-Werten vermutlich eine stärkere positive Gesamtladung aufweist, kann ein Halogenid-Ion aufgrund seiner negativen Ladung leichter mit der Halogenase in Wechselwirkung treten als dies unter erhöhten pH-Werten ab $\text{pH} > 7,6$ der Fall ist. Somit wäre das eingesetzte Chlorid oder Bromid für die Vorgänge im aktiven Zentrum leichter verfügbar. Der eigentliche Mechanismus, der Hypohalogenit-Bildung im aktiven Zentrum selbst, bliebe davon jedoch direkt unbeeinflusst und kommt erst bei sehr stark vom Optimum abweichenden Werten durch die Denaturierung der Halogenase zum Erliegen.

Zur Gewährleistung einer besseren Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit ermittelten Daten mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe van Pée wurde für die folgenden Untersuchungen, falls nicht anders dargestellt, weiterhin der nur unwesentlich vom Optimum abweichende pH 7,2 verwendet.

4.5.4.3 Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Halogenase

Unter Anwendung des im vorherigen Abschnitt bestimmten pH-Wert-Optimums wurde nachfolgend der optimale Temperaturbereich des Enzyms innerhalb eines Intervalls von 20–30 °C bestimmt. Hierzu wurde erneut die in Tab. 4.11 dargestellte Zusammensetzung des Standardenzymtests verwendet, wobei aufgrund der in Kap. 4.5.4.2 erhaltenen Daten ein pH-Wert des Puffers von 6,2 eingestellt wurde. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei der jeweils vorgegebenen Temperatur. Die dabei erhaltenen relativen spez. Aktivitäten der Halogenase sind in Abb. 4.51 dargestellt. Der 100 %-Wert bezieht sich dabei auf die höchste erzielte Aktivität.

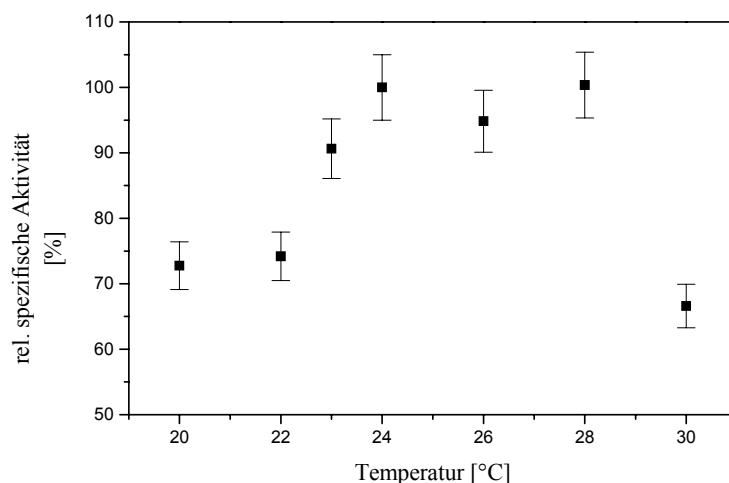


Abb. 4.51: Darstellung der relativen spezifischen Aktivität der Trp-5-Hal bei Variation der Temperatur im Intervall von 20–30 °C; als Referenz diente der bei 24 °C (und 28 °C) erhaltene Wert

Anhand der präsentierten Daten konnte somit das Temperaturoptimum der Tryptophan-5-Halogenase auf einen Bereich von etwa 23–28 °C eingegrenzt werden. Die üblicher-

weise für den Enzymtest verwendete Temperatur zeigte dagegen eine um ein Drittel reduzierte Aktivität der Halogenase im Vergleich zur optimalen Temperatur. Aufgrund dieser Daten wurde für weitere Versuche empfohlen, die zu verwendende Inkubationstemperatur abzusenken, was jedoch hinsichtlich des limitiert zur Verfügung stehenden Laborequipments nicht für alle Versuche realisierbar war. Deshalb sind bei nachfolgenden Versuchen verschiedene Inkubationstemperaturen verwendet worden. Eine Vergleichbarkeit der dabei realisierten Ergebnisse ist jedoch gewährleistet und äußert sich nur in geringeren spezifischen Ausbeuten für den Gesamtversuch.

4.5.4.4 Untersuchung der Halbwertszeit der Halogenase bei verschiedenen Temperaturen

Von besonderer Bedeutung ist eine nähere Betrachtung der Deaktivierung der verwendeten Halogenase bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen, weil hierdurch auch Aussagen hinsichtlich einer effizienten Anwendung für Prozesse in der Weißen Biotechnologie getroffen werden können. Neben der Temperatur wirken sich auch der pH-Wert der Enzymumgebung, die Ionenstärke, mechanisch wirkende Scherkräfte oder Detergenzien bzw. Schwermetallionen auf die Enzymstabilität aus. Da in dieser Arbeit mit einem etablierten Assay gearbeitet wird, spielt hauptsächlich die Inkubationstemperatur eine wichtige Rolle, die es zu untersuchen gilt. Bereits im vorigen Kapitel wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationstemperatur beschrieben. Hintergrund dieses Kapitels ist die Untersuchung des Aktivitätsverlusts der Halogenase in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur. Zunächst wird daher kurz auf die Deaktivierung eines Enzyms eingegangen [184].

Im einfachsten Modell der Enzymdeaktivierung wird das aktive Enzym E_a durch eine irreversible Transformation in den deaktivierten Zustand E_i überführt:



Die Deaktivierungsrate wird dabei üblicherweise als Reaktion erster Ordnung bezogen auf die Enzymkonzentration $[E_a]$ betrachtet:

$$r_d = k_d \cdot [E_a] \quad (4.14)$$

Dabei ist r_d die Deaktivierungsgeschwindigkeit, $[E_a]$ die Konzentration an aktivem Enzym und k_d die Deaktivierungskonstante. Für ein geschlossenes System, bei dem die Enzymdeaktivierung der einzige Prozess ist, der eine Verminderung der Enzymkonzentration bewirkt, gilt somit:

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = r_d = k_d [E_a] \quad (4.15)$$

Die Integration von Gl. (4.15) liefert dann folgenden Ausdruck für die Konzentration an aktivem Enzym als Funktion der Zeit:

$$[E_a] = [E_a]_0 \cdot e^{-k_d t} \quad (4.16)$$

mit $[E_a]_0$ als Enzymkonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$. Nach dem Logarithmieren von Gl. (4.16) folgt:

$$\ln[E_a] = \ln[E_a]_0 - k_d t \quad (4.17)$$

wobei durch Auftragung der Enzymaktivität gegen t eine Gerade mit der Steigung k_d resultiert.

Die Bestimmung der Halbwertszeit t_h des Enzyms, also die Zeit, bei der das Enzym die Hälfte seiner Aktivität verloren hat, kann nach Bestimmung von k_d durch Substitution von $[E_a]$ durch $[E_a]_0/2$ in Gl. (4.16) erfolgen:

$$t_h = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (4.18)$$

Zur Ermittlung des Aktivitätsverlusts und somit der Deaktivierungskonstante wurde ein Rohextrakt verwendet, der mit Hilfe der in Kap. 4.5.3 verwendeten Bedingungen mittels einer Ultraschallsonde erzeugt wurde. Dies war notwendig, da der Rohextrakt in seiner nativen Form, d. h. ohne zusätzliche Agentien, wie es beim enzymatischen Aufschluss der Fall gewesen wäre, eingesetzt werden sollte. Dieser Rohextrakt wurde schließlich bei 0 °C, RT (hier 18 °C) und 30 °C gelagert und nach jeweils einer Stunde mit Hilfe der in Tab. 4.11 dargestellten Zusammensetzung des Standard-Enzymtests auf seine Aktivität überprüft. Die hierbei ermittelte Abnahme der Enzymaktivität der Tryptophan-5-Halogenase ist in Abb. 4.52 aufgeführt.

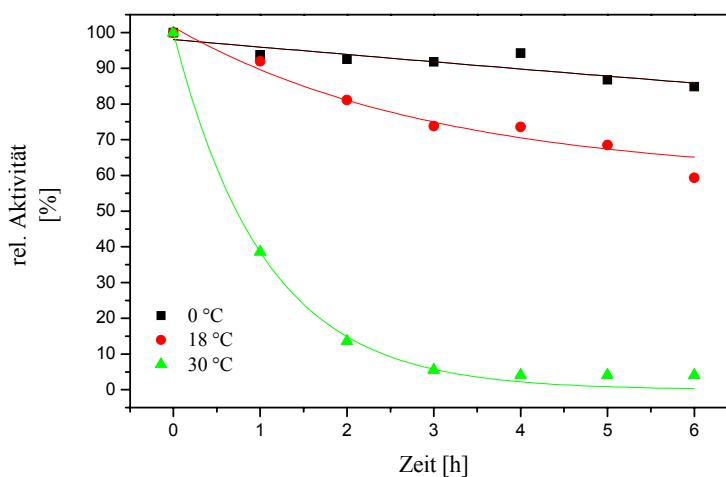


Abb. 4.52: Abhängigkeit der Halogenaseaktivität von der Lagerungstemperatur bei 0 °C, 18 °C und 30 °C

Abb. 4.52 zeigt, dass die Temperatur einen signifikanten Einfluss auf die Stabilität der Halogenase hat. Wird diese bei der für den Enzymtest verwendeten Temperatur gelagert, ist bereits nach etwa 3 h kaum noch Aktivität vorhanden. Eine Lagerungstemperatur von 18 °C führt hingegen zu einem deutlich geringeren Aktivitätsverlust. So ist innerhalb des Versuchzeitraumes von 6 h eine Abnahme auf etwa 70 % der ursprünglich

vorhandenen Aktivität zu detektieren. Das bei 0 °C aufbewahrte Enzym erfährt im Vergleich dazu lediglich eine Verminderung der Aktivität um etwa 10 %. Die nach Gl. (4.17) ermittelten Halbwertszeiten und Deaktivierungskonstanten sind in Tab. 4.12 aufgeführt.

Tab. 4.12: Ermittelte Parameter für die Deaktivierung der Tryptophan-5-Halogenase im Rohextrakt nach Ultraschallaufschluss

Temperatur	k_d	t_h
0 °C	$3,75 \cdot 10^{-4}$ [min ⁻¹]	1848,4 [min]
RT	$1,34 \cdot 10^{-3}$ [min ⁻¹]	517,3 [min]
30 °C	$1,62 \cdot 10^{-2}$ [min ⁻¹]	42,8 [min]

Von besonderer Bedeutung ist die Deaktivierung des Enzyms bei der für den Enzymtest gewählten Temperatur von 30 °C: schon während der Inkubationsdauer von 30 min ist ein drastisches Absinken der Halogenaseaktivität zu vermuten, weshalb im Einklang zum vorigen Kapitel eine verringerte Inkubationstemperatur für den Assay empfohlen wird. Dies konnte jedoch, aufgrund der nur begrenzt zur Verfügung stehenden Kapazitäten, nicht generell realisiert werden.

Anhand des vorliegenden Datensatzes kann zudem eine sehr grobe Abschätzung der Aktivierungsenergie für die Deaktivierung E_A sowie des präexponentiellen Faktors A aus der Arrhenius Gleichung (vgl. (4.19)) vorgenommen werden.

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (4.19)$$

Hierfür wurde in einem Arrhenius-Plot der Logarithmus $\ln k$ gegen $1/T$ aufgetragen, wobei lediglich die Lagerungstemperatur von 0 °C sowie bei 30 °C mit in die Auswertung einfließt, da der bei RT erhaltene Wert vermutlich nicht die notwendige Temperaturkonstanz besaß bzw. die Raumtemperatur leicht um ± 1 °C differieren kann. Die dabei resultierende Gerade ($y = 24,03 - 9909,11 x$) besitzt eine Steigung von E_A/R , mit R als idealer Gaskonstante. Die mit Hilfe dieser Methode berechneten Arrhenius-Parameter sind in Tab. 4.13 dargestellt.

Tab. 4.13: Ermittelte Arrhenius-Parameter der Trp-5-Halogenase aus *P. fluorescens*

Parameter	Wert
A	$2,1 \cdot 10^{10}$ s ⁻¹
E_A	86,4 kJ/mol

Diese Werte müssen jedoch vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass sie statistisch nicht abgesichert sind und hierfür weitere Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturen durchzuführen wären. Allerdings liegen die ermittelten Werte durchaus im üblichen Wertebereich für biologische Reaktionen und geben das Temperaturverhalten

wieder. Beispielsweise kann der präexponentielle Faktor als Zahl der Stöße interpretiert werden, welche insgesamt stattfinden und das Produkt mit dem Exponentialfaktor gibt schließlich die Zahl der Stöße mit ausreichender Energie für die Deaktivierung an. Der für die Deaktivierungsenergie berechnete Wert von 86,4 kJ/mol beschreibt, dem beobachteten Aktivitätsverlust entsprechend, eine bei Raumtemperatur signifikante Rate für die Deaktivierungsreaktion.

4.5.4.5 Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Tryptophan-5-Halogenase

Basierend auf dem in Abb. 4.37 dargestellten Mechanismus einer Tryptophan-7-Halogenase wird die Hypothese vertreten, dass die in dieser Arbeit zu untersuchende Tryptophan-5-Halogenase einen analogen Reaktionsablauf aufweist. Dabei generiert die dem Enzymtest hinzuaddierte Flavinreduktase aus *E. coli* das für die Halogenierungsreaktion notwendige FADH_2 , welches unter Luftenwirkung zum Flavinhydroperoxid weiterreagieren kann. Aufgrund des spontanen Zerfalls des Hydroperoxids in Wasserstoffperoxid und FAD kann die Halogenase eventuell durch das freigesetzte H_2O_2 irreversibel inhibiert werden. In diesem Zusammenhang wurde für die nach Kap. 4.5.3 aufgereinigte Trp-5-Halogenase im Standard-Enzymtest eine Stoffmenge von Wasserstoffperoxid im Bereich von 0–117 μmol eingestellt und der Assay bei den in Kap. 4.5.4 genannten Bedingungen inkubiert ($c(\text{Trp-5-Hal}) = 1,25 \text{ mg/mL}$). Die in Abhängigkeit vom Molverhältnis Wasserstoffperoxid / Halogenase resultierende spez. Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase ist in Abb. 4.53 dargestellt.

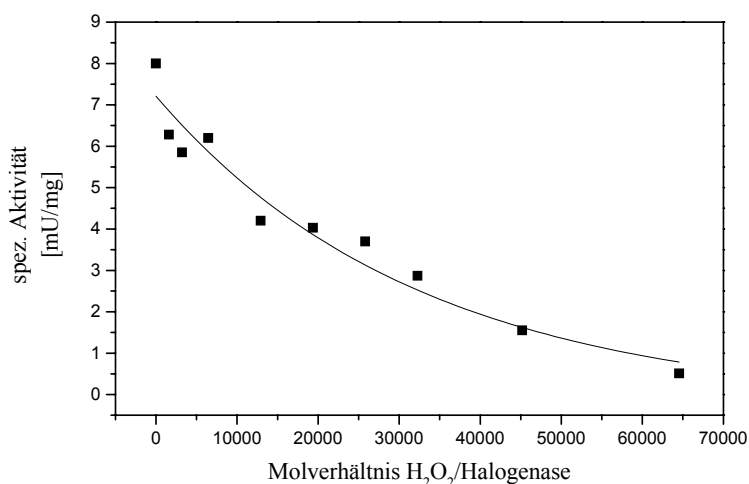


Abb. 4.53: Wasserstoffperoxid-Toleranzkurve der Trp-5-Halogenase [179]

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, resultiert durch die Wasserstoffperoxid-Addition zum Enzymtest eine Abnahme der spezifischen Aktivität des Enzyms. Diese fällt allerdings sehr moderat aus. So werden bei einem fast 10000-fachen Überschuss an Wasserstoffperoxid immerhin noch 50 % der ursprünglichen Aktivität detektiert. Mit zunehmender Konzentration an Oxidationsmittel fällt die Aktivität bis auf Null ab, was

damit begründet werden kann, dass immer mehr aktive Stöße des Peroxids mit der Halogenase stattfinden, die direkt das aktive Zentrum betreffen und das Enzym inaktivieren. Da die Halogenase im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Stabilität für einen möglichen technischen Prozess optimiert werden sollte, wurde für nachfolgende Versuche der Zusatz des Enzyms Katalase (E.C. 1.11.1.6, vgl. auch Kap. 6.4.5) zum Standard-Enzymtest empfohlen, um aktivitätsmindernde Wechselwirkungen zwischen der Halogenase und dem Wasserstoffperoxid ausschließen zu können. Dieses Enzym ist in der Lage, entstandenes H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff umzuwandeln.

Eine Optimierung des Zusatzes an Katalase zum Enzymtest wurde nachfolgend durchgeführt und ist in Kap. 4.5.5 beschrieben.

4.5.4.6 Charakterisierung der Halogenase mit Hilfe der 2-D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der 2-D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich Proteine hinsichtlich ihres pI-Werts, ihrem Molekulargewicht, ihrer Reinheit und nach dem Vorhandensein von Isoformen charakterisieren. Bei dieser Methode werden zwei weit verbreitete Methoden miteinander verknüpft: die isoelektrische Fokussierung (IEF) und die SDS-PAGE.

Bei der IEF werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt, dem pI-Wert, aufgetrennt. Der pI-Wert eines Proteins ist über den pH-Wert definiert, bei dem das gesamte Protein als Summe seiner Nettoladungen, die durch die Aminosäureketten hervorgerufen werden, Null beträgt (vgl. Abb. 4.54).

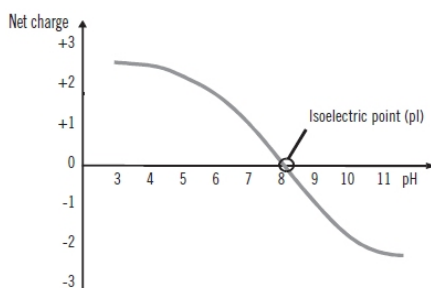
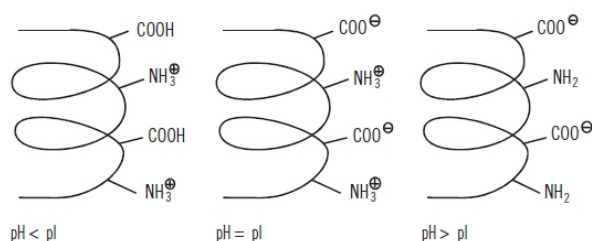


Abb. 4.54: Nettoladung eines Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung [185]

Wird an einen pH-Gradienten ein elektrisches Feld angelegt, so wandert das jeweilige Protein so weit, bis es den pH-Wert erreicht hat, an dem seine Nettoladung verschwindet. Es handelt sich dabei also um eine elektrophoretische Endpunktmethode. Der pI-

Wert eines Proteins ist eine charakteristische Größe und erlaubt Aussagen über den Ladungszustand der Proteine in bestimmten Systemen zu treffen. Die Güte der Auflösung der Fokussierung in dieser ersten Dimension wird von der Steigung des pH-Gradienten und der angelegten Feldstärke bestimmt. Üblicherweise wird für die IEF eine Spannung von 1.000 V angelegt, wobei nach erfolgter Fokussierung ein Absinken der Stromstärke auf Werte < 1 mA beobachtet wird. Dies liegt daran, dass die Ladungsträger im elektrischen Feld ihre Endposition erreicht haben und somit die ionische Bewegung im Feld annähernd komplett unterbunden wird.

Zur Erhöhung der Auflösung wird allgemein das Arbeiten unter denaturierenden Bedingungen empfohlen, um eine Aggregation von Proteinen sowie weitere intermolekulare Wechselwirkungen zu vermeiden. Dies erfolgt in der Regel durch Zugabe von Harnstoff, Dithiothreitol oder zwitterionischen Detergenzien. Als Matrix für die IEF kommen so genannte immobilisierte pH-Gradienten (IPG) zum Einsatz. Dabei handelt es sich um kovalent gebundene Immobiline, die an Acrylamidmonomere gebunden sind und aufgrund ihrer sauren oder basischen Gruppen für die Ausbildung des pH-Gradienten verantwortlich sind.

Die zweite Dimension, die Polyacrylamid-Gelelektrophorese, erlaubt schließlich die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Auch hier wird, wie bei der IEF, unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet. Da Harnstoff jedoch bei dieser Auftrennung stört, muss es vorher abgetrennt werden. Die Denaturierung erfolgt durch Addition von Dithiothreitol, die Alkylierung der Cysteinreste mit Iodacetamid. Das nachfolgend hinzugesetzte Natrium-Dodecylsulfat (engl. SDS) bewirkt eine Überdeckung der Eigenladung der Proteine. Die somit gebildeten anionischen Komplexe besitzen eine annähernd konstante negative Nettoladung pro Masseinheit, so dass eine elektrophoretische Auftrennung aufgrund des Molekulargewichts möglich ist. Markerproteine, die analog der zu untersuchenden Probe vorbehandelt werden, ermöglichen schließlich die Identifizierung des Molekulargewichts der Probenproteine.

Für die Charakterisierung der Tryptophan-5-Halogenase wurde das Enzym wie in Kap. 4.5.3 beschrieben bis zur Homogenität aufgereinigt und durch zweimaligen Pufferaustausch die Salzkonzentration verringert. Für die Auftrennung in der 2-D-PAGE wurden 30 μ L aufkonzentrierte Halogenase mit einer Proteinkonzentration von 4 mg/mL verwendet. Zu dieser Proteinlösung wurden 20 μ L einer Proteinmarkerlösung addiert (Proteinmenge 13 μ g) und die erhaltene Lösung mit 290 μ L Rehydrierungspuffer (vgl. Kap. 6.5.4) vereint. Die Rehydrierungslösung wurde vor ihrer Verwendung mit DTT versetzt (2,8 mg auf 1 mL-Lösung). Die Rehydrierung erfolgte anschließend über Nacht, wobei die Probenaufnahme automatisch durch einen hinzugefügten 18 cm langen IPG-Streifen (Fa. Amersham Biosciences, pH 3–10) erfolgte.

Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgte mit Hilfe des in Tab. 4.14 dargestellten Stufenprofils der Spannung, die an den rehydrierten IPG-Streifen bei 20 °C mit Hilfe des Multiphor-II-Geräts (Fa. GE Healthcare) angelegt wurde.

Tab. 4.14: Programm des Power Supply EPS 3501 für die Multiphor II (Fa. GE Healthcare)

Phase	U [V]	I [mA]	t [h]	P [W]
I*	500	1	0,017	5
II	500	1	5	5
III*	3500	1	5	5
IV	3500	1	9,5	5

*die angegebene Spannung wird innerhalb der angegebenen Zeit mit Hilfe eines linearen Gradienten eingestellt

Anschließend wurde der IPG-Streifen zunächst für 15 min in 10 mL Equilibrierungspuffer (vgl. Kap. 6.5.4), dem 100 mg DTT supplementiert waren, inkubiert. Nach Überführung des Streifens in 10 mL Equilibrierungspuffer, der 250 mg Iodacetamid enthielt, erfolgte eine weitere Inkubation für 15 min. Um überschüssige Pufferlösung zu entfernen, wurde der Streifen nachfolgend auf ein mit $H_2O_{\text{bidest.}}$ befeuchtetes Filterpapier gelegt.

Für die Auftrennung in der zweiten Dimension kam ein 12,5%iges Polyacrylamidgel (Excelgel™ 2-D Homogeneous, Fa. GE Healthcare) zum Einsatz, bei dem die Probenauftragung durch das Aufbringen eines IPG-Streifens erfolgte. Für die Auftragung der Markerproteine wurde ein mit 10 μL Markerprotein (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fa. Fermentas) getränktes Filterpapier auf das Gel gelegt und nach Arretierung der Anode und Kathode das Laufprogramm S 2 gestartet (vgl. Tab. 4.15). Nach Abschluss des Laufprogramms wurde der IPG-Streifen entfernt und der Kathodenstreifen dichter an die Lauffront gelegt. Anschließend wurde das Laufprogramm S 3 initiiert.

Tab. 4.15: Programm des Netzteils bei der Durchführung der SDS-PAGE

Programm	Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Leistung [W]	Zeit [min]
S 2	120	20	30	40
S 3	600	50	30	70

Die bei der IEF eingesetzten Markerproteine sind mit ihrem pI und Molekulargewicht in Tab. 4.16 dargestellt.

Tab. 4.16: Verwendete pI-Markerproteine in der 2-D-SDS-PAGE

Protein	Proteinname	pI-Wert	Molekulargewicht [kDa]
A	Amyloglucosidase	3,5	97
B	Carboanhydratase (Human)	6,55	29
C	Muskeleiweiß (Pferd)	7,35	16,95
D	Saures Lectin (<i>Lens culinaris</i>)	8,15	23,3
E	Trypsinogen	9,3	25

Da Vorversuche dokumentierten, dass eine Anfärbung des Gels mit Coomassie Blue nicht sensitiv genug war, wurde das Gel mit Silbernitrat angefärbt (vgl. Kap. 6.5.4). Das dabei resultierende Elektropherogramm ist in Abb. 4.55 dargestellt.

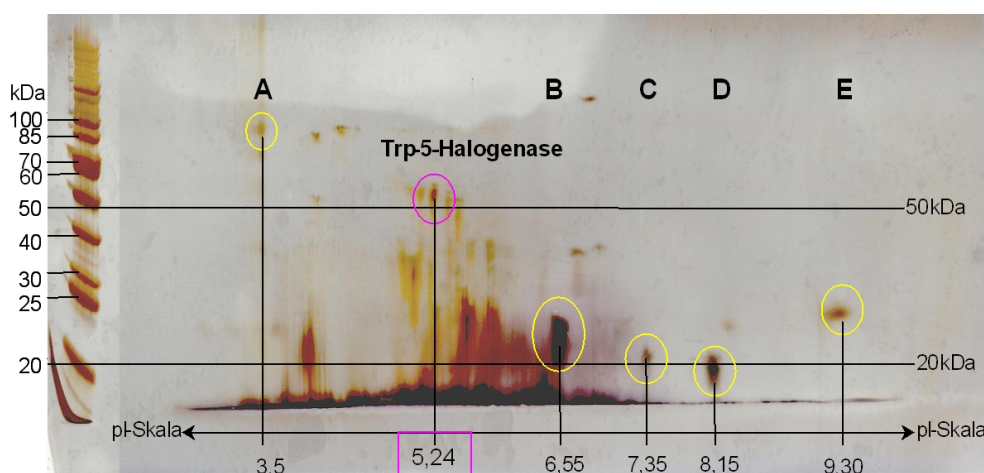


Abb. 4.55: Silbernitrat gefärbtes Polyacrylamidgel nach der Auftrennung in der zweiten Dimension; gelb dargestellt sind die Markerproteine [179]

Die Tryptophan-5-Halogenase ist im Elektropherogramm sehr gut sichtbar und das einzige Protein, welches im Bereich zwischen 50–60 kDa zu finden ist. Weitere Spots in diesem Bereich indizieren, dass die Halogenase in mehreren Isoformen vorliegt, welche sich leicht im pI unterscheiden. Orientiert man sich an der deutlichsten Färbung im Bereich der Halogenase-Isoformen, erhält man einen pI-Wert von 5,24. Die Identifizierung erfolgte dabei über die Linearität der isoelektrischen Fokussierung der eingesetzten Markerproteine. Der mit Hilfe dieser Methode ermittelte Wert stimmt recht genau mit dem allein aufgrund der vorhandenen Aminosäuresequenz berechneten pI-Wert von 5,47 überein [186]. Das mit Hilfe des Gels dokumentierte Molekulargewicht liegt in etwa bei 60 kDa. Basierend auf der Sequenz des Fusionsproteins müsste rein theoretisch ein Molekulargewicht von 61.800 resultieren. Solche Abweichungen sind jedoch in der Praxis nicht auszuschließen. So weisen die eingesetzten pI-Markerproteine im SDS-Gel ebenso von den Herstellerangaben differierende Molekulargewichte auf.

4.5.4.7 Untersuchung der Halogenaseexpression im Schüttelkolben und Bioreaktor

Von besonderer Bedeutung bei der Gewinnung eines Zielproteins ist neben dem Auffinden und Aufrechterhalten der optimalen Umgebungsbedingungen ebenso die Untersuchung der Expressionsbedingungen und das Auffinden des optimalen Erntezeitpunkts. Aus diesem Grunde war zunächst das Expressionsprofil in Schüttelkulturen zu untersuchen sowie ob gegebenenfalls die Expression der Tryptophan-5-Halogenase durch Zugabe von Tryptophan zum Fermentationsmedium induziert werden kann. Anschließend sollte ein Transfer der im Schüttelkolben als optimal aufgefundenen Parametereinstellungen auf eine Fermentation in einem Bioreaktor vorgenommen und das Expressionsverhalten der rekombinant exprimierten Halogenase beschrieben werden.

Zur Überprüfung, ob eine Induktion der Tryptophan-Halogenase möglich ist, wurden parallel zwei Fermentationsreihen durchgeführt, wobei die Referenzkultur analog zu den in Kap. 4.5.3. beschriebenen Bedingungen fermentiert und ein weiterer Ansatz mit einer zuvor eingestellten Tryptophankonzentration im Medium von 0,06 mM unter äquivalenten Bedingungen inkubiert wurde. Dieser Zusatz an Tryptophan wurde hinsichtlich der im Standard-Enzymtest eingesetzten Konzentration der aromatischen Aminosäure gewählt. Die Kultivierung erfolgte jeweils mit einem duplizierten Ansatz um eine Doppelbestimmung zu ermöglichen. Von beiden jeweils parallel fermentierten Ansätzen wurden nach 24 h, 48 h und 72 h 100 mL der Zellsuspension abgenommen und nach dem in Kap. 4.5.3 beschriebenen Verfahren abzentrifugiert und gewaschen. Mit Hilfe des Ultraschallaufschlusses wurde bei 4 °C die Halogenase freigesetzt und der nach Zentrifugation bei 4 °C, 10.000 g für 30 min erhaltene Rohextrakt für den Standard-Enzymtest eingesetzt. Die hierbei ermittelten rel. Aktivitäten sowie die bei der Fermentation erhaltenen Optischen Dichten in der Referenzkultur und der Induktionskultur sind in Abb. 4.56 dargestellt.

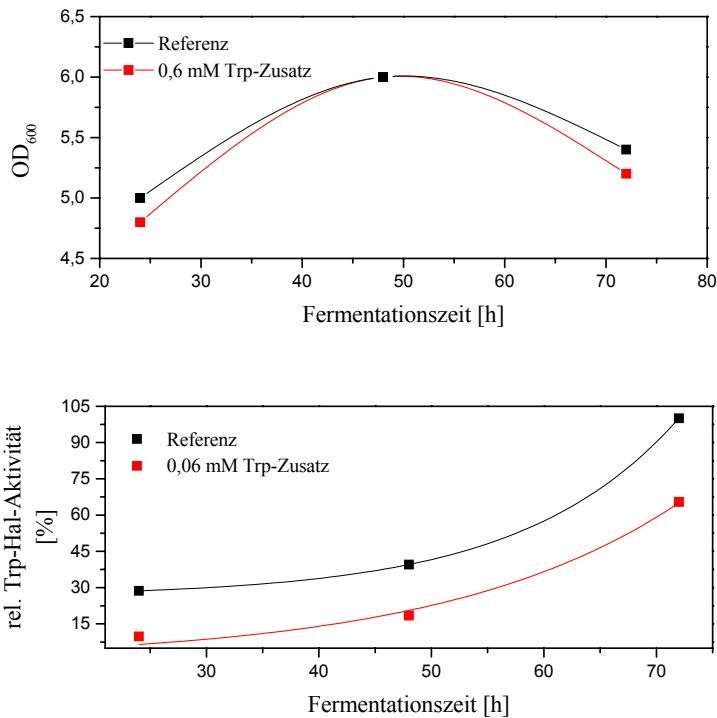


Abb. 4.56: Verlauf der Optischen Dichte und der relativen Halogenase-Aktivität im Rohextrakt nach Ultraschallaufschluss und Verwendung des Standard-Enzymtests; als Referenz diente der nach Standard-Bedingungen bei 30 °C für 72 h inkubierte Fermentationskolben (1,5 L in 5 L-Erlenmeyerkolben)

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Supplementierung von Tryptophan einer im Standard-Enzymtest entsprechenden Konzentration keine Induktion der Tryptophan-5-Halogenase ermöglicht. Der Zusatz von Tryptophan zum Fermentationsmedium führt sogar eher zu einer Inhibierung des Wachstums wie auch der Enzymaktivität. Nach Abschluss der Fermentation wurde ein um 40 % geringerer Wert der spez. Enzymaktivität detektiert. Erhaltene Daten nach einer Fermentationszeit von weiteren 24 h wurden aufgrund bereits einsetzender Zellyse nicht weiter verarbeitet. Ein Vergleich der erzielten Biomassekonzentrationen, welche durch die OD₆₀₀ repräsentiert werden, zeigt dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen kultivierten *P. fluorescens*-Zellen. Eine generelle Aussage, ob eine Induktion nicht möglich ist, kann jedoch aufgrund der Tatsache, dass lediglich eine Konzentration an Tryptophan untersucht wurde, nicht getroffen werden. Da die eingesetzte Tryptophankonzentration mit 60 µM unter physiologischen Gesichtspunkten als gering einzuschätzen ist, wurde vom Einsatz geringerer Konzentrationen im Induktionsversuch abgesehen, so dass für die Übertragung der Fermentation in einen Bioreaktor eine analoge Einstellung von pH und Temperatur sowie das HNB-Medium ohne Tryptophanzusatz verwendet wurde.

Als Fermentersystem wurde ein Biostat[®]C der Fa. B. Braun mit einer Mikro-DCU als Steuereinheit sowie einem *in situ* sterilisierbaren Kessel mit einem Arbeitsvolumen von

10 L verwendet. Das Verhältnis von Durchmesser zu Höhe entsprach $d : h = 1 : 3$. Mit Hilfe eines Mass-Flow-Controllers konnte der für die Fermentation notwendige Volumenstrom eingestellt werden. Als Rührwerk im Reaktor dienten drei Scheibenrührer ($\varnothing 75$ mm), die über eine doppelte Gleitringdichtung mit der Rührwelle gekoppelt waren. Der Antrieb der Rührerwelle erfolgte über einen Elektromotor mit bürstenfreiem Antrieb. Die Installation der Sonden (pH, pO_2 , beide Fa. Mettler-Toledo) erfolgte über 25 mm Standardports in der Kesselwand. Die Detektion der Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration im Abgas erfolgte mit Hilfe eines implementierten Systems der Firma Hartmann und Braun (URAS 10-E), wobei die Messdaten über einen als A/D-Wandler fungierenden Multiplexer (G-MUX 4 / MUX 100, Fa. B. Braun) an das Datenaufnahmesystem (RISP-System, Institut für Technische Chemie Universität Hannover) weitergeleitet wurden.

Vor Beginn der Kultivierung wurde der Reaktor mit 10 L HNB-Medium befüllt, mit den entsprechenden Sonden bestückt und 1 mL des Antischaummittels Desmophen 3900 (Fa. Bayer, Leverkusen) hinzuaddiert. Eine Kalibration der pH-Elektrode wurde vor dem Einbau in den dafür vorgesehenen Stutzen vorgenommen. Die *in situ* Sterilisation erfolgte anschließend mit Hilfe von Prozessdampf für 20 min bei 121 °C, wobei während des Sterilisationsprozesses die Nullpunktkalibration der pO_2 -Elektrode durchgeführt wurde. Der 100 %-Wert wurde nach Abschluss der Sterilisation bei den Prozessbedingungen (30 °C, 1 vvm, 500 rpm) kalibriert. Nach dem Einstellen der Tetracyclinkonzentration auf Tet₃₀ wurde der Reaktor mit einem Volumenprozent einer nach Kap 4.5.3 vorbereiteten Vorkultur beimpft. Die Probenahme erfolgte über ein an der Unterseite des Reaktors angebrachtes Ventil. Der Verlauf der Prozessparameter sowie der zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt ermittelten Aktivität der Trp-5-Halogenase im Rohextrakt nach Ultraschallaufschluss ist im Detail in Abb. 4.57 dargestellt.

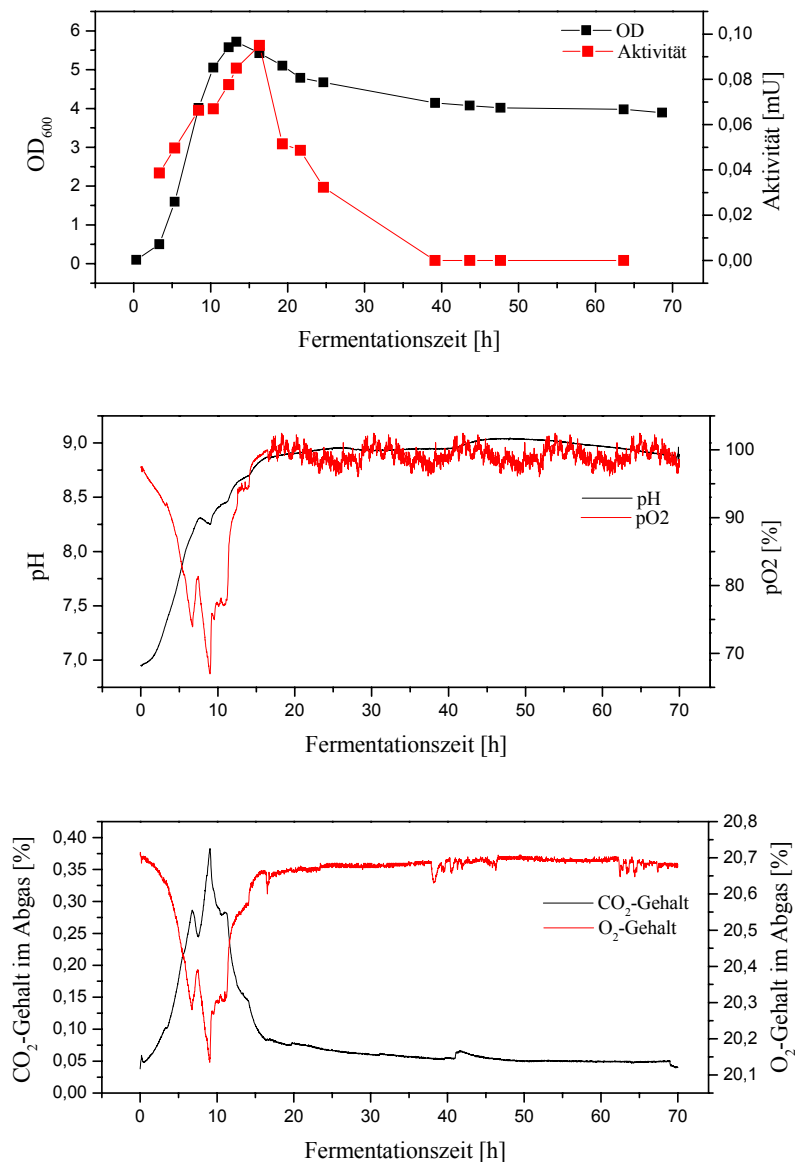


Abb. 4.57: Verlauf der Zellkonzentration von *P. fluorescens*, der zum jeweiligen Zeitpunkt ermittelten Aktivität der Halogenase im RE nach Ultraschallaufschluss sowie des pH- und des pO₂-Werts bzw. der Konzentrationen von Sauerstoff und Kohlendioxid im Abgas während der Bioreaktorkultivierung

Die Kultivierung im Bioreaktor zeigte dabei einen komplett anderen Verlauf hinsichtlich der Produktion an Biomasse und an aktivem Enzym im Vergleich zum Schüttelkolben. So wird das Maximum der OD₆₀₀ bereits nach etwa 15 h erreicht und gleichzeitig die höchste Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase detektiert. Die Expression des Enzyms scheint demzufolge wachstumsgekoppelt zu erfolgen. Mit dem Eintritt in die stationäre Phase wurde eine deutliche Verminderung der Aktivität an isolierter Halogenase beobachtet, so dass nach ca. 40 Fermentationsstunden kaum Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Anhand der Prozessdaten für die Gelöstsauerstoffkon-

zentration wie auch anhand der Daten aus der Abgasanalytik lässt sich zudem ermitteln, dass die Expression zum Zeitpunkt erhöhter Stoffwechselaktivität erfolgt. Überwiegt der Erhaltungsstoffwechsel, erkennbar durch die auf Normalniveau zurückgehende Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration, scheint dieser Effekt mit einer Inhibierung der Enzymsynthese korreliert zu sein. Eine weitere Hypothese, die ein Absinken der Halogenaseexpression/-aktivität erklärt, lässt sich in Anlehnung an den während der Fermentation beobachteten pH-Verlauf entwickeln. Mit dem Eintritt in die stationäre Phase steigt die Wasserstoffionenkonzentration in der Fermentationsbrühe um fast zwei Zehnerpotenzen an, ausgedrückt durch den Anstieg von pH 7 auf pH 9. Somit liegt im Reaktor ein pH vor, dessen Anwendung im Standard-Enzymtest die Aktivität des halogenierenden Enzyms auf ein Minimum reduziert. Allerdings findet im Schüttelkolben ein analoger Anstieg des pH-Werts statt, weshalb für das unterschiedliche Expressionsverhalten weitere Gründe zu diskutieren sind.

Während bei der Kultivierung im Schüttelkolben auf eine Addition eines Antischaummittels verzichtet wurde, muss dieses zwangsweise bei der Reaktorfermentation hinzugefügt werden, weil sonst durch die Begasung eine enorme Schaumbildung initiiert wird und die Gefahr der Kontamination des Reaktorguts infolge feucht werdender Abluftfilter besteht. Im Rahmen von Voruntersuchungen konnte ein Einfluss des Antischaummittels auf die Expression jedoch ausgeschlossen werden.

Von Bedeutung ist vermutlich die mangelnde Sauerstoffversorgung der *Pseudomonas*-Zellen in den Schüttelkolben, da sich bereits nach wenigen Stunden bei der verwendeten Schüttelgeschwindigkeit von 100 rpm eine komplette Bedeckung der Flüssigkeitsoberfläche mit Schaum einstellt, wodurch der Sauerstofftransport in die Zellsuspension limitiert wird. Da im Schüttelkolben die Expression erst innerhalb der stationären Phase ihr Maximum erreicht, könnten Versuche mit unterschiedlich gefahrenen Sauerstoffprofilen weitere Hinweise liefern, die den Sauerstoffeinfluss auf die Expression belegen könnten. Der Fokus dieser Arbeit lag jedoch auf der Charakterisierung der Halogenase sowie der Optimierung der Parameter für den Enzymtest, weshalb in diese Richtung keine weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden. Zudem sollten vom Projektpartner induzierbare Stämme für die Trp-Halogenase-Produktion bereitgestellt werden, die eine solche Untersuchung obsolet gemacht hätten.

Ein Vergleich der im Schüttelkolben und Bioreaktor ermittelten Expressionsprofile ist zusammenfassend in Abb. 4.58 dargestellt.

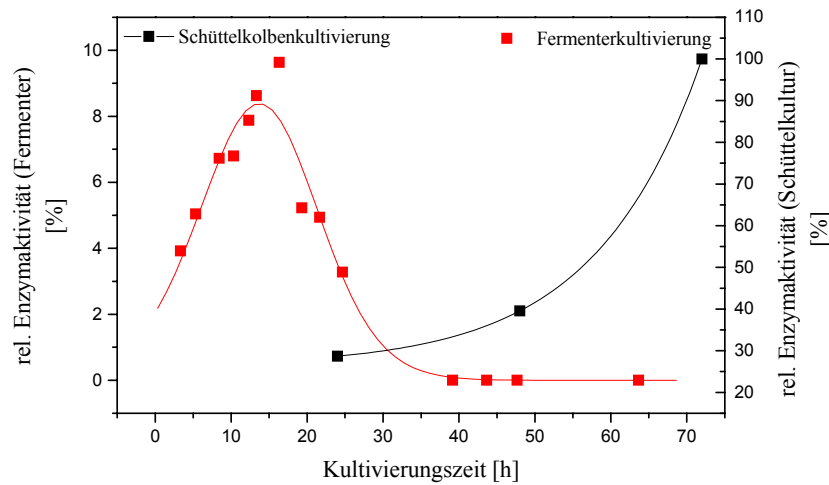


Abb. 4.58: Expressionsverhalten bzw. Aktivität der zu verschiedenen Zeiten isolierten Trp-5-Halogenase im Rohextrakt nach Ultraschallaufschluss von Schüttelkultur vs. Kultivierung im Bioreaktor, dargestellt durch die relativen Aktivitäten des Enzyms; als Referenzwert diente der ermittelte Wert der Halogenaseaktivität im Schüttelkolben nach 72 h

Den hier beschriebenen Versuchen zur Charakterisierung der Halogenase folgten eine Optimierung des Halogenase-Assays sowie eine genauere Betrachtung der Kinetik des isolierten Enzyms, was Gegenstand des sich anschließenden Kapitels ist.

4.5.5 Anwendung eines Genetischen Algorithmus zur Optimierung der Zusammensetzung des Halogenase-Assays

Genetische Algorithmen haben sich sowohl in der Literatur als auch bei vorangegangenen Arbeiten als empfehlenswertes Tool erwiesen, wenn Optimierungen in verschiedenartigen Suchräumen durchzuführen sind. Hinsichtlich der Arbeit mit der Tryptophan-5-Halogenase bietet sich daher die Anwendung der in Kap. 4.1.2 beschriebenen Genetischen Algorithmen zur Optimierung der Zusammensetzung des verwendeten Aktivitäts-Assays an, da dieser neben der Bestimmung der Aktivität der Halogenase ebenso der Produktion an halogeniertem Tryptophan dient und in der dargestellten Zusammensetzung für einen Produktionsprozess angewendet werden müsste.

Basierend auf dem in Tab. 4.11 dargestellten Standard-Enzymtest mit fünf als variabel einzustellenden Parametern soll dieser für die Optimierung um einen Zusatz an Katalase erweitert werden, womit insgesamt ein 6-dimensionales Suchproblem durch den Algorithmus bearbeitet werden sollte. Die Variationen der zu optimierenden Enzymtest-Komponenten sind in Tab. 4.17 aufgeführt. Ebenso wie bei den anderen Optimierungen, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist als Parametereinstellung für die Generationslücke der Wert 1 gesetzt worden, damit jeweils nur eine Generation hinsichtlich der Parametereinstellung bewertet und jeweils nur diese für die Generierung

einer neuen Generation genutzt wurde. Hierdurch war zudem gewährleistet, dass ein mögliches Absinken der Aktivität durch die Lagerung der Halogenase über den Versuchszeitraum bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ keinen Einfluss auf die Optimiersequenz und die Vorgehensweise des Algorithmus hat.

Tab. 4.17: Parametereinstellungen für den eingesetzten einfachen GA und Wertebereiche der im Test zu optimierenden Konzentrationen der Komponenten

		Wert im GA
Parameter	Individuen	12
	Generationen	5
	Genauigkeit der Variablen	6
	Generationslücke	1
	Mutationsrate	0,05
	Crossoverrate	0,9
	Bereiche	Katalaseaktivität
	FLR-Aktivität	0–20 [mU]
	NADH-Konz.	0–10.000 [μM]
	FAD-Konz.	0–45 [μM]
	L-Trp-Konz.	0–200 [μM]
	NaBr-Konz.	0–60 [mM]

Als Zielfunktion wurde das Produkt aus direkt gebildeter Menge und der Ausbeute an halogeniertem Produkt gewählt:

$$Z = c_p(5 - Br - Trp) \cdot \frac{c_p(5 - Br - Trp)}{c_E(L - Trp)} [\mu\text{M}] \quad (4.20)$$

dabei ist c_p die Produktkonzentration und c_E die Eduktkonzentration. Hierdurch wird gewährleistet, dass allein ein hoher Umsatz oder eine sehr hohe Ausbeute an halogeniertem Tryptophan nicht ausreicht, um eine hohe Güte zu erreichen, sondern nur die Kombination beider Werte. Würde hingegen allein die gebildete Menge an halogeniertem Tryptophan als Zielfunktion gewählt werden, würde die Optimierung vermutlich dahingehend erfolgen, dass im Enzymtest eine große Menge an Edukt (Trp) einzusetzen wäre. Hierbei würde die Wirtschaftlichkeit der Halogenierung, die ebenso den Umsatz und die Ausbeute zu betrachten hat, völlig außer Acht gelassen.

Der eingesetzte Genetische Algorithmus gibt für die Optimierung Konzentrationswerte aller variablen Komponenten des Enzymtests vor, die nachfolgend gemäß dem Standard-Enzymtest (vgl. Kap. 4.5.4) gemischt wurden, wobei in diesem Falle der sechsdimensionalen Optimierung zusätzlich eine vom Algorithmus vorgegebene Menge

an Katalase zum Test addiert wird. Anschließend wurde für 30 min und 800 rpm im Thermomixer inkubiert (Fa. Eppendorf, Hamburg). Die hierbei ermittelten Aktivitäten der Individuen wurden dann in die Software eingefügt, woraufhin vom GA neue Werteparameter vorgegeben wurden (vgl. Abb. 4.59).

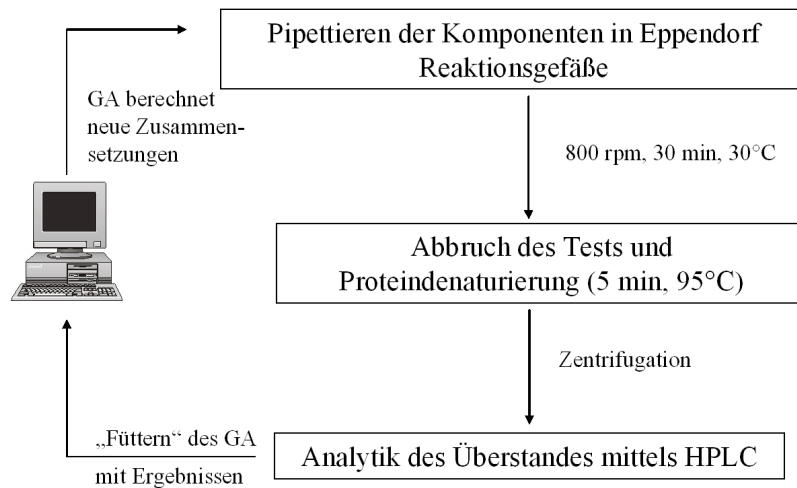


Abb. 4.59: Ablaufschema der Optimierung der Enzymtestzusammensetzung

Der Verlauf der Zielfunktion ist in Abb. 4.60 dargestellt. Der Durchschnittswert wurde durch Aufsummieren aller einzelnen Zielfunktionen einer Generation und nachfolgender Division durch die Anzahl an Individuen einer Generation erhalten. Aufgrund des resultierenden Verlaufs der Zielfunktion wurde die Optimiersequenz bereits nach der fünften Generation abgebrochen.

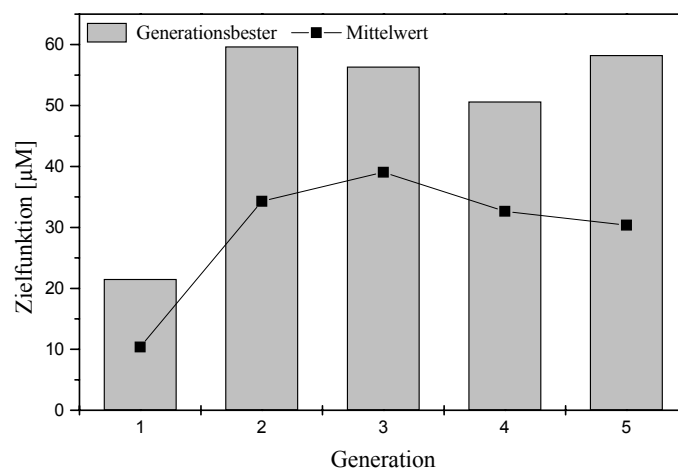


Abb. 4.60: Werte der Zielfunktion für den Durchschnittswert der Generationen sowie des Generationsbesten

Es zeigt sich, dass nach einer anfänglichen Verdopplung der Mittelwerte der Zielfunktion ab der dritten Generation eine geringe Abwärtstendenz zu beobachten ist, während die Generationsbesten auf einem annähernd konstanten Niveau von fast 60 μM liegen. Somit scheint keine weitere Optimierung unter den verwendeten Bedingungen möglich zu sein. Interessant ist zudem die Betrachtung der erzielten Menge an 5-Br-Tryptophan bei den durchgeführten Einzelversuchen. Eine graphische Darstellung der Durchschnittswerte und des besten Werts der Generation ist in Abb. 4.61 dargestellt.

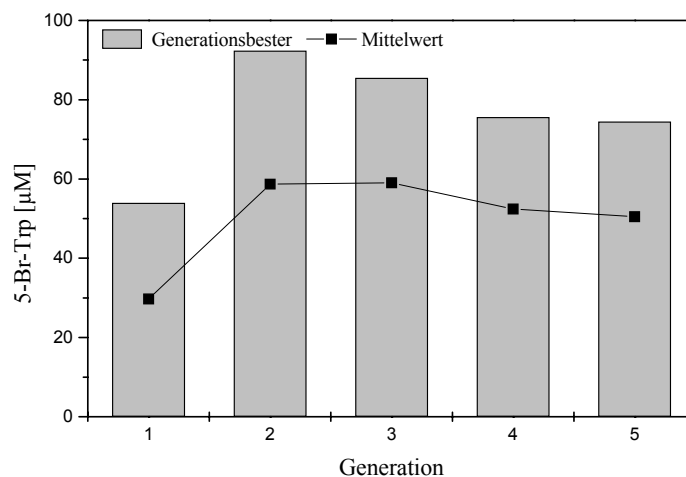


Abb. 4.61: Werte der im Enzymtest erzielten Konzentration an 5-Br-Trp

Der in Abb. 4.61 illustrierte Verlauf der maximal gebildeten Menge an 5-Br-Tryptophan im Enzymtest weist für die ersten vier Generationen eine enorme Ähnlichkeit zu dem in Abb. 4.60 dargestellten Verlauf der Zielfunktion auf. Während sich dort jedoch der Generationsbeste von der vierten zur fünften Generation verbessert, indiziert Abb. 4.61 für diesen Schritt eine weitere Verminderung der Produktbildung. Dieses Ergebnis muss jedoch vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass die in Abb. 4.61 illustrierten Werte nicht mit der Ausbeute gleichgesetzt werden dürfen, da diese keine Information über die Anfangskonzentration des Tryptophans enthalten. Diese Stagnation der Gesamtmenge an halogeniertem Produkt, bei konstantem Wert der ausgewählten Zielfunktion, lässt sich nur mit einer deutlichen Zunahme der Ausbeute erklären, welche schließlich neben der Gesamtmenge an 5-Br-Trp in die Zielfunktion einfließt. Für eine eingehendere Diskussion der hier vorgestellten Ergebnisse ist es jedoch sinnvoll, eine genauere Betrachtung der Start- bzw. Endgeneration vorzunehmen (vgl. Tab. 4.18) sowie den besten Wert und die verwendeten Versuchsparameter der „Endgeneration“ im Kontext des gesamten Versuchsraumes zu diskutieren.

Tab. 4.18: Vergleich der Zusammensetzungen der ersten Generation („Startgeneration“) mit der fünften Generation („Endgeneration“)

Startgeneration

# Gen. 0	Katalase [U]	FLR [mU]	NADH [μ M]	FAD [μ M]	L-Trp [μ M]	NaBr [mM]	Zielfunktion [μ M]
1	2476	17,78	2540	45,00	165,08	43,81	2,19
2	1587	12,06	2222	42,14	88,89	33,33	17,78
3	3937	0,63	9365	37,86	31,75	57,14	6,49
4	635	15,24	6191	15,71	142,86	16,19	20,4
5	2413	13,33	4444	7,14	34,92	28,57	10,07
6	2159	8,57	9841	32,86	98,41	17,14	21,53
7	444	16,19	952	3,57	146,03	3,81	9,97
8	1206	18,41	1905	42,14	139,68	49,52	6,46
9	3556	12,06	3651	34,29	142,86	45,71	19,46
10	635	20,00	1429	38,57	120,63	2,86	1,83
11	2349	17,14	0	18,57	171,43	45,71	0
12	3810	14,29	2698	3,57	98,41	11,43	8,29

Endgeneration

# Gen. 5	Katalase [U]	FLR [mU]	NADH [μ M]	FAD [μ M]	L-Trp [μ M]	NaBr [mM]	Zielfunktion [μ M]
1	3556	11,75	6508	3,57	50,79	26,67	17,45
2	2222	13,65	2698	3,57	79,37	17,14	35,58
3	444	13,02	2698	7,14	98,41	13,33	16,39
4	4000	12,06	3968	3,57	0,00	56,19	0
5	3556	12,06	3968	3,57	101,60	13,33	41,57
6	4000	16,19	2698	3,57	95,24	17,14	58,28
7	4000	7,94	3810	18,57	95,24	18,10	44,64
8	4000	16,19	2698	2,86	98,41	13,33	50,75
9	444	13,02	2698	7,14	139,70	3,81	26,81
10	3810	11,43	2222	3,57	76,19	11,43	33,66
11	2222	14,29	2698	20,71	146,00	58,10	15,68
12	3556	8,25	2698	3,57	95,24	3,81	23,79

Innerhalb der Startgeneration zeigt sich keinerlei Präferenz des Algorithmus für ein bestimmtes Wertepaar und die im Test einzustellenden Werteparameter sind sehr gut im Suchraum verteilt. Im Verlauf der Optimierung findet jedoch eine Präferenz der einzustellenden Konzentration der Komponenten statt, welches durch mehrfach identische Vorgaben zum Ausdruck kommt. Für eine Bewertung des hier verwendeten Optimierverfahrens ist es sinnvoll, neben der bereits dargestellten Verbesserung der

Zielfunktion, ebenso eine Betrachtung des Suchraums eines jeden variablen Parameters durchzuführen und diesen Wertebereich mit der im besten Individuum zum Ausdruck kommenden Parametereinstellung zu vergleichen, was in Abb. 4.62 exemplarisch dargestellt ist. Hierdurch können Informationen erhalten werden, ob der Suchraum optimal gewählt und die Grenzen ausreichend definiert wurden. Die Parameter für ein aufgefundenes Optimum sollten sich dabei in der Regel nicht an den Grenzen des Suchraums befinden.

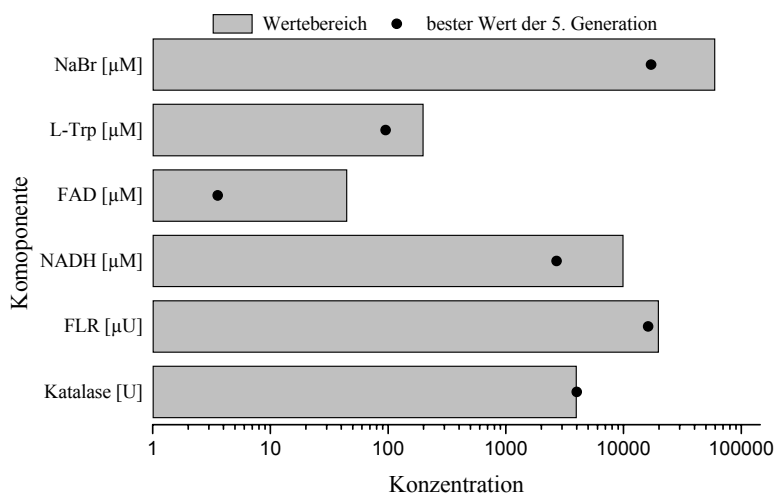


Abb. 4.62: Variationsbereiche der im Enzymtest zu optimierenden Komponenten im Vergleich mit der besten Einstellung der Parameter innerhalb der fünften Generation

Die Abb. 4.62 zeigt, dass die eingestellten Werteparameter des besten Individuums der 5. Generation innerhalb der vorgegebenen Variationsbereiche für den Genetischen Algorithmus liegen, mit Ausnahme des Werts für die Katalase. Hierfür schlägt der Algorithmus den Wert 4.000 U vor, der sich auch im Optimierverlauf manifestiert, wie Tab. 4.18 zeigt. Demnach korreliert die Güte der Zielfunktion insbesondere mit der Menge an hinzugefügter Katalase. Diese Tatsache suggeriert, dass eine Zugabe von möglichst viel Katalase eine deutliche Steigerung der Ausbeute an 5-Br-Trp bzw. der Zielfunktion und somit eine Erhöhung der Halogenaseaktivität bewirkt. Um eine weitere Bewertung der Optimierung vornehmen zu können, war daher der Einfluss des H_2O_2 -abbauenden Enzyms auf die Messwerte der HPLC zu untersuchen.

Bei der eingesetzten HPLC-Methode (vgl. Kap. 6.9) wurden die im Halogenase-Assay vorhandenen Aminosäuren, hier sollten ausschließlich Tryptophan sowie halogeniertes Tryptophan vorliegen, mit OPA derivatisiert und anschließend säulenchromatographisch aufgetrennt. Hierfür wurde ein spezielles Elutionsprofil entwickelt, welches hinsichtlich der Auftrennung von 5-Br-Trp und L-Trp optimiert wurde, da im Test keine anderen Aminosäuren vorhanden sein sollten. Weitere Aminosäuren sollten dagegen gebunden im Protein der zugesetzten Enzyme vorliegen, welches bei der verwendeten Abbruchmethode des Halogenase-Assays bei 95 °C denaturiert und durch Zentrifugation vor der Derivatisierung abgetrennt wurde. Zur Bewertung des mit dem GA

erhaltenen Ergebnisses wurde überlegt, die chromatographische Trennung in einem Vergleichslauf mit dem ursprünglich genutzten Elutionsprofil durchzuführen. Hierbei zeigte sich, dass der Produktpeak bei der optimierten analytischen Methode stärker zunahm als bei der ursprünglich verwendeten HPLC-Methode. Bei dieser vergrößerten sich in der Ursprungsmethode die Peakflächen der Aminosäuren Leucin und Isoleucin, wenn die Proben der „optimierten“ Testzusammensetzung analysiert wurden. Anhand dieser Daten konnte darauf geschlossen werden, dass die genannten Aminosäuren in der hier genutzten HPLC-Methode ein analoges Elutionsverhalten wie das halogenierte Tryptophan aufweisen. Wurden Standards von Leucin und Isoleucin mit der „optimierten“ Methode analysiert, resultierte eine äquivalente Retentionszeit (27,2 min) wie die des 5-Br-Tryptophans. Zur Untersuchung der Herkunft der Aminosäuren wurde eine Konzentrationsreihe an Katalase angesetzt. Die einzelnen Proben dieser Verdünnungsreihe wurden für 5 min bei 95 °C im Thermomixer bei 800 rpm inkubiert und nachfolgend mit Hilfe der verwendeten HPLC-Methode analysiert. In Abb. 4.63 ist die dabei erhaltene scheinbare Menge an 5-Br-Trp in Relation zur eingesetzten Katalasekonzentration dargestellt.

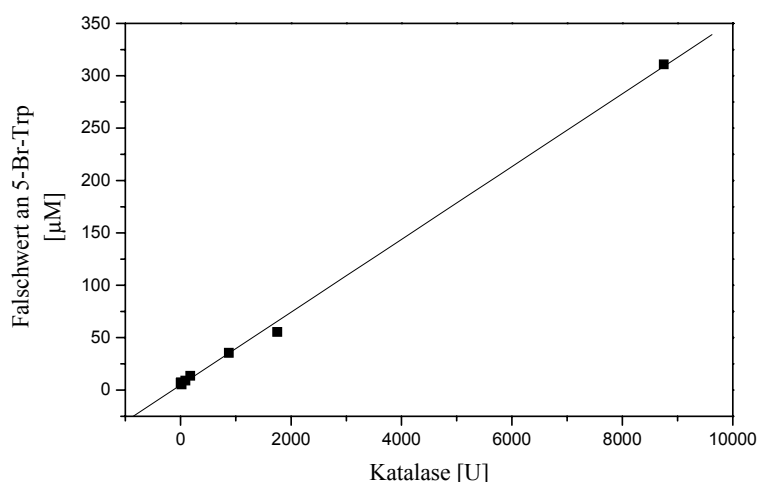


Abb. 4.63: Kalibriergerade für die Korrelation der Katalaseaktivität mit der scheinbar detektierten 5-Br-Trp-Konzentration; die Geradengleichung lautet: $y = 0,0348 x + 4,814$ ($R^2 = 0,9984$)

Abb. 4.63 beweist, dass die Katalase bei den verwendeten Abbruchbedingungen des Enzymtests zerfällt und Aminosäuren freigesetzt werden, die bei der verwendeten HPLC-Methode eine analoge Retentionszeit wie das 5-Br-Tryptophan aufweisen. Zwischen der im Enzymtest eingesetzten Menge an Katalase und der nachweisbaren (scheinbaren) Konzentration an halogeniertem Produkt besteht zudem ein linearer Zusammenhang.

Basierend auf dieser Korrelation zwischen eingesetzter Katalase und scheinbarer 5-Br-Trp-Konzentration im Enzymtest kann somit angenommen werden, dass der Algorithmus in eine falsche Richtung optimiert hat. Dies steht im Einklang mit dem

aufgefundenen „Optimum“ für die Zusammensetzung des Halogenase-Assays, da der Katalasezusatz auf ein Maximum an Zusatz optimiert wurde.

Ein Einfluss der anderen im Enzymtest enthaltenden Enzyme auf die genutzte HPLC-Methode konnte bei den eingesetzten Konzentrationen nicht nachgewiesen werden.

Für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Optimierung der Enzymtestzusammensetzung sollte daher der Zusatz an Katalase so gering wie möglich sein, weshalb an dieser Stelle eine Abschätzung der maximal im Test auftretenden Menge an Wasserstoffperoxid durchgeführt werden soll.

Photometrisch ist die im Enzymtest gebildete Stoffmenge an Wasserstoffperoxid nicht direkt zugänglich, da das Absorptionsmaximum bei 240 nm liegt und somit mit dem des FAD und der aromatischen Aminosäureseitenketten zusammenfällt. Allerdings ist eine indirekte Abschätzung der während des Tests entstehenden Menge an H_2O_2 über den NADH-Verbrauch möglich. Nach dem in Abb. 4.37 dargestellten Reaktionsmechanismus ist zur Bildung des Flavinhydroperoxids, welches schließlich spontan H_2O_2 freisetzen kann, ein Äquivalent NADH notwendig. Durch die Detektion der Extinktionsabnahme bei der für NADH charakteristischen Wellenlänge von 340 nm ist somit eine Abschätzung der während des Tests entstehenden Wasserstoffperoxidmenge möglich. Um den Test in Halbmikroküvetten durchführen zu können, erfolgte eine Vergrößerung des Ansatzes des in Tab. 4.11 angegebenen Standard-Enzymtests auf 1 mL. Zudem wurde die Menge an Flavinreduktase im Test um den Faktor fünf erhöht, um eine ausreichende Absorptionsabnahme innerhalb der Versuchszeit von 30 min zu erhalten. Die für diesen Ansatz resultierende Extinktionsabnahme ist in Abb. 4.64 dargestellt.

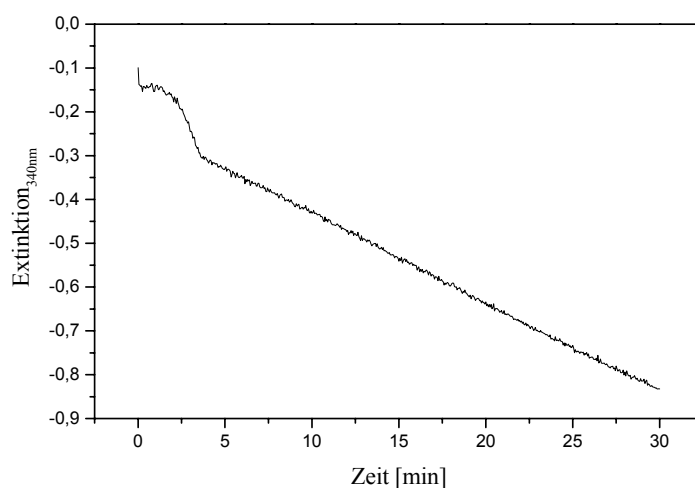


Abb. 4.64: Verlauf der bei 340 nm detektierten Extinktion des Enzymtests [179]

Anhand der in Abb. 4.64 dargestellten Extinktionsabnahme des Enzymtests lässt sich über das Lambert-Beer'sche Gesetz die Konzentrationsabnahme von NADH im Versuchszeitraum berechnen (vgl. (4.21)).

$$c(\text{NADH}) = \frac{E_{t=30\text{ min}} - E_{t=0}}{\varepsilon \cdot d} \cdot 1000 \quad [\text{mM}] \quad (4.21)$$

Dabei sind $E_{t=30\text{ min}}$ der Endwert der Extinktion nach 30 min, $E_{t=0}$ der Wert der Extinktion zum Zeitpunkt $t=0$, d die Schichtdicke der verwendeten Halbmikroküvette ($d = 1\text{ cm}$) und ε der molare Extinktionskoeffizient von NADH ($\varepsilon = 6300\text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$).

Aufgrund dieser Daten ergibt sich ein NADH-Verbrauch von 0,1095 mmol/L innerhalb von 30 min. In der rein hypothetischen Annahme, dass das gesamte FADH_2 zum Flavinhydroperoxid weiterreagiert und anschließend durch quantitativen Zerfall Wasserstoffperoxid generiert, was aufgrund der gleichzeitig stattfindenden Halogenierungsreaktion niemals gegeben ist, könnten sich maximal 0,1095 mmol/L Wasserstoffperoxid bilden. Dies entspricht einer Stoffmenge im Standard-Enzymtest ($V_{\text{ET}} = 200\text{ }\mu\text{L}$) von 0,0044 μmol pro 6,2 mU FLR innerhalb von 30 min. Somit muss die Katalase eine Enzymaktivität von 0,044 $\mu\text{mol} / 30\text{ min}$, also 1,5 mU aufweisen. Aufgrund dieses geringen Zusatzes an Katalase ist, wie ein Vergleich mit Abb. 4.63 zeigt, nur ein sehr geringer Einfluss auf die Messwerte der verwendeten HPLC-Methode zu erwarten.

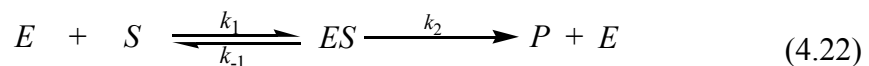
Basierend auf den im Rahmen dieses Kapitels erhaltenen Ergebnissen wurde von einer weiteren Optimierung mit Hilfe Genetischer Algorithmen abgesehen und zunächst der Fokus weiterer Untersuchungen auf die Variation einzelner Komponenten im Enzymtest sowie einer detaillierteren Aufklärung der Kinetik gerichtet. Eine spätere Anwendung der Algorithmen bei genauerer Kenntnis dieser Daten schließt sich daher nicht aus und kann gegebenenfalls in weiteren Arbeiten forciert werden.

4.5.6 Kinetische Untersuchungen der Tryptophan-5-Halogenase

Für eine genaue Charakterisierung der Tryptophan-5-Halogenase ist es notwendig, kinetische Untersuchungen hinsichtlich des Substratverbrauchs sowie eine detailliertere Betrachtung des Umsatz-Zeitverhaltens durchzuführen, was im Rahmen dieses Kapitels beschrieben wird.

4.5.6.1 Einfluss der Substratkonzentration auf die Enzymaktivität

Im Allgemeinen erfolgt eine Charakterisierung von Enzymen hinsichtlich des Verhaltens bei vorgegebenen Substratkonzentrationen. Das sicherlich am weitesten verbreitete Modell hierfür ist jenes von L. Michaelis und M. L. Menten postulierte, das von der in Gl. (4.22) dargestellten Grundgleichung für die Kinetik ausgeht [187].



Ursprünglich beschreibt die Michaelis-Menten-Kinetik eine Ein-Substrat-Reaktion, in der ein Substrat S mit einem für dieses Substrat spezifischem Enzym E in einer reversiblen Reaktion einen Enzym-Substratkomplex ES bildet, der irreversibel in das Produkt P und das Enzym E zerfällt. In dieser Gleichung beschreiben k_1 und k_{-1} die Geschwindigkeitskonstanten der reversiblen Bildungs- und Zerfallsreaktion von ES , während k_2 die Geschwindigkeitskonstante des irreversiblen Zerfalls von ES in Produkt und Enzym darstellt, sie wird auch als katalytische Konstante k_{kat} oder als Wechselzahl (engl. „turnover number“) bezeichnet.

Für die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v von der Substratkonzentration $[S]$ gilt in der von Michaelis und Menten vorgeschlagenen Gleichung:

$$v = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (4.23)$$

Unter Annahme dieser Korrelation nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit bei sehr großen Substratkonzentrationen einen maximalen Wert v_{max} an. Die Ordnung der Reaktion beträgt dann Null. Die Konzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist, wird als Michaelis-Konstante K_M bezeichnet. Diese ist gleichzeitig ein Maß für die Affinität des Enzyms zu einem bestimmten Substrat: je geringer der Wert für K_M ist, desto größer ist die Affinität zum Substrat. Streng genommen besitzt Gleichung (4.23) nur Gültigkeit in der Anfangsphase der enzymatischen Reaktion, wenn also noch keine Rückreaktion des Enzym-Substratkomplexes möglich und die Bildung des Produkts der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist.

Bei der Charakterisierung eines Enzyms hinsichtlich seines Substratverhaltens ist auch die Möglichkeit einer Substratinhibierung in Betracht zu ziehen. So zeigen viele Enzyme bei moderaten Substratkonzentrationen eine Gültigkeit der in Gl. (4.23) gezeigten Abhängigkeit. Bei höheren Substratkonzentrationen kann jedoch das Substrat inhibierend wirken und somit eine Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit auftreten. Erklären lässt sich dieses Phänomen dadurch, dass zwei Substratmoleküle gleichzeitig um das aktive Zentrum konkurrieren und sich gegenseitig behindern, einen Enzym-Substratkomplex auszubilden.

Zur Untersuchung, ob die Michaelis-Menten-Kinetik auch für die Halogenase Gültigkeit besitzt, wurden Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt. Die Konzentration an L-Tryptophan im Enzymtest wurde dafür im Bereich von 0–2 mM variiert. Um eine Substratlimitierung von Seiten des Halogenids auszuschließen, wurde dies im Überschuss eingesetzt. Substratlimitierungen würden hier zu einer Fehlinterpretation der Resultate führen. Die Zusammensetzung des Tests basierte wiederum auf dem in Tab. 4.11 angegebenen Standard-Enzymtest. Nach

Inkubation für 30 min bei 30 °C wurde der Test abgebrochen und die Reaktionsgeschwindigkeit nach Gl. (4.24) berechnet, mit t als Inkubationszeit.

$$v = \frac{c(5-\text{Br}-\text{Trp})}{t} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{s}} \right] \quad (4.24)$$

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 4.65 grafisch dargestellt.

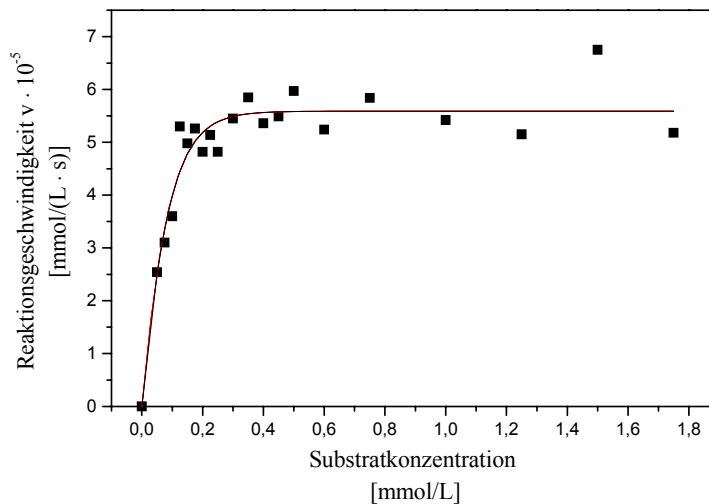


Abb. 4.65: Reaktionsgeschwindigkeit der Trp-5-Halogenase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration [179]

Eine lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit und somit eine Reaktion erster Ordnung der Tryptophan-5-Halogenase für das Substrat Tryptophan kann bei Substratkonzentrationen $< 0,2$ mmol beobachtet werden. Bei höheren Konzentrationen an Tryptophan nimmt die Reaktion eine Ordnung von Null an.

Für eine eingehendere Betrachtung der in Abb. 4.65 dargestellten Daten ist eine doppelt-reziproke Auftragung (vgl. Gl. (4.25)) in einem so genannten Lineweaver-Burk-Diagramm vorteilhaft, da hier die Verhältnisse durch Auftragung von $1/v$ gegen $1/[S]$ linearisiert werden können. Die anschließende Ermittlung von K_M bzw. v_{\max} kann dann über die Geradengleichung erfolgen. Im Vergleich zum direkten Ablesen dieser Parameter aus der einfachen Auftragung kann damit eine deutlich genauere Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgen.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (4.25)$$

Die Auftragung der Versuchsdaten in einem Lineweaver-Burk-Plot ist in Abb. 4.66 dargestellt.

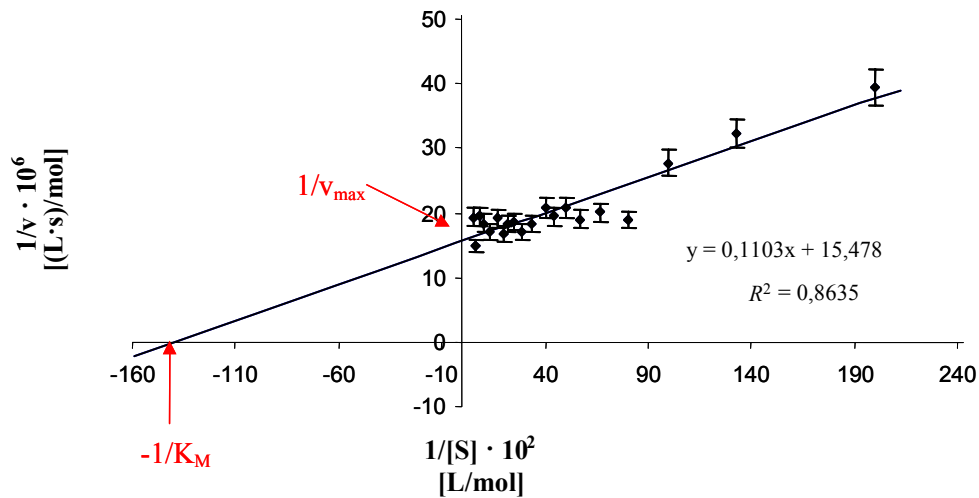


Abb. 4.66: Lineweaver-Burk-Plot zur Ermittlung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und der Michaelis-Konstante [179]

Unter Anwendung einer Linearen Regression für die in Abb. 4.66 präsentierten Messwerte wurde die Michaelis-Konstante K_M sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} der Tryptophan-5-Halogenase ermittelt. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 4.19 aufgeführt.

Tab. 4.19: Mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Plots ermittelte kinetische Daten der Trp-5-Halogenase unter Verwendung des in Tab. 4.11 angegebenen Standard-Enzymtests

kin. Parameter	Wert aus LB-Plot
K_M	0,071 mM
v_{\max}	$6,46 \cdot 10^{-5}$ mmol/L·s

Die erhaltenen Daten zeigen, dass die Tryptophan-5-Halogenase ausreichend mit einem Michaelis-Menten-Ansatz beschrieben werden kann. Eine Substratinhibierung, welche die Darstellung der Werte im Lineweaver-Burk-Plot mit einem Fehler behaftet hätte, konnte nicht beobachtet werden. Dies gilt innerhalb des untersuchten Bereichs bis zu einer Tryptophankonzentration von 2 mM. Des Weiteren wird deutlich, dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, bei den vorgegebenen Versuchsbedingungen, bereits ab einer Trp-Konzentration von 0,125 mM erreicht wird. Bis zu dieser Konzentration verhält sich die Reaktionsgeschwindigkeit linear zur ansteigenden L-Trp-Konzentration, die Reaktion ist also erster Ordnung. Dieses Resultat deckt sich zudem mit dem ermittelten Wert der Michaelis-Konstante.

4.5.6.2 Untersuchung des Umsatz-Zeit-Verhaltens der Trp-5-Halogenase

Neben der Untersuchung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten zur Ermittlung der kinetischen Parameter K_M und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} ist das

Verhalten der Enzymaktivität in Korrelation zur Versuchsdauer interessant, um eine weitere Charakterisierung der Halogenase vorzunehmen. Bezüglich des Umsatz-Zeit-Verhaltens ist besonders das Auffinden des linearen Bereichs der Produktbildung nützlich, um die Transformation in einem wirtschaftlichen Bereich stattfinden zu lassen. Zudem sind mit Hilfe solcher Untersuchungen weitere Informationen über die Enzymaktivität oder Enzymdestabilisierung zu gewinnen.

Zur Untersuchung des Umsatz-Zeit-Verhaltens der Trp-5-Halogenase wurde die Produktbildung unter Verwendung des Standard-Enzymtests (vgl. Tab. 4.11) mit einer Substratkonzentration von 200 μM L-Trp in einem Zeitintervall von 0–180 min untersucht, wobei der in Abb. 4.67 dargestellte hyperbolische Verlauf der 5-Br-Trp-Konzentration ermittelt wurde.

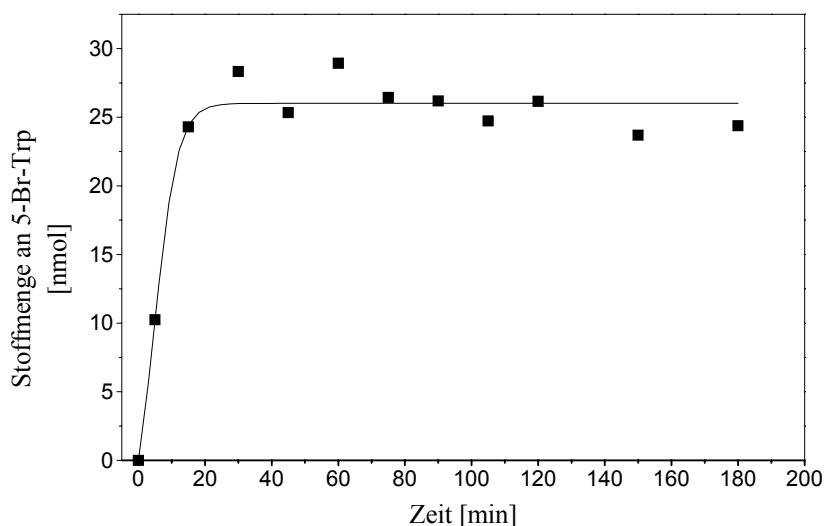


Abb. 4.67: Zeit-Umsatz-Verhalten der Trp-5-Halogenase im Standard-Enzymtest

Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass die maximale Ausbeute des bromierten Tryptophans bei den hier vorgegebenen Versuchsbedingungen bereits nach 25–30 min erzielt wurde. Eine längere Reaktionszeit weist zusätzlich auf eine eher absinkende Tendenz der Produktausbeute hin. Dies resultiert vermutlich durch den Eintrag Tryptophan-abbauender Enzyme über den FLR-Pool in den Halogenase-Assay. Da die eingesetzte Flavinreduktase nicht bis zur Homogenität aufgereinigt wurde, kann eine solche Kontamination nicht vermieden werden. Die Dehalogenierung durch die Halogenase selbst kann aufgrund des irreversiblen Reaktionsmechanismus ausgeschlossen werden. Allerdings liegen die maximal erhaltenen Werte für das Produkt jedoch noch im Fehlerbereich von 5 % der analytischen Methode.

Von Interesse war zudem, wie sich das Umsatz-Zeit-Verhalten der Halogenase bei den zuvor ermittelten optimalen Versuchsparametern gestaltet. Hierzu wurde der Enzymtest unter Anwendung der bislang vorliegenden experimentellen Daten derart variiert, dass eine L-Trp-Konzentration von 400 μM , eine Temperatur von 24 °C und ein pH-Wert

des Kaliumphosphatpuffers von 6,2 eingestellt wurde. Zusätzlich wurden dem Test 1,5 mU an Katalase hinzugesetzt, um eventuell gebildetes Wasserstoffperoxid zu deaktivieren. Die Produktbildung wurde dabei über einen Zeitraum von 150 min verfolgt (vgl. Abb. 4.68).

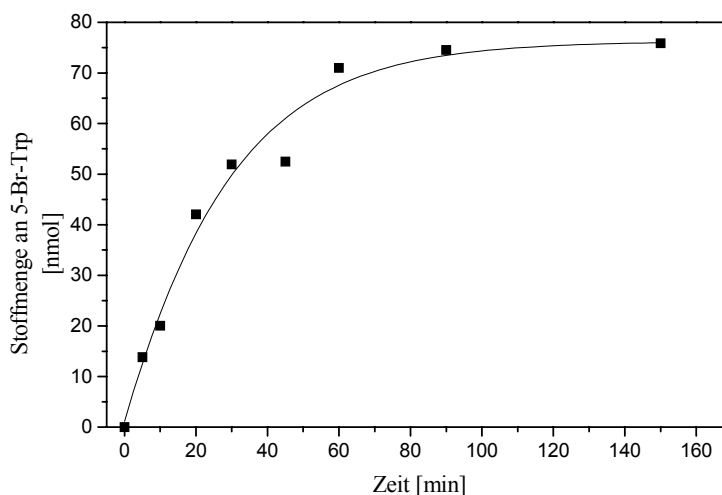


Abb. 4.68: Zeit-Umsatz-Verhalten der Halogenase im optimierten Enzymtest bei 24 °C, $c(\text{Trp}) = 400 \mu\text{M}$, Katalasezusatz 1,5 mU, pH 6,2

Wie Abb. 4.68 zeigt, existiert bei Anwendung der optimierten Parametereinstellungen ein besseres Zeit-Umsatz-Verhalten der Tryptophan-5-Halogenase. Die maximal erzielbare Ausbeute an Produkt konnte mit Hilfe der Variation der Versuchsbedingungen von 72,3 % auf 94,5 % erhöht werden, wobei die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts der enzymatischen Reaktion von 30 min auf ca. 100 min zunimmt. Interessanterweise kann auch mit den veränderten Bedingungen ein quasi-lineares Verhalten nur bis etwa 30 min beobachtet werden. Trotz des sich anschließenden hyperbolischen Verlaufs zeigt das Enzym bei den günstigeren Parametereinstellungen eine deutlich verbesserte Raum-Zeit-Ausbeute, was hauptsächlich auf die Temperatur- und pH-Wert-Reduktion zurückzuführen ist. Eine Gegenüberstellung der mit Hilfe des Standard-Enzymtests bzw. der optimierten Testzusammensetzung erhaltenen Ergebnisse ist in Tab. 4.20 dargestellt.

Tab. 4.20: Gegenüberstellung der Zeit-Umsatz-Werte der eingesetzten Enzymtest-Varianten

	Standard-Enzymtest	Optimierter Enzymtest
Bedingungen	pH = 7,2 T = 30 °C c(L-Trp) = 0,2 mM	pH = 6,2 T = 24 °C c(L-Trp) = 0,4 mM Katalase 1,5 mU
Ausbeutemaximum	28,93 nmol (72,3 %)	75,85 nmol (94,8 %)
Zeit bis zur Einstellung des Reaktions- Gleichgewichts	~ 30 Minuten	~ 100 Minuten

Die bei diesem Versuch erzielte Ausbeute von fast 95 % ist hinsichtlich des Betrags im Rahmen des technisch möglichen fast ausgereizt. Allerdings können hinsichtlich der Raum-Zeit-Ausbeute bzw. der Produktivität durchaus weitere Steigerungen möglich sein. Inwiefern dies mittels einer gepulsten Zugabe des Substrats zum Enzymtest erreicht werden kann, ist Gegenstand des nachfolgenden Kapitels.

4.5.6.3 Untersuchung des Umsatz-Zeit-Verhaltens bei gepulster Zugabe des Substrats

Eine Reihe von Enzymen zeigt hinsichtlich des umzusetzenden Substrats eine Inhibition, wobei dann in der Regel – bei fehlender Enzymalternative – für technische Prozesse auf einen Fed-Batch-Prozess ausgewichen wird um eine wirtschaftliche Nutzung des Enzyms etablieren zu können. Bei den bislang durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich einer möglicherweise vorliegenden Substratinhibition der Tryptophan-5-Halogenase konnte zwar kein signifikanter hemmender Einfluss höherer Substratkonzentrationen nachgewiesen werden, jedoch kann durchaus angenommen werden, dass geringe quasi-stationäre Substratkonzentrationen eine Steigerung der Enzymaktivität ermöglichen. Ob dies möglich ist, sollte im Folgenden untersucht werden.

Für die Durchführung der Pulsexperimente wurde, aufgrund der bislang erhaltenen kinetischen Daten des Enzyms im verwendeten Aktivitätstest (vgl. Standard-Enzymtest in Tab. 4.11) eine Reduktion des pH-Werts des Puffers auf pH 6,2 sowie der Inkubationstemperatur auf 23 °C vorgenommen, wobei jeweils zwei Enzymtestansätze (Referenz / Probe) mit gleicher Gesamtkonzentration des Substrats inkubiert wurden. Dem Referenztest wurde die Gesamtmenge an L-Trp zum Zeitpunkt $t = 0$ und der Probe durch Zupulsen von je 50 μM -Konzentrationsstößen innerhalb einer vorgegebenen Zeit

hinzugefügt. Die verwendeten Substratmengen sowie die Inkubationszeiten bei Zugabe bestimmter Substratpulse sind in Tab. 4.21 aufgeführt. Um eine Vergleichbarkeit der Werte untereinander zu gewährleisten, wurden kurze Zeitintervalle gewählt innerhalb derer die Zupulsung erfolgte und die gesamte Versuchsdauer auf 1 h fixiert. Somit konnte der Einfluss der thermischen Deaktivierung der Halogenase im Versuchszeitraum minimiert werden. Die Konzentration der gewählten Substratpulse orientierte sich an der mit Hilfe der Michaelis-Menten-Kinetik ermittelten Daten zum Enzymverhalten, so dass im Bereich der Sättigungskonzentration gearbeitet wurde.

Tab. 4.21: Zusammensetzung der variablen Parameter im Enzymtest sowie Zeitangabe der Zupulsung

#	L-Trp bei t_0 [μM]	KPP Zugabe [μL]	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min	45 min	60 min
1	50	70,8	+ 50 μM	Abbruch						
2	100	70,8		Abbruch						
3	50	68,8	+ 50 μM	+ 50 μM	Abbruch					
4	150	68,8			Abbruch					
5	50	66,8	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	Abbruch				
6	200	66,8				Abbruch				
7	50	64,8	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	Abbruch			
8	250	64,8					Abbruch			
9	50	62,8	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	Abbruch		
10	300	62,8						Abbruch		
11	50	60,8	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	Abbruch	
12	350	60,8							Abbruch	
13	50	58,8	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	+ 50 μM	Abbruch
14	400	58,8								Abbruch

Eine paarweise Gegenüberstellung der innerhalb der Versuchsdauer erzielten Ausbeute von gepulstem Experiment im Vergleich zum ungepulsten Experiment ist in Abb. 4.69 dargestellt.

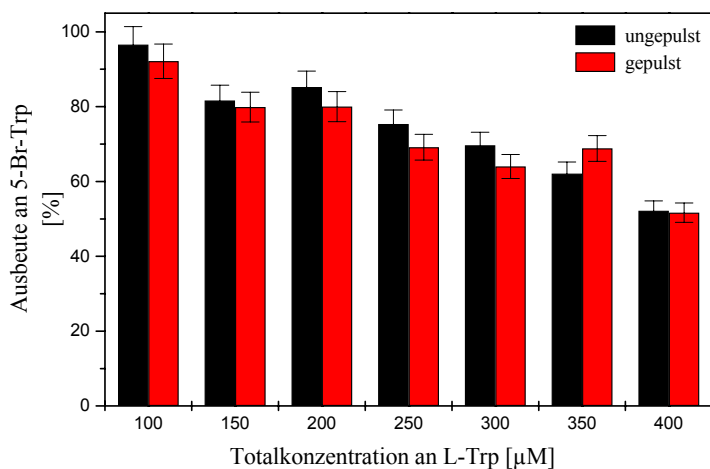


Abb. 4.69: Darstellung der erhaltenen Ausbeuten an 5-Br-Tryptophan im Pulsexperiment für verschiedene Totalkonzentrationen im Test; die jeweiligen Inkubationszeiten und Zeiten der Substratzugabe sind Tab. 4.21 zu entnehmen

Der in Abb. 4.69 dargestellte Vergleich eines Batch-Prozesses mit einer Fed-Batch-Betriebsweise der Halogenierungsreaktion indiziert keinen Unterschied hinsichtlich der Produktbildung, wenn die Substratzugabe gepulst erfolgt. Insgesamt liegen die erhaltenen Resultate der Pulsexperimente etwas unter den Batch-Versuchen, wobei sich die Werte im ermittelten Fehlerbereich nicht signifikant unterscheiden. Interessant ist das hier erkennbare fast lineare Absinken der resultierenden Ausbeute bei Zunahme der im Test eingesetzten Gesamtmenge an Tryptophan. Zu erwarten wäre eher gewesen, dass die Ausbeute konstant bleibt, da die Reaktionszeit mit jedem Puls um 5 min verlängert wurde, ausgenommen der beiden Ansätze mit den höchsten Konzentrationen. Bei diesen erfolgte der Abbruch erst 15 min nach dem letzten Puls, wonach eine deutlich höhere Produktausbeute hätte resultieren sollen. Dies bedeutet, dass mit zunehmender Substratkonzentration die Raum-Zeit-Ausbeute des Enzyms, bei den hier verwendeten Reaktionsbedingungen und Reaktionszeiten, abnimmt. Wie bereits in Abb. 4.65 dargestellt, unterliegt die Halogenase jedoch keiner Substratinhibierung, weshalb das hier beschriebene Ergebnis aufgrund einer beginnenden Inaktivierung des Enzyms – auf einen Katalasezusatz wurde im Rahmen des Experiments verzichtet – und auch einer Variation der Kinetik (vgl. Abb. 4.68) zurückzuführen ist. Anhand des in Abb. 4.68 illustrierten Umsatz-Zeit-Verhaltens für eine Initialkonzentration von 400 μM Trp im Enzymtest ist erkennbar, dass das Ende der Reaktion erst nach einer deutlich längeren Reaktionszeit als bei der hier eingesetzten auftritt. Für einen Einsatz des nativen Enzyms für die Halogenierungsreaktion sollten daher für nachfolgende Experimente Initialkonzentrationen zwischen 100 und 150 μM eingesetzt werden. Dies entspricht auch dem experimentell aufgefundenen Sättigungsbereich des Enzyms.

4.5.7 Ganzzelltransformation

Ein wichtiger Faktor, der eine mögliche Etablierung eines Prozesses für den industriellen Einsatz entscheidend beeinflusst, ist die Optimierung bzw. eine generelle Reduktion der Prozesskosten. Im Rahmen der bislang beschriebenen Versuchsreihen konnte die Aufreinigung der Halogenase so weit optimiert werden, dass in relativ kurzer Zeit das Enzym in Reinform isoliert werden konnte. Allerdings ist diese Strategie aufgrund des dabei verwendeten Materials für die Affinitätschromatographie insgesamt sehr kapital- bzw. zeitintensiv und verhindert eventuell einen kommerziellen Einsatz, je nach Nachfrage an anzubietendem Produktspektrum, welches mit Hilfe der Halogenase erzeugt werden kann.

Eine Verringerung der Downstreamkosten kann beispielsweise mit Hilfe einer Ganzzelltransformation erzielt werden. Dabei wird die Umsetzung des Substrats direkt von der vitalen Zelle durchgeführt, ohne sie zuvor zu zerstören. Hierzu müssen die einzusetzenden Zellen möglichst unbeschadet vom Kultivierungsmedium separiert, in ein neues Puffersystem überführt und mit dem Substrat und eventuell benötigten Co-Faktoren vereinigt werden. Ist solch eine Anwendung möglich, steht diese Strategie außer Konkurrenz vor allen anderen Methoden. Aufgrund der Reduktion von Prozessschritten resultiert eine deutliche Kosten- und Zeitersparnis. Dadurch, dass das Enzym bei diesem Prozess komplett in seiner ursprünglichen Umgebung verbleibt, ist ein geringerer Aktivitätsverlust als bei einem *in vitro* Einsatz des Enzyms zu erwarten. Vorteilhaft ist zudem, dass die für den Prozess notwendigen Co-Faktoren bzw. Reduktionsäquivalente FAD/FADH₂ und NAD⁺/NADH bereits in der Zelle vorhanden sind.

Um die Anwendbarkeit der Ganzzelltransformation für die Produktion des in Position 5 halogenierten Tryptophans zu überprüfen, wurden zunächst bei -80 °C gelagerte Zellen von *P. fluorescens* aufgetaut und so viel Biomasse in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2) suspendiert, bis sich eine Optische Dichte, gemessen bei 595 nm gegen H₂O, von 1,6 ergab. Anschließend wurde der in Tab. 4.11 dargestellte Standard-Enzymtest verwendet, bei dem die Halogenaselösung durch 100 µL der hergestellten Zellsuspension ersetzt wurde. Die Inkubationszeit betrug 105 min bei 30 °C im Thermomixer bei 800 rpm. Als Referenz diente ein Test gleicher Zusammensetzung, der sofort nach Zugabe des NADH abgebrochen wurde.

Die mit Hilfe der HPLC-Methode nachgewiesene Konzentration des halogenierten Tryptophans im Enzymtest betrug dabei 114,6 µM, wobei ausschließlich chloriertes Tryptophan, trotz der Addition von NaBr im Assay, detektiert wurde. Somit resultiert eine mutmaßliche Umsetzung von mehr als 57 % des vorgelegten Tryptophans.

Dieses Resultat muss jedoch sehr kritisch betrachtet werden, da die eingesetzte Biomasse zuvor bei tiefen Temperaturen gelagert wurde. So kann durch den Gefrierprozess eine Desintegration cytosolischer Proteine initiiert worden sein, wodurch auch die Halogenase in der vorhandenen Suspension frei vorliegen sollte. Eine Umsetzung des Tryptophans zum halogenierten Produkt wäre somit nicht auf die Zellen, sondern durch freie Tryptophan-5-Halogenase zurückzuführen. Solch ein Aufschluss würde auch die ausschließliche Bildung des 5-Cl-Tryptophans erklären, weil die mit dem Enzym

gleichzeitig freigesetzten Chlorid-Ionen des Cytosols für die Halogenierungsreaktion genutzt werden könnten. Um solch eine Freisetzung der Halogenase im Rahmen einer Ganzzelltransformation ausschließen zu können, sollte daher in einem Folgeversuch frisch angezogene Biomasse für die Biotransformation verwendet werden.

Für diese Untersuchung wurden 250 mL HNB-Medium + Tet₃₀ mit 250 µL einer Glycerinkultur beimpft (vgl. Kap. 6.3.2). Die Inkubation erfolgte bei 30 °C mit 180 rpm für 44 h, wobei eine OD₅₉₅ von 6,5 resultierte (gemessen gegen 3%ige Kochsalzlösung). Die Zellseparation erfolgte durch Zentrifugation mit 3.345 g bei 4 °C für 15 min. Nachfolgend wurden die Zellen zwei Mal mit eiskalter Saline und dann mit Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 6,2) gewaschen, zentrifugiert wurde dabei immer bei gleichen Bedingungen. Vom resultierenden Zellpellet wurde durch Aufschlännen in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2) eine Suspension mit einer OD₅₉₅ (Messung erfolgte gegen die Pufferlösung) von 3,2 bereitgestellt. Eine Variation des zuvor verwendeten Enzymtests erfolgte hinsichtlich der eingesetzten Tryptophan- sowie der Zellkonzentration (vgl. Tab. 4.22). Das Verhältnis von eingesetzter Zell- zur Substratkonzentration blieb davon jedoch unberührt. Als Referenz diente der Enzymtest, bei dem Trp durch Puffer ausgetauscht wurde.

Tab. 4.22: Zusammensetzung des Enzymtests für die Umsetzung des Tryptophans durch lebende, frisch kultivierte Zellen

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Enzymtest	Zugabevolumen
FLR	Aktivität : 6,2 mU		variabel
FAD	1 mM	0,005 mM	1 µL
Zellsuspension	OD ₅₉₅ = 3,2		100 µL
KPP, pH 6,2	0,01 M		variabel
L-Trp	10 mM	0,4 mM	8 µL
NaCl	3 M	25,5 mM	1,7 µL
NADH	50 mM	5 mM	20 µL
Summe			200 µL

Der in Doppelbestimmung durchgeführte Halogenase-Assay zeigte eine mittlere Produktbildung von 24,5 µM, wobei in der Blindprobe 2,44 µM an 5-Cl-Tryptophan nachgewiesen werden konnten. Somit resultiert eine mittlere Produktkonzentration von 22 µM vgl. Tab. 4.23.

Tab. 4.23: Resultierende Produktkonzentration der Ganzzelltransformation bei Verwendung frisch kultivierter Zellen

	Initialkonzentration von L-Trp [μM]	detektierte 5-Cl-Trp [μM]	normierte Produkt- konzentration [μM]	Ausbeute [%]
Realprobe	400	24,5	22,1	5,5 %
Blindprobe	–	2,4	–	–

Im Vergleich zu dem diskutierten Einsatz zuvor tiefgefrorener Zellen für eine Ganzzelltransformation, wurde mit frisch kultivierten Zellen eine deutlich geringere Ausbeute von ca. 5,5 % erzielt. Inwiefern bei den verwendeten Versuchsbedingungen eine geringe Menge an Halogenase freigesetzt worden sein könnte, kann nicht eindeutig geklärt werden, lichtmikroskopische Untersuchungen weisen aber auf intakte, sich bewegende Zellen hin. Da zusätzlich der verwendete Puffer einen stabilisierenden Einfluss auf die Zellmembran aufweist, kann eine Freisetzung der Halogenase mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Die resultierende Ausbeute an halogeniertem Tryptophan muss jedoch vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass bislang keine Untersuchungen hinsichtlich des Einsatzes intakter Zellen der rekombinanten Mikroorganismen für die Biotransformation durchgeführt worden sind. Wenn diese Ausbeute als Ausgangswert genommen würde, ließen sich vermutlich deutliche Steigerungen analog zu vielen anderen Prozessen erzielen, wobei die in dieser Arbeit diskutierten Algorithmen eine enorme Hilfestellung leisten könnten. Somit ist diese Verfahrensweise potentiell dafür geeignet, weiter untersucht und optimiert zu werden.

4.5.8 Synopsis

Im Rahmen des Unterkapitels 4.5 dieser Arbeit wurde zunächst eine FADH₂-abhängige Trp-5-Halogenase aus *P. fluorescens* sowie eine Flavinreduktase aus einem rekombinanten *E. coli*-Stamm isoliert und für beide Enzyme eine Aufreinigungsstrategie etabliert. Die Isolierung der rekombinant exprimierten Halogenase aus *P. fluorescens* BL 915 erfolgte nach Kultivierung für 72 h bei 30 °C im HNB-Medium und Zentrifugation der Biomasse (Ausbeute: 8,28 g/L_{Medium}) durch Zellaufschluss und direkter Verwendung des Rohextrakts für die IMAC, wobei 31,3 mg/L_{Medium} bis zur Homogenität gereinigtes Enzym gewonnen werden konnte. Der effektivste Aufschluss zur Freisetzung der Tryptophan-5-Halogenase wurde mit Hilfe einer enzymatischen Desintegration durch Lysozym erreicht. Die Kultivierung des *E. coli* (DE) pEE 1001 JRL1 im LB-Amp₁₀₀-Medium bei 37 °C für 24 h lieferte eine Biomasse von 4,24 g/L_{Medium}. Der effektivste Zellaufschluss konnte dabei mit dem FastPrep[®]-System Lysing Matrix B realisiert werden, wobei ein Gesamtproteingehalt von 653 mg/L resultierte. Die

(Teil-)Aufreinigung der NAD(P)H-abhängigen Flavinreduktase-Oxidoreduktase wurde mittels Gelfiltration unter Verwendung von Sephacryl[®] S-200 durchgeführt.

Die nachfolgende kinetische Untersuchung der Substratspezifität hinsichtlich der Präferenz der aufgereinigten Halogenase für ein Halogenidion zeigte, dass bei gleicher Vorgabe an Chlorid bzw. Bromid ein höherer Anteil des chlorierten Derivats gewonnen werden konnte, die Affinität gegenüber dem Bromid-Ion somit geringer ist. Eine Charakterisierung der Trp-5-Halogenase hinsichtlich der Enzymabhängigkeit von pH und Temperatur ergab ein pH-Optimum von 6,2 sowie ein optimales Temperaturintervall von 23–25 °C. Eine kinetische Analyse, basierend auf Daten der Enzymaktivität nach verschiedenen Inkubationszeiten bei verschiedenen Temperaturen, zeigte, dass das Enzym bei der üblicherweise verwendeten Inkubationstemperatur von 30 °C lediglich eine Halbwertszeit von 43 min aufweist. Eine grobe Schätzung der Aktivierungsenergie für die Deaktivierung lieferte einen Wert von $E_A = 86,4$ kJ/mol und zeigt eindeutig, dass bereits bei Raumtemperatur merkliche (aktive) Stöße stattfinden, die eine geringe Halbwertszeit des Enzyms bedingen. Ein Vergleich mit den Deaktivierungsenergien besonders gut charakterisierter Enzyme veranschaulicht diese Schlussfolgerung. Beispielsweise beträgt die Deaktivierungsenergie für Trypsin 171 kJ/mol bei pH 6,5 und für ATPase 293 kJ/mol bei pH 7,0 [188].

Mittels 2-D-Gelelektrophorese konnte der isolierten Halogenase ein pI-Wert von 5,24 zugeordnet und zudem nachgewiesen werden, dass das Enzym in mehreren Isoformen vorliegt. Der zugewiesene pI des Enzyms zeigt dabei eine sehr gute Korrelation zu dem rein theoretisch aus der Aminosäuresequenz des Enzyms ableitbaren Wert von 5,47.

Dass neben dem Expressionssystem selbst, ebenso die Form und Art des Bioreaktors für das Expressionsprofil von enormer Bedeutung sind, wurde durch einen Vergleich von Inkubationen im Schüttelkolben mit einer Kultivierung im technischen Bioreaktor gezeigt. Durch einen besseren Stoffübergang des Sauerstoffs im begasteten Bioreaktor wird gleichzeitig eine verminderte Expression des Enzyms bzw. eine geringere Enzymaktivität beobachtet. Der schlechtere Stoffübergang des Sauerstoffs im Schüttelkolben resultierte aus einem dicken Schaumfilm, der den Eintrag an der Phasengrenze Luft/Medium stark herabsetzte. Insgesamt konnte bei äquivalenter Biomasseausbeute im Fermenter nur eine Enzymaktivität detektiert werden, die 1/10 der bei Schüttelkolben-Kultivierungen erhaltenen betrug. Inwiefern der Leistungseintrag in den unterschiedlichen Kultivierungsgefäßen einen Einfluss auf die Expression der Halogenase hat, kann lediglich grob abgeschätzt werden, da bislang keine strukturierten Modelle zur Beschreibung des verwendeten Schüttelkolbens existieren. Eine Quantifizierung des Leistungseintrags im verwendeten Bioreaktor ist in erster Näherung möglich [189, 190] und liefert unter Anwendung des eingesetzten Mediums bei den vorgegebenen Parametereinstellungen einen Leistungseintrag von etwa 0,68 W/L. Üblicherweise arbeitet man bei biotechnologischen Kultivierungen mit einem spezifischen Leistungseintrag von etwa 0,1–5 kW/m³. Somit liegt der abgeschätzte Wert eher im unteren Bereich der für technische Prozesse eingesetzten Leistungseinträge. Der Eintrag an Energie durch den Schüttelprozess in den Fermentationskolben dürfte etwas über dem für den Bioreaktor

berechneten Wert liegen, wie Erfahrungswerte an Kolben bis zu einem Volumen von 1 L zeigen [131]. Da das Wachstum des Halogenaseproduzenten im Bioreaktor jedoch insgesamt äquivalent zu dem im Schüttelkolben ist, ist der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Expression des Enzyms stärker zu bewerten als der Leistungseintrag.

Die Aktivitätsbestimmung der Halogenase erfolgte mit einem Standard-Enzymtest, welcher durch verschiedene Modifikationen optimiert werden sollte. Zum Einsatz kam dabei ein Genetischer Algorithmus, der das formulierte 6-dimensionale Problem so lösen sollte, dass eine optimale Beeinflussung aller Komponenten untereinander in einer optimierten Zusammensetzung des Assays resultiert. Zur Auswertung der durchgeführten Variationen der Enzymtestzusammensetzungen wurde eine bestehende Aminosäure-HPLC genutzt, deren Einsatz jedoch, wie sich später herausstellte, problematisch ist. Die dem Aktivitätstest hinzugesetzte Katalase verfälscht die HPLC-Methode insofern, dass die Abweichung umso größer ist, je mehr Katalase im Test eingesetzt wurde. Nachfolgende Versuche zeigten, dass bereits ein Katalasezusatz von 1,5 mU zum Erreichen der maximalen Halogenaseaktivität ausreichend ist. Dieser Wert war 200-fach geringer als der zuvor vom Genetischen Algorithmus ermittelte.

Die detaillierte Untersuchung der Enzymkinetik der Tryptophan-5-Halogenase hinsichtlich des Substratumsatzes zeigte, dass diese mit einem Michaelis-Menten-Ansatz beschrieben werden kann. Somit konnte der Wert der Michaelis-Konstante K_M ($K_M = 0,071$ mM) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} determiniert werden ($v_{\max} = 6,46 \cdot \text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$). Zudem zeigten die durchgeführten Experimente, dass die Halogenase weder einer Substrat- noch einer Produktinhibierung unterliegt.

Als ein alternatives Verfahren, welches eine günstige Gewinnung des halogenierten Produkts ohne vorherige Enzymaufreinigung ermöglicht, wurde für die Biotransformation der Einsatz vitaler Zellen von *P. fluorescens* untersucht. Dabei resultierte eine Ausbeute an halogeniertem Produkt von 5,5 %.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Der marine Lebensraum zeichnet sich durch seine Fülle an Arten sowie der aus ihnen extrahierbaren bzw. von ihnen zur Verfügung gestellten Naturstoffe/-produkte aus, wovon einige im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe bioverfahrenstechnischer Methoden eingehender untersucht wurden.

Das generelle Problem der so genannten Blauen Biotechnologie besteht in der geringen Verfügbarkeit der Organismen und der aus ihnen isolierbaren Sekundärmetabolite oder exprimierten Enzyme. Mit Hilfe mikrobiologischer und technischer Methodenentwicklung wurde deshalb versucht, diesem Problem konstruktiv zu begegnen.

Im Rahmen eines mikrobiologischen Ansatzes wurde untersucht, inwiefern mittels biochemischer Induktion durch den Zusatz von so genannten Autoinducer-Substanzen zum Kultivierungsmedium eine Verbesserung des mikrobiellen Wachstums sowie der Produktion biologisch aktiver Substanzen ermöglicht wird. Bei den Autoinducer-Substanzen handelt es sich um Homoserinlactone, welche Bestandteil der bakteriellen Kommunikation sind. Als Testorganismus wurde zunächst ein im Polyketidscreening positiv aufgefallenes Bakterium (*Halomonas marina*) eingesetzt, welches von der Nordsee Bryozoe *Bugula plumosa* isoliert wurde. Hinsichtlich des Biomassewachstums konnte mit Hilfe des HSL-Stimulus eine Verbesserung im Vergleich zum Referenzmedium um 7 % erzielt werden. Ein positiver Effekt auf das von diesem Stamm produzierte Wirkungsspektrum konnte gegen diverse Gram-positive und Gram-negative Testkeime jedoch nicht verifiziert werden. Eine Erweiterung dieses Testansatzes auf bislang unbeschriebene Gram-negative Bakterien, welche im Rahmen dieser Arbeit zuvor isoliert worden waren, zeigte, dass durch den HSL-Stimulus bei einigen Bakterien die Produktion biologisch aktiver Substanzen induziert bzw. verbessert werden konnte. Inwiefern Homoserinlactone als Mediumszusatz einen Vorteil bei der Anreicherung mariner Mischisolate bieten, wurde mittels einer Supplementierung der Lactone zu einer Anreicherungskultur *Flustra*-assoziiierter Mikroorganismen untersucht. Dabei resultierte im Vergleich zum Referenzmedium eine um 75 % höhere Gesamtzellzahl. Diese Art der Optimierung wird daher in der Zukunft sicherlich weitere Bedeutung erlangen, nicht nur in der verbesserten (unstrukturierten) Reproduktion und Anreicherung von marinen Mischkulturen, sondern vielmehr durch die damit vorhandene verbesserte Möglichkeit der Isolierung bislang unkultivierbarer Organismen. Somit eröffnet sich durch diese Methode ein mögliches Anreicherungsverfahren potentieller Wirkstoffkandidaten, womit eine vereinfachte Isolierung genomischer DNA und nachfolgende Klonierung in einem geeigneten Wirt realisierbar wird. Dies ist für eine weitere Untersuchung der Metabolite hinsichtlich klinischer Untersuchungen und der damit verbundenen notwendigen Verfügbarkeit großer Mengen des Wirkstoffes unentbehrlich. Zunächst sollte jedoch für eine Verifikation der Ergebnisse die Auswahl an Isolaten für den Stimulus erweitert sowie ein breiteres Autoinducer-Spektrum eingesetzt werden.

Mit einer gesteigerten Aufmerksamkeit wird seit einigen Jahren der rechnergestützten Optimierung von Bioprozessen nachgegangen. Das Interesse der marinen Community an solchen Verfahren ist bislang gering und es wird häufig noch die klassische one-factor-at-a-time Methode zum Auffinden geeigneter Wachstumsbedingungen angewandt. Aufgrund der dabei nicht in Betracht gezogenen gegenseitigen Beeinflussung der Kultivierungsparameter und Nährmediumsbestandteile resultieren häufig nicht aussagekräftige Ergebnisse. Zudem mangelt es (noch) an einem Transfer solcher Methoden auf den marinen Bereich. Im Rahmen einer Nährmediumsoptimierung zur Verbesserung der L-Serindehydrataseexpression des marinen Prokaryonten *Paracoccus seriniphilus*, welche nach Vorgaben eines Genetischen Algorithmus und einem Simplex-Algorithmus durchgeführt wurde, konnte insgesamt eine Steigerung der zuvor definierten Zielfunktion um ca. 50 % erreicht werden. Dieses Modellbeispiel veranschaulicht, inwiefern eine von der Subjektivität des Experimentators losgelöste (abgesehen von den Suchraumgrenzen) konsequent durchgeführte rechnergestützte Optimiersequenz zu einer deutlichen Verbesserung eines Prozesses im Rahmen der Blauen Biotechnologie führen kann. Aufgrund der Komplexität der Nährstoffansprüche mariner Mikroorganismen und den daraus resultierenden Schwierigkeiten bei der klassischen Formulierung von Anreicherungs- und Produktionsmedien, werden mittelfristig rechnerbasierte Optimierungsstrategien eingesetzt werden müssen. Dies gilt insbesondere für die im pharmazeutischen Bereich genutzten automatisierten High-Throughput-Screenings, welche teilweise schon in Kombination mit Suchalgorithmen eine Potenzierung ihrer Effizienz erfahren.

Von besonderer Bedeutung in den angewandten Wissenschaften ist in der Regel der schon erwähnte Transfer etablierter Verfahren auf neue Problemstellungen. Bereits seit geraumer Zeit bekannt und mathematisch beschreibbar ist der repetitiv geführte Batch-Betriebsmodus für den Einsatz in der Biokatalyse, wobei hierfür immobilisierte Zellen oder Enzyme eingesetzt werden. Durch die Wiedergewinnung des Biokatalysators bietet sich somit die Möglichkeit, diese Prozesse überhaupt wirtschaftlich zu gestalten. Der Transfer eines solchen Prozesses zur Gewinnung von Biomasse ist dagegen selbst für klassische Bioprozesse unter Beteiligung von terrestrischen Mikroorganismen nur in einem geringen Maße beschrieben, obwohl hinsichtlich der Kontaminationsgefahr als auch einer möglichen Invarianz des Genoms keine Bedenken bestehen sollten, wie anhand der in dieser Arbeit beschriebenen Literaturbeispiele sowie mit einer Abschätzung des theoretisch auftretenden Mutationsanteils einer Zellpopulation dargestellt werden konnte. Inwiefern solch ein rechnergestützter repetitiver Batch-Prozess für die Suche nach optimalen Wachstumsparametern eingesetzt werden kann, wurde erstmalig im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Nachdem mit Hilfe eines *E. coli*-Stammes erfolgreich ein „proof of concept“ dargestellt wurde, konnte nachfolgend ein Transfer auf ein marines Bakterium realisiert werden. Dabei wurden geringfügige Modifikationen am ursprünglich verwendeten Verfahren vorgenommen, so dass zur einfachen Bewertung der Wachstumsrate μ lediglich ein Zeitfenster von 2 h zu beobachten war. Somit konnte die Gesamtdauer eines Suchprozesses enorm verkürzt werden. Die bei diesem Verfah-

ren eingesetzten Algorithmen in der Reihenfolge Genetischer Algorithmus – Simplex-Algorithmus konnten dabei arriert zum Optimum von μ führen. Das diesem entwickelten Verfahren innewohnende Potential kann derzeit noch nicht konkret vorhergesehen werden. Insgesamt ist jedoch von einer Übertragbarkeit auf eine Vielzahl von Organismen auszugehen, da der verwendete Modellorganismus die typischen Charaktereigenschaften eines marinen Mikroorganismus zeigt, wie beispielsweise die Biofilmproduktion. Diese ist bei dem gewählten Modellorganismus besonders stark ausgeprägt, wenn dem Stamm sehr gravierend vom Optimum abweichende Kultivierungsbedingungen vorgegeben werden. Aufgrund der gewählten Prozessführung konnte die Biofilmbildung des Modellorganismus jedoch auf ein zu vernachlässigendes Minimum reduziert werden. Die sich aus diesem Verfahren erschließende Leistungsfähigkeit wird insbesondere vor dem Hintergrund einer möglichen vollautomatischen Gestaltung des Suchprozesses erkennbar. Hierdurch würde sich dem Experimentator die Möglichkeit bieten, nach der Isolation einer marinen oder terrestrischen Reinkultur – möglicherweise unter Anwendung der hier beschriebenen „biochemischen Optimierung“ – diese in einen Bioreaktor zu transferieren, das entwickelte Verfahren automatisiert durchführen zu lassen und nach einem gewissen Zeitraum von der Software das Wachstumsoptimum präsentiert zu bekommen. Die Methode ist dabei nicht auf das in dieser Arbeit eingesetzte Kulturvolumen beschränkt, sondern ebenso downscale-bar, womit dieser Prozess in Mikrotiterplatten durchgeführt werden kann. Da mittlerweile intensiv an Weiterentwicklungen der Mikrotiterplatte für die Durchführung von regelbaren Prozessen und Kultivierungen in den Wells dieser Platten gearbeitet wird, werden sich in den kommenden Jahren neue Anwendungsmöglichkeiten für solch ein automatisiertes Verfahren eröffnen. Beschränkungen des eingesetzten Softwarepaketes in Bezug auf solch eine Maßstabsveränderung des Kultivierungssystems existieren nicht.

Halogenierte Metabolite kommen ubiquitär in der Natur vor. Ihre Entstehung kann zum einen unter harschen Umweltbedingungen, wie sie beispielsweise in der Tiefsee oder auch direkt über der Meeresoberfläche (freie Radikale) vorkommen, erfolgen oder auch unter moderaten Bedingungen stattfinden, was die Beteiligung von Enzymen voraussetzt. Solche halogenierenden Enzyme können im Rahmen der Weißen Biotechnologie entscheidend dazu beitragen, die Synthese halogener Substanzen mit einem deutlich geringeren Gefährdungspotential unter gleichzeitiger Erhöhung der Selektivität durchzuführen, als es unter den bislang genutzten Methoden der Halogenchemie möglich ist. Die eingehende Charakterisierung eines solchen Enzyms, einer Tryptophan-5-Halogenase aus *Streptomyces rugosporus*, war Gegenstand des letzten Kapitels dieser Arbeit. Das Enzym konnte nach rekombinanter Expression eines *Pseudomonas fluorescens*-Stammes aufgrund eines dem Zielprotein anhaftenden His-tags direkt in hoher Reinheit mit Hilfe der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (26,2 mg/L_{Medium}). Aufgrund der FADH₂-Abhängigkeit der Halogenase musste zusätzlich für die Durchführung der Halogenierungsreaktion eine Flavinderduktase bereitgestellt werden, welche unter NADH-Verbrauch FAD zum FADH₂ reduzierte.

Die Flavinreduktase konnte erfolgreich aus einem rekombinanten *E. coli*-Organismus isoliert und in einer für die Halogenierungsreaktion ausreichenden Qualität zur Verfügung gestellt werden.

Eine kinetische Untersuchung der Halogenierungsreaktion zeigte, dass die bislang eingesetzten Standardbedingungen (pH 7,2, 30 °C) des Halogenase-Assays deutlich von den optimalen Bedingungen (pH 6,2, 23 - 25 °C) abweichen. Mit dieser Temperaturreduktion erhöhte sich gleichzeitig auch die Halbwertszeit des Enzyms, die bei der Standardbedingung lediglich 43 min beträgt. Eine Optimierung der kompletten Zusammensetzung des Halogenase-Assays unter Anwendung Genetischer Algorithmen konnte aufgrund der durch die im Test verwendeten Abbruchbedingungen nicht erfolgreich durchgeführt werden. Als Ursache konnte die dem Test zugesetzte Katalase identifiziert werden, welche bei der gewählten Abbruchmethode (95 °C, 5 min) die Aminosäuren Isoleucin und Leucin freisetzt, die äquivalente Retentionszeiten bei der verwendeten HPLC-Methode aufweisen wie das eigentliche halogenierte Target. Eine nachfolgende (klassische) Optimierung des Katalasezusatzes zeigte, dass eine Enzymmenge von 1,5 mU bereits zur Stabilisierung der Halogenase ausreichend ist. Insgesamt konnte mit den hier optimierten Parametern eine Verbesserung zum Referenztest um den Faktor 1,6 erreicht und ein Substratumsatz von fast 95 % erzielt werden. Zudem wurde gezeigt, dass das untersuchte halogenierende Enzym mit einem Michaelis-Menten-Ansatz beschrieben werden kann. Der mit Hilfe der Standardzusammensetzung des Halogenaseassays ermittelte Wert der Michaelis-Konstante beträgt $K_M = 0,071$ mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max} = 6,46 \cdot 10^8$ mol/(L·s). Des Weiteren konnte dem aufgereinigten Enzym erstmalig mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese ein pI-Wert zugeordnet werden. Im Rahmen der verwendeten Versuchsbedingungen konnte ein pI von 5,24 ermittelt und zudem gezeigt werden, dass die Halogenase in mehreren Isoformen vorliegt. Ein Transfer des Expressionssystems vom Schüttelkolben in einen begasten Bioreaktor zeigte eine deutliche Reduktion der Enzymaktivität sowie eine frühere Expression des Enzyms, was vermutlich am erhöhten Sauerstofftransfer im eingesetzten Bioreaktor lag. Als ein alternativer Ansatz, der ohne zusätzliche Supplementierung von weiteren Enzymen und Reduktionsequivalenten zum halogenierten Produkt führen sollte, wurde erstmalig eine Ganzzelltransformation untersucht. Erste Versuche zeigten, dass hierbei in Position 5 halogeniertes Tryptophan produziert wurde, jedoch lediglich in einer Ausbeute von 5 %.

Diese Resultate bieten für nachfolgende Arbeiten diverse Ansatzpunkte, um schließlich das gesamte Potential hinsichtlich einer technischen Bereitstellung des Enzyms zu gewährleisten. Der im Rahmen dieser Arbeit erreichte Substratumsatz von 95 % bietet für solch einen Einsatz zwar viel Raum für Spekulationen, jedoch muss in Betracht gezogen werden, dass die hier beschriebenen Versuche im μ L-Maßstab erfolgten. Deshalb sollten nachfolgende Arbeiten zunächst eingehender auf ein Up-Scaling des Biotransformationsprozesses fokussieren. Ferner sollte der Einfluss von Sauerstoff auf das Expressionsprofil der Halogenase und deren Stabilität untersucht werden, da die Bereitstellung größerer Mengen an Enzym direkt an die resultierende Biomasse ge-

knüpft ist und Fermentationen im begasten Bioreaktor kaum umgangen werden können. Ebenso bedeutsam für die technische Realisierung ist die Informationsgewinnung hinsichtlich der Leistungseinträge im verwendeten Schüttelkolben und Bioreaktor sowie der Abhängigkeit der Expression vom Leistungseintrag. Hierfür muss zunächst der eingesetzte Schüttelkolben hinsichtlich des Leistungseintrags für verschiedene Füllhöhen bei der verwendeten Exzentrizität des genutzten Schüttlers beschrieben werden. Für die Abschätzung von Leistungseinträgen in Rührkesselreaktoren existieren zwar Modelle, diese können jedoch unter bestimmten Umständen wie beispielsweise beim Vorhandensein verschiedener Reaktoreinbauten nicht direkt auf das eigene Fermentationssystem übertragen werden.

Ebenso wichtig ist die Klärung des vom Enzym umgesetzten Substratspektrums sowie dessen mögliche Erweiterung durch beispielsweise „site-directed mutations“, wobei diese Arbeiten in Kooperation mit Molekularbiologen zu überprüfen sind. Interessant ist dabei auch, inwiefern durch diese Maßnahmen eine Stabilisierung des Enzyms erreicht werden kann, da die bisher vorgelegten Daten unzureichend für eine technische Prozessführung sind. Unentbehrlich sind daher Untersuchungen zur Immobilisierung der Halogenase. Hierdurch bestünde vermutlich die Möglichkeit, die Halbwertszeit des Enzyms deutlich zu erhöhen bzw. durch eine Wiedergewinnung in repetitiv geführten Batch-Prozessen hohe Raum-Zeit-Ausbeuten zu erreichen. Vor diesem Hintergrund spielt insbesondere die Ganzzelltransformation eine besondere Rolle. Die in dieser Arbeit erzielte Ausbeute betrug zwar lediglich 5 %, jedoch handelt es sich dabei um den ersten durchgeführten Versuch, welcher den Einsatz ganzer Zellen für die Biotransformation nutzte. Durch weitere Maßnahmen, auch unter Einsatz der in dieser Arbeit beschriebenen Optimierungsmodelle, können vermutlich deutliche Verbesserungen erzielt werden. Vorteilhaft am Einsatz ganzer Zellen ist die Vermeidung des Zusatzes von kostenintensiven Reduktionsequivalenten. In diesem Bereich wäre die Durchführung weiterer Arbeiten hinsichtlich eines möglichen Recyclings von FAD empfehlenswert, wobei neben der Immobilisierung der Enzyme der Einsatz eines Membranreaktors mit in die Arbeitspakete aufgenommen werden sollte. Zudem sollte eine Determinierung des Flavinreduktase- und des Halogenase-Gens auf ein und dem selben Plasmid vorgenommen werden. Eine mögliche Induzierbarkeit der Expression beider Enzyme wäre dabei wünschenswert. Durch die dann mögliche Co-Expression beider Enzyme sollte das Verfahren einen deutlichen Zugewinn der Wirtschaftlichkeit erfahren, da sowohl die Kultivierungszeit als auch die hiermit verbundenen Materialkosten reduziert würden. Vor dem Hintergrund, dass die Entdeckung der Flavin-abhängigen Enzyme erst zehn Jahre zurückliegt, sind in diesem Zeitraum beträchtliche Resultate erzielt worden, von denen weitere Auswirkungen für die gesamte Halogenchemie zu erwarten sind. So könnten Halogenasen nach Erweiterung des Substratspektrums für die schonende Synthese von halogenierten Feinchemikalien eingesetzt werden, um diese selbst als Produkt zu nutzen oder als Synthons, welche aufgrund der Einführung einer funktionellen Gruppe nachfolgende Pd-Kupplungsreaktionen erlauben.

6 Anhang

6.1 Zusammensetzung der Kultivierungsmedien

Die Medienbestandteile wurden generell in entmineralisiertem Wasser gelöst und durch Autoklavieren in gespanntem Wasserdampf bei 121 °C und einem bar Überdruck für 20 min sterilisiert. Hitzelabile Mediumskomponenten wurden den abgekühlten Medien gegebenenfalls nach dem Autoklavieren in Form sterilfiltrierter Stammlösungen zugegeben. Bei der Herstellung von Festmedien erfolgte deren Zugabe bei ca. 50 °C, kurz bevor die Medien für die Plattenherstellung verwendet wurden.

6.1.1 Marine Broth 2216

Das für die Kultivierung mariner Mikroorganismen verwendete Komplexmedium wurde als vorbereitete Mischung von BD Biosciences bezogen. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tab. 6.1 angegeben. Für ein vollkonzentriertes Medium (MB100) müssen hiervon 37,4 g in einem Liter Wasser aufgelöst werden.

Tab. 6.1: Zusammensetzung des Basismediums Marine Broth 2216

Substanz	Menge
NaCl	19,45 g/L
MgCl ₂	8,8 g/L
Pepton	5 g/L
Na ₂ SO ₃	3,24 g/L
CaCl ₂	1,8 g/L
Hefe-Extrakt	1,0 g/L
KCl	0,55 g/L
NaHCO ₃	0,16 g/L
Fe(III)-Citrat	0,1 g/L
KBr	0,08 g/L
SrCl ₂	0,03 g/L
H ₃ BO ₃	0,02 g/L
Na ₂ HPO ₄	8,0 mg/L
Na ₂ Si ₃ O ₇	5,3 mg/L
NaF	2,4 mg/L
NH ₄ NO ₃	1,6 mg/L

6.1.2 Marine Broth 2216 Varianten

Das Wachstum vieler mariner Mikroorganismen ist auf dem vollkonzentrierten MB 2216 nur ungenügend. Deshalb wurden oftmals verdünnte Variationen des Mediums verwendet, deren Zusammensetzung Tab. 6.2 zu entnehmen ist. Der hierdurch entstandene verringerte Salzgehalt wurde dementsprechend durch Natriumchloridzugabe ausgeglichen.

Tab. 6.2: Zusammensetzung der Kultivierungsmedien MB20, MB25, MB50

Substanz	MB20 [g/L]	MB25 [g/L]	MB50 [g/L]
Marine Broth 2216	7,48 g/L	9,35 g/L	18,7 g/L
Natriumchlorid	15,56 g/L	14,59 g/L	9,73 g/L

Gegebenenfalls wurde den Medien je 1 g/L Glucose hinzugefügt. Zur Herstellung von Festmedien wurden entsprechend 15 % Agar-Agar (w/v) addiert. Der pH-Wert der Lösungen betrug nach dem Autoklavieren 7,0.

6.1.3 Artificial Seawater

Artificial Seawater (vgl. Tab. 6.3) enthält keine Kohlenstoffquelle und dient lediglich als Zusatz zu anderen Nährmedien, um marine Salzkonzentrationen einzustellen.

Tab. 6.3: Zusammensetzung von Artificial Sea Water

Substanz	Menge
MgSO ₄ ·7H ₂ O	24,65 g/L
NaCl	23,37 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,94 g/L
KCl	1,49 g/L

6.1.4 Seawater Basal Medium

Das Seawater Basal Medium basiert auf dem Artificial Seawater Medium und enthält als Kohlenstoffquelle Lactat. Die Zusammensetzung ist in Tab. 6.4 angegeben.

Tab. 6.4: Zusammensetzung Seawater Basal Medium (SwBasal)

Substanz	Menge
NH ₄ Cl	10,0 g/L
Lactat	2,0 g/L
K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O	75,0 mg/L
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	29,0 mg/L
TRIS	6,055 g/L
Artificial Seawater	50 % (v/v)

6.1.5 Synthetic Seawater Medium (SSM)

Das Synthetic Seawater Medium basiert ebenfalls wie das SwBasal-Medium auf dem Artificial Seawater, enthält jedoch mehrere C-Quellen. Die Zusammensetzung ist in Tab. 6.5 angegeben.

Tab. 6.5: Zusammensetzung des Synthetic Seawater Mediums (SSM)

Substanz	Menge
NaCl	27,0 g/L
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	7,0 g/L
Mononatriumglutamat	5,0 g/L
TRIS	2,0 g/L
Glucose	1,0 g/L
KCl	0,6 g/L
CaCl ₂	0,3 g/L
Na ₂ -Glycerolphosphat Pentahydrat	0,283 g/L
Vitamin B ₁₂	1 µg/L

6.1.6 Yeast Extract Malt Agar (YMA) Medium

Basierend auf dem Seawater Basal Medium enthält das YMA-Medium zwei Komplexmedien als Bestandteile. Als zusätzliche, jedoch schwer zu verstoffwechselnde C-Quelle enthält es Agar. Die Zusammensetzung ist in Tab. 6.6 angegeben.

Tab. 6.6: Zusammensetzung YMA-Medium

Substanz	Menge
Malzextrakt	0,5 g/L
Hefeextrakt	0,5 g/L
Seawater Basal Medium	75 % (v/v)
Agar	1,0 g/L

Bei der Herstellung wird zunächst Agar in 750 mL Seawater Basal Medium und 250 mL H₂O_{bidest.} dispergiert und zum Sieden erhitzt, anschließend werden Hefe- und Malzextrakt hinzugegeben und das Medium autoklaviert.

6.1.7 Pepton-Hefeextrakt-Medium

Das Pepton-Hefeextrakt-Medium diene ausschließlich zur Kultivierung von *Paracoccus seriniphilus*. Die Zusammensetzung beruht auf Arbeiten von M. Laroche [30] und ist Tab. 6.7 zu entnehmen.

Tab. 6.7: Zusammensetzung des Pepton-Hefeextrakt-Mediums

Substanz	Menge
Bacto-Pepton	5 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	3 % (w/v)
*L-Serin	1 g/L

* wurde mit Hilfe einer Stammlösung steriltfiltriert dem autoklavierten Medium zugesetzt

6.1.8 Hefe-Nähr-Bouillon (HNB) Medium

Das HNB-Medium diene zur Kultivierung des rekombinanten *Pseudomonas fluorescens* BL915 + pSZexM2. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tab. 6.8 angegeben.

Tab. 6.8: Zusammensetzung des HNB-Mediums

Substanz	Menge
Fleischextrakt	3,0 g/L
Hefeextrakt	5,0 g/L
Pepton aus Fleisch	5,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Tetracyclin	30 mg/L

Der pH-Wert des Mediums wurde nach dem Ansetzen mit 0,1 M Natronlauge auf 7,0 eingestellt.

Tetracyclin wurde vor dem jeweiligen Kultivierungsbeginn hinzugegeben. Hierfür wurde eine sterilfiltrierte Stammlösung, die 30 mg/mL Tetracyclin in reinem Ethanol enthielt, verwendet. Aliquots der sterilen Stammlösung wurden bei -20 °C gelagert.

6.1.9 Luria Broth (LB)-Medium zur Kultivierung rekombinanter *E. coli*-Stämme

Das LB-Medium diente zur Kultivierung der rekombinanten *E. coli*-Stämme JM109 (DE) pEE 1001 JRL1 (Produzent der Flavinreduktase) sowie *E. coli* 5K (pHM12) (Teststamm für die repetitiven Batch-Versuche). Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tab. 6.9 aufgeführt.

Tab. 6.9: Zusammensetzung des LB-Mediums

Substanz	Menge
Bacto Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L
Ampicillin	100 mg/L

Der pH-Wert des Mediums wurde nach dem Ansetzen mit 0,1 M Natronlauge auf 7,0 eingestellt.

Die notwendige wässrige Ampicillin-Stammlösung (100 mg/mL) wurde vor dem jeweiligen Kultivierungsbeginn frisch angesetzt und sterilfiltriert addiert.

6.2 Sonstige Lösungen

Die hier angegebenen Mengenangaben der eingesetzten Substanzen beziehen sich alle, soweit nicht anders angegeben, auf H₂O_{bidest.} als Lösungsmittel.

6.2.1 Saline

Die Saline-Lösung diente zum Waschen der rekombinanten Zellen von *E. coli* bzw. *Pseudomonas fluorescens*. Die Zusammensetzung ist Tab. 6.10 zu entnehmen.

Tab. 6.10: Zusammensetzung der Salinelösung

Substanz	Menge
NaCl	5 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12 g/L

6.2.2 Kaliumphosphat-Puffer (KPP-Puffer)

Kaliumphosphatpuffer wurde in verschiedenen Konzentrationen in dieser Arbeit eingesetzt. Der Tab. 6.11 sind die jeweiligen Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer zu entnehmen.

Tab. 6.11: Zusammensetzung der eingesetzten KPP-Puffer

Substanz	0,01 M; pH 7,2	0,1 M; pH 7,2	0,1 M; pH 7,6
	Menge	Menge	Menge
KH ₂ PO ₄	0,54 g/L	3,77 g/L	1,76 g/L
K ₂ HPO ₄	1,03 g/L	12,58 g/L	15,15 g/L

6.2.3 Stammlösung acylierter Homoserinlactone

Die Stammlösung acylierter Homoserinlactone, welche im Rahmen der Quorum Sensing-Versuche eingesetzt wurde, enthielt jedes Lacton mit einer Konzentration von 0,8 mM. Das Ansetzen dieser Lösung erfolgte durch Lösen der in Tab. 6.12 angegebenen Substanzmengen in 10 mL Essigsäureethylester. Nach Sterilfiltration wurde die Lösung bei 4 °C gelagert.

Tab. 6.12: Zusammensetzung der HSL-Stammlösung

Chemische Bezeichnung	Summenformel	Molekulargewicht [g/mol]	Masse [mg]
N-Decanoyl-DL-HSL	C ₁₄ H ₂₅ NO ₃	255,35	2,0
N-Dodecanoyl-DL-HSL	C ₁₆ H ₂₉ NO ₃	283,41	2,3
N-Heptanoyl-DL-HSL	C ₁₁ H ₁₉ NO ₃	213,28	1,7
N-Butyryl-DL-HSL	C ₈ H ₁₃ NO ₃	171,2	1,4
N-Octanoyl-DL-HSL	C ₁₂ H ₂₁ NO ₃	227,3	1,8
N-Tetradecanoyl-DL-HSL	C ₁₈ H ₃₃ NO ₃	311,5	2,5

6.2.4 Tris-EDTA-Puffer

Für den enzymatischen Zellaufschluss mit Lysozym wurde ein 0,05 M TRIS-EDTA-Puffer eingesetzt, dessen Zusammensetzung in Tab. 6.13 angegeben ist.

Tab. 6.13: Zusammensetzung des Tris-EDTA-Puffers

Substanz	Menge
Tris	1,21 g/L
EDTA; Dinatriumsalz	0,37 g/L

Zur Einstellung des pH-Wertes auf pH 8 wurde 1 M Salzsäure verwendet.

6.3 Konservierung von Mikroorganismen

6.3.1 Stammhaltung auf Agarplatten

Die Stammhaltung auf Agarplatten erfolgte auf den entsprechenden Nährmedien mit einem Zusatz von 15 % (w/v) Agar. Nach dem Beimpfen wurde bis zur Ausbildung von Kolonien bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Anschließend wurden die Platten bei 4 °C gelagert. Im Abstand von vier Wochen erfolgte ein erneutes Überimpfen der Reinkulturen.

Diese Methode fand keine Anwendung bei den rekombinanten *P. fluorescens*- und *E. coli*-Stämmen.

6.3.2 Stammhaltung in Gefrierkulturen

Zur Langzeitkonservierung bzw. Stammhaltung rekombinanter Mikroorganismen wurden diese bis zur exponentiellen Wachstumsphase in den entsprechenden Wachstumsmedien herangezogen. Anschließend wurden aus der Kulturbrühe je vier mal 1 mL entnommen und zentrifugiert (2 min, 3000 g). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in insgesamt 600 µL frischem Medium resuspendiert und nach dem Zusatz von 400 µL 50%iger (v/v) steriler Glycerinlösung bei -80 °C gelagert.

6.4 Verwendete Aktivitäts-Assays

6.4.1 Test auf antimikrobielle Wirksamkeit

Zur quantitativen Prüfung der Wirkung eines Extraktes oder eines isolierten Sekundärmetaboliten wurde ein Plattendiffusionstest durchgeführt.

Hierfür wurden mit Hilfe eines Locheisens runde Scheiben mit 4 mm Durchmesser aus einem Filterpapier (Schleicher&Schuell, Schwarzband, Sorte 589/1, α -Cellulosegehalt >95%) ausgestanzt und diese autoklaviert. Anschließend wurden Nähragarplatten mit

Testkeimsuspensionen versetzt, die autoklavierten Filterpapierscheiben auf die Platten gelegt und diese mit je 7 μL der aus verschiedenen Bakterienstämmen gewonnenen Extrakte versetzt. Die sich anschließende Inkubation der beimpften Agarplatten erfolgte zunächst für vier Stunden bei 4 °C und dann 2–3 Tage im Brutschrank bei 28 °C.

Bei positiver Reaktion war nach Bebrütung eine Hemmzone zu sehen, deren Durchmesser proportional zur Konzentration des Antibiotikums ist. Als Positivkontrolle dienten jeweils mit Penicillinlösung (Konzentration der Stammlösung: 1 mg/mL in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$) getränkte Filterpapierscheiben, die zusätzlich auf jede Platte gelegt wurden. Als Blindproben dienten reine, sterilfiltrierte Lösungsmittel die in analoger Weise auf die ausgestanzten Filterpapiere aufgetragen und mit den Testkeimen inkubiert wurden. Die verwendeten Testorganismen sind in Tab. 6.14 aufgelistet.

Tab. 6.14: Verwendete Testkeime im Plattendiffusionstest

Testkeim	Herkunft, Gram-Verhalten
<i>Paracoccus seriniphilus</i> (LS1)	mariner Stamm, Gram-negativ
<i>Streptomyces</i> sp. (B8300)	mariner Stamm, Gram-positiv
<i>E. coli</i> 5K (pHM12)	terrestrischer Stamm, Gram-negativ
<i>Bacillus subtilis</i>	terrestrischer Stamm, Gram-positiv

6.4.2 L-Serindehydratase-Assay

Die L-Serindehydratase aus dem marinen Gram-negativen Bakterium *Paracoccus seriniphilus* katalysiert die Reaktion von L-Serin zu Pyruvat. Da in dieser Arbeit ausschließlich mit unaufgereinigter Serindehydratase aus dem Rohextrakt gearbeitet wurde, konnte keine Detektion über eine gekoppelte Enzymreaktion über den Verbrauch von NADH erfolgen. Zum Einsatz kam hier eine Methode, bei der das produzierte Pyruvat in einer nachgeschalteten Reaktion mit Dinitrophenylhydrazin zu einem Hydrazon [(2,4-Dinitrophenyl)-hydrazono]-Propionsäure reagiert, dessen Bildung unter basischen Bedingungen bei 550 nm eine photometrische Detektion erlaubt [191]. Zum Einsatz kam hier ein Zweistrahl-Spektralphotometer Uvikon 940 (Fa. Kontron), wobei für alle Messungen Einmal-Halbmikroküvetten (Schichtdicke 1 cm, Fa. Ratiolab) verwendet wurden. Die einzelnen Schritte des Enzymtests sind in Tab. 6.15 angegeben.

Tab. 6.15: Ablaufschema zur Bestimmung der L-Serindehydratase-Aktivität in Rohextrakten [192]

Komponente / Schritt	Messküvette ₁	Messküvette ₂	Blank
KPP-Puffer (100 mM, pH 7,6)	300 µL	300 µL	400 µL
L-Serin (20 g/L in 0,1 M KPP-Puffer, pH 7,6)	50 µL	50 µL	-
Rohextrakt	50 µL	50 µL	-
DNPH	-	150 µL	150 µL
Inkubieren	10 min / 51 °C	10 min / RT	10 min RT
DNPH	150 µL	-	-
Inkubieren	10 min / RT	-	-
NaOH (3 M)	550 µL	550 µL	550 µL
Inkubieren	10 min / RT	10 min / RT	10 min / RT
Absorptionsmessung bei 550 nm			

Mit der hier beschriebenen Methode zur Pyruvatanalytik kann jeweils pro Enzymtest ein Messpunkt (Messküvette₁ bzw. E_1) nach einer definierten Reaktionszeit ($t = 10$ min) des Enzyms mit dem Substrat aufgenommen werden. Ein zum Zeitpunkt $t = 0$ min aufgenommener Referenzwert (Messküvette₂ bzw. E_2) diene dazu, nicht aus der enzymatischen Umsetzung stammendes Pyruvat zu ermitteln. Gemessen wurde gegen den Blank-Wert, dessen Zusammensetzung der Tab. 6.15 zu entnehmen ist.

Die Volumenaktivität der L-Serindehydratase wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] = \frac{E_1 - E_2}{\text{min}} \cdot \left(\frac{1}{\varepsilon \cdot d} \right) \cdot \frac{V_{\text{gesamt}}}{V_{\text{Probe}}} \cdot f_{\text{verd.}}$$

Dabei sind:

E_1	Extinktion der Messküvette ₁
E_2	Extinktion der Messküvette ₂
ε	molarer Extinktionskoeffizient von [(2,4-Dinitrophenyl)- hydrazono]-Propionsäure $\left[8,989 \frac{\text{mL}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$ [30]
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
$V_{\text{gesamt, Probe}}$	Gesamtvolumen in der Küvette, Volumen der Enzymlösung [µL]
$f_{\text{verd.}}$	Verdünnungsfaktor

6.4.3 Flavinreduktase-Assay

Die Flavinreduktase aus dem rekombinanten Stamm *E. coli* JM (DE) pEE 1001 JRL1 ist in der Lage, die Reaktion von FAD mit NADH/H⁺ zu FADH₂ und NAD⁺ zu katalysieren. Die Bestimmung der Volumenaktivität des Enzyms erfolgte durch Messung der Absorptionsabnahme bei 340 nm in Abhängigkeit von der Zeit und den daraus ermittelten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten.

Die Messungen wurden in einem Zweistrahlenspektrophotometer (Fa. Kontron, Uvikon 940) durchgeführt. Die Geräteeinstellungen finden sich in Tab. 6.16.

Tab. 6.16: Uvikon 940-Geräteeinstellungen für Flavinreduktase-Aktivitätsmessungen

Parameter	Einstellung
Messverfahren	Time Drive
Delay	1 s
Messfrequenz	50 Hz
Messzeit	5 min

Alle Messungen wurden in Einmal-Halbmikroküvetten (Schichtdicke 1 cm, Fa. Ratio-lab) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Aktivitätstests ist in Tab. 6.17 angegeben.

Tab. 6.17: Enzymtestzusammensetzung zur Bestimmung der Flavinreduktase-Aktivität

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration in der Küvette	Volumen [μL]
FLR aus GF-Pool		/	10
FAD	1 mM	10 μM	10
KPP, pH 7,2		je 100 mM	977,5
NADH	50 mM	125 μM	2,5
		Σ	1000

Als Referenz diente eine äquimolare Zusammensetzung des Tests, jedoch ohne NADH-Zusatz. Die Volumendifferenz wurde mit Kaliumphosphat-Puffer ausgeglichen.

Für den Zusammenhang zwischen Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, ausgedrückt durch die Absorptionsänderung ΔE , und FLR-Volumenaktivität ergibt sich folgende Gleichung:

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{L}} \right] = \frac{\Delta E}{t} \cdot \left(\frac{10^6}{\varepsilon \cdot d} \right) \cdot \frac{V_{\text{gesamt}}}{V_{\text{Probe}}}$$

Dabei sind:

$\frac{\Delta E}{t}$	Betrag der Tangentensteigung $\left[\frac{1}{\text{min}} \right]$
ε	molarer Extinktionskoeffizient von NADH $\left[6220 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
$V_{\text{gesamt,Probe}}$	Gesamtvolumen in der Küvette, Volumen der Enzymlösung [μL]

6.4.4 DCPIP-Test auf Reduktaseaktivität

Der so genannte DCPIP-Test beruht auf der Reduktion des blauen Farbstoffs 2,6-Dichlorphenol-indophenol-Natrium zu einer farblosen Leuko-Verbindung in Gegenwart von Reduktasen [193]. Mit Hilfe dieses Assays lassen sich jedoch nur qualitative Analysen durchführen. Die Komponenten der Stammlösung für den Test sind in Tab. 6.18 aufgeführt. Zur Überprüfung auf Reduktaseaktivität wurden 10 μL der zu testenden Proteinlösung mit 6 μL der Stammlösung und 184 μL Tris-EDTA-Puffer (50 mM, pH 8) vermischt, eine Entfärbung gilt als Indikator.

Tab. 6.18: Zusammensetzung der Stammlösung des DCPIP-Tests

Substanz	Konzentration	Volumen
DCPIP	10 mM	20 μL
NADH	50 mM	40 μL
FAD	1 mM	10 μL

6.4.5 Katalase-Assay

Zur Bestimmung der Katalase-Aktivität wurde eine 30 mM H_2O_2 -Stammlösung 1:333 mit 0,01 M KPP (pH 7,2) verdünnt und ein Aliquot von 500 μL in einer Quarzglas-Küvette vorgelegt. Die zu untersuchende Katalase-Stammlösung (Fa. Merck KGaA) wurde zunächst 1:2.000 mit 0,01 M KPP (pH 7,2) verdünnt, wovon 1.000 μL in die Küvette pipettiert wurden, um die Reaktion zu starten. Die Detektion der Extinktionsabnahme von H_2O_2 erfolgte bei 240 nm für 30 s bei RT (Referenz: H_2O) und die Ermittlung der Aktivität nach folgender Gleichung:

$$\left[\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] = \frac{V \cdot 1000 \cdot \Delta E / \text{min}}{\varepsilon \cdot v \cdot d}$$

- mit: V = Ansatzvolumen
 v = Probenvolumen
 ε = Molarer Extinktionskoeffizient von H_2O_2
($\varepsilon = 0,036 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
 d = Schichtdicke (1 cm)
 ΔE = Extinktionsänderung

6.5 Proteinanalytik

6.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Anlehnung an die Methode von Lowry [194] wurde ein Testkit der Firma Pierce (Modified Lowry Protein Assay) verwendet. Bei dieser Methode wird das Protein unter alkalischen Bedingungen mit zweiwertigen Kupferionen in Gegenwart von Natriumtartrat umgesetzt, wobei ein vierzähliger Kupferkomplex mit einwertigem Kupfer resultiert. Die anschließende Zugabe eines 1:2 mit dest. Wasser verdünntem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz, bedingt einen wasserlöslichen blauen Komplex, dessen Absorption im sichtbaren Licht bei 750 nm mit einem Photometer bestimmt wurde (Fa. Kontron, Uvikon 940). Die genaue Durchführung ist im Folgenden beschrieben.

Je 200 μL der Proteinprobe bzw. der Proteinstandards wurden in einer Halbmikroküvette vorgelegt, nach dem Addieren von 1 mL des modifizierten Lowry-Reagenzes gemixt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden jeweils 100 μL des verdünnten Folin-Ciocalteu-Reagenzes dazugegeben und die Ansätze, nach dem Mischen mit einem Mikrospatel, für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurde im Zweistrahlphotometer (Fa. Kontron, Uvikon 940) die Absorption der Probe bei 750 nm gemessen. Die Messung erfolgte gegen einen äquivalent behandelten Verdünnungspuffer.

6.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Whitaker und Granum

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen durch Messung der UV-Absorption erfolgte nach der Methode von Whitaker und Granum [195]. Hierfür wurde die Extinktion der Probe mit einem Zweistrahlphotometer (Fa. Kontron, Uvikon 940) bei 235 nm und 280 nm gegen den verwendeten Verdünnungspuffer gemessen und die Konzentration der Proteine nach Bildung der Differenz beider Werte und nachfolgender Division mit dem Faktor 2,51 erhalten.

Somit gilt:

$$c \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = \frac{(E_{235} - E_{280})}{2,51} \cdot f_{\text{verd.}}$$

mit: E_{235} = Extinktion bei 235 nm

E_{280} = Extinktion bei 280 nm

$f_{\text{verd.}}$ = Verdünnungsfaktor

Aufgrund des Lambert-Beer'schen Gesetzes besitzt diese Gleichung eine Gültigkeit für Extinktionswerte $< 1,2$ (E_{235}) bzw. $0,8$ (E_{280}). Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden daher gegebenenfalls vorher verdünnt.

6.5.3 Durchführung der SDS-Gelelektrophorese

Für die Charakterisierung und Analytik von Proteingemischen mittels SDS-Gelelektrophorese kam ein Criterion™ Precast Gel System der Firma BioRad zum Einsatz. Hierfür wurden die Proben 1:2 mit dem SDS-Probenpuffer (vgl. Tab. 6.19) verdünnt und anschließend im Thermoschüttler bei 300 rpm für 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren für 5 min mit 16.000 g wurden die so präparierten Proben und die Markerproteinlösung nacheinander mit einer Mikroliterpipette in die Taschen eines Gels überführt, das zuvor in der mit TGS-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer arretiert worden war. Für die Trennung wurde üblicherweise mit einer Spannung von 180–200 V gearbeitet. Dabei dauerte die Trennung etwa 1–1,5 h, erkennbar an der aus dem Gel austretenden Bromphenolblau-Front.

Die Anfärbung des Gels erfolgte mit Coomassie Brilliantblau R-350. Dabei wurde das Gel für mindestens eine Stunde bei RT in einer Coomassie-Lösung (vgl. Tab. 6.20) unter stetigem Schwenken inkubiert. War das komplette Gel tiefblau gefärbt, wurde die Färbelösung entfernt und das Gel im Entfärber (vgl. Tab. 6.20) solange inkubiert, bis der Hintergrund vollständig entfärbt und nur noch die Banden zu sehen waren. Die Entfärbung wurde dann durch Austausch der Entfärberlösung gegen dest. Wasser gestoppt.

Tab. 6.19: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Puffer

	Komponente	Einwaage pro L	Konzentration
SDS-Puffer* (Probenpuffer)	Tris-HCl	3,152 g	20 mM
	EDTA-Na ₂	0,7445 g	2 mM
	SDS	50 g	5 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,2 g	0,02 % (w/v)
TGS-Puffer, pH 8,3 (Laufpuffer)	Tris	3,03 g	25 mM
	Glycin	14,41 g	192 mM
	SDS	1,0 g	0,1 % (w/v)

* direkt vor der Verwendung wurden dem SDS-Puffer 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol zugefügt

Tab. 6.20: Zusammensetzung der Coomassie-Lösung und des -Entfärbers

	Komponente	Volumen
Coomassie- Lösung*	PhastGel Blue R-Tablette (Pharmacia Biotech)	-
	dest. Wasser	80 mL
	Methanol	120 mL
Coomassie- Entfärber	Methanol	300 mL
	Essigsäure	100 mL
	dest. Wasser	600 mL

*Lsg. wurde vor der Verwendung filtriert

6.5.4 Zusätzliche Informationen zur 2-D-Gelelektrophorese

Entsprechend dem Kapitel 4.5.4.6 sind hier alle weiteren Lösungen sowie Protokolle aufgelistet, sofern sie dort noch nicht eingehend beschrieben wurden.

Tab. 6.21: Rehydrierungspuffer für IPG-Streifen

Substanz	Menge *
Harnstoff	12 g
Triton X-100	0,5 g
1 % Bromphenolblau	50 µL
IPG-Buffer	500 µL

*in 25 mL Gesamtvolumen H₂O_{dest.}

Tab. 6.22: SDS-Equilibrierungspuffer

Substanz	Menge *
SDS	2 g
Tris-Base, pH 8,8	0,6 g
Harnstoff	36 g
Glycerol (87 %ig)	30 g
Bromphenolblau	2 mg

*in 100 mL Gesamtvolumen H₂O_{dest.}

Tab. 6.23: Fixing Solution

Substanz	Menge *
Ethanol	200 mL
Essigsäure	50 mL

*auf 500 mL Gesamtvolumen mit H₂O_{dest.} aufgefüllt

Tab. 6.24: Sensitizing Solution

Substanz	Menge *
Ethanol	75 mL
Glutardialdehydlösung (25 %; w/v)	1,25 mL
Natriumthiosulfatlösung (5 %; w/v)	10 mL
Natriumacetat	17 g

*auf 250 mL Gesamtvolumen mit H₂O_{dest.} aufgefüllt

Tab. 6.25: Silver Solution

Substanz	Menge*
Silbernitratlösung (2,5 % w/v)	25 mL
Formaldehydlösung (37 %; w/v)	0,1 mL

*auf 250 mL Gesamtvolumen mit H₂O_{dest.} aufgefüllt

Tab. 6.26: Developing Solution

Substanz	Menge*
Natriumcarbonat	6,25 g
Formaldehydlösung (37 %; w/v)	0,1 mL

*auf 250 mL Gesamtvolumen mit H₂O_{dest.} aufgefüllt

Tab. 6.27: Stop Solution

Substanz	Menge*
EDTA-Na ₂ ·2 H ₂ O	3,65 g

*auf 250 mL Gesamtvolumen mit H₂O_{dest.} aufgefüllt

Tab. 6.28: Preserving Solution

Substanz	Menge*
Glycerol (87 %)	25 mL

*auf 250 mL Gesamtvolumen mit H₂O_{dest.} aufgefüllt

Tab. 6.29: Methanol-Lösung (5 %, w/v)

Substanz	Menge*
Methanol	50 g

*auf 1000 mL Gesamtvolumen mit H₂O_{dest.} aufgefüllt

Tab. 6.30: Protokoll zur Silbernitratfärbung des 2-D-Gels

Schritt	Lösung	Zeit [min]
1	Fixing Solution	45
2	Fixing Solution	30
3	5 % Methanol	15
4	5 % Methanol	15
5	Senzitizing Solution	30
6	5 % Methanol	30
7	5 % Methanol	30
8	Ention. Wasser	5
9	Ention. Wasser	5
10	Silver Solution	20
11	Ention. Wasser	1
12	Ention. Wasser	1
13	Developing Solution	10
14	Stop Solution	10
15	Ention. Wasser	5
16	Ention. Wasser	5
17	Ention. Wasser	5
18	Preserving Solution	30 +

Tab. 6.31: Verwendete Geräte und Materialien der Firma Amersham Biosciences

Electrophoresis Power Supply, EPS 3501 XL
 Electrophoresis System, Multiphor II
 Autostainer, Processor Plus
 Thermostatic Circulator, Multitemp III
 Imaging Software, Software Image Master 2D Platinum
 SDS-Gel, Excelgel 2-D Homogeneous 12,5 (110 x 250 mm)
 Buffer Strips, Excelgel SDS Buffer Strips
 Drystrip Cover Fluid
 IPG Buffer

6.6 Prozessanalytik

6.6.1 Bestimmung der Optischen Dichte

Die Optische Dichte (OD) der Kulturlösung ist ein Maß für die Zelldichte einer Bakterien suspension. Sie wurde als Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm bzw. 595 nm in einem Zweistrahl-Spektralphotometer Uvikon 940 (Fa. Kontron) gemessen. Die Proben wurden gegebenenfalls vor der Messung mit NaCl-Lösung (0,9%ig) bis zu einer maximalen Absorption / Extinktion von 0,8 verdünnt und anschließend in Halbmikro-Einwegküvetten (Schichtdicke 1 cm, Fa. Ratiolab) bei RT zur Bestimmung der Optischen Dichte verwendet. Als Referenz diente eine 0,9%ige NaCl-Lösung, da entsprechend verdünntes, zellfreies Kulturmedium bei der eingestellten Wellenlänge eine zu vernachlässigende Absorption besitzt. Um Verdünnungsfehler zu minimieren, wurden jeweils zwei Parallelbestimmungen durchgeführt.

6.6.2 Mikroskopische Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde eine so genannte „Thomakammer“ verwendet. In dieser Kammer sind in einer vertieften Ebene mehrere Stege eingeschliffen, die Groß- und Kleinquadrate bilden. Die Kammertiefe beträgt 20 µm.

Gegebenenfalls wurden die Proben mit 0,9%iger Kochsalz-Lösung auf eine geeignete Konzentration verdünnt, anschließend wurden die Zellen bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt.

Die Zellzahl pro mL Verdünnungslösung wurde durch Multiplikation der durchschnittlichen Zellzahl pro Großquadrat mit dem Umrechnungsfaktor $1,25 \cdot 10^6$ berechnet.

6.6.3 Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden in Parallelbestimmungen jeweils 2 x 2 mL einer Kultivierungsprobe in zuvor bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und 5 min mit 16.000 g abzentrifugiert (Fa. Eppendorf, Zentrifuge 5415 D). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Gefäße nochmals mit je 2 x 2 mL Kulturbrühe befüllt und zentrifugiert. Nach dem erneuten Verwerfen des Überstandes wurden die Reaktionsgefäße bei 100 °C für 24 h getrocknet und anschließend bis zur Gewichtskonstanz bei RT im Exsikkator gelagert und deren Masse bestimmt. Durch Differenzbildung der so ermittelten Massen ergab sich die Biotrockenmasse. Diese Prozedur sollte besonders bei geringen Zelldichten helfen, den Wägefehler zu minimieren.

6.6.4 Bestimmung der Biofeuchtmasse

Die Bestimmung der Biofeuchtmasse erfolgte gravimetrisch mittels Parallelbestimmungen durch zuvor bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Eppendorf Reaktionsgefäße, in denen jeweils 2 x 2 mL einer Kultivierungsprobe für 10 min mit 10.000 g bei 4 °C zentrifugiert wurden (Zentrifuge Sigma 3K20, Fa. B. Braun). Vor dem Auswägen wurde der Kulturüberstand mit Hilfe einer Pipette entfernt und die Biofeuchtmasse mit Hilfe der Differenzwägung ermittelt.

6.6.5 Bestimmung der Wachstumsrate μ

Generell wird für wachstumskinetische Studien eine wachsende Bakterienpopulation als ein sich autokatalytisch vermehrendes System angesehen [81]. Das Wachstum der Bakterien folgt daher einer Kinetik erster Ordnung; für das exponentielle Wachstum gilt:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

dabei ist μ die Wachstums(raten)konstante und X die Biomassekonzentration. Die Integration liefert:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t}$$

Die Wachstumsrate kann daher wie folgt bestimmt werden:

$$\mu = \frac{\ln(X) - \ln(X_0)}{\Delta t}$$

Die Ermittlung der Biomassekonzentration erfolgt in der Regel indirekt durch Messung der Optischen Dichte (vgl. 6.6.1).

6.6.6 Ermittlung des pH-Wertes

Für die Bestimmung des pH-Wertes wurden autoklavierbare pH-Elektroden (Fa. Mettler-Toledo) verwendet. Diese wurden vor dem Autoklavieren im Fermenter mit zwei kommerziell erhältlichen Pufferlösungen (pH 4,0 und pH 7,0, Fa. Mettler-Toledo) kalibriert. Aufbewahrt wurden die Elektroden in 3 M KCl-Lösung. Zur Regenerierung wurde gegebenenfalls eine Pepsin/HCl-Lösung (Fa. Mettler-Toledo) verwendet.

6.6.7 Bestimmung des Gelöstsauerstoffgehalts

Der Gelöstsauerstoffgehalt im Kultivierungsmedium (pO_2) wurde mit Hilfe einer autoklavierbaren Elektrode (Fa. Mettler-Toledo) als Sauerstoffpartialdruck nach dem Clark-Prinzip (Polarographisches Prinzip) ermittelt. Der Sauerstoff diffundiert hierbei aus der Lösung durch eine gasdurchlässige Teflonmembran, welche die Messlösung von der Ag-Anode und Pt-Kathode trennt, und wird an der Kathode reduziert. An der Anode wird dabei Silber oxidiert.

Die Justierung der Elektrode erfolgte über eine Zweipunktkalibration. Der Nullpunkt (0 % Gelöstsauerstoff) wurde nach dem Begasen mit Stickstoff kalibriert, die Sauerstoffsättigung (100 %-Wert) wurde durch Begasung mit Druckluft für die höchste benötigte Begasungsrate bzw. Rührerdrehzahl ermittelt und kalibriert.

6.6.8 Abgasanalytik (Kohlendioxid / Sauerstoff)

Die Fermenterabluft wurde mit dem System EGAS 1 (Exhaust Gas Analyser System, Fa. Hartmann & Braun) analysiert. Das System zur Messgasaufbereitung besteht aus einem Messgaskühler mit Kondensatauffanggefäß zum Trocknen des Messgases, der Messgasfördereinheit und den Analysegeräten zur Messung von Kohlendioxid sowie Sauerstoff.

Der Sauerstoff wird von diesem Gerät elektrochemisch über eine Elektrolysezelle bestimmt. Im Wesentlichen besteht der Sauerstoffsensor aus einer elektrochemischen Zelle mit Festelektrolyten aus Sauerstoff-Ionen leitender ZrO_2 -Keramik, auf deren Innen- und Außenseite poröse elektronenleitende Schichten als Elektroden aufgebracht sind. Beim Anlegen einer Gleichspannung wird in dem Festelektrolyten ein Gleichstrom erzeugt, welcher proportional zum Sauerstoffgehalt des Abgastromes ist.

Die Bestimmung des im Gasstrom enthaltenen Kohlenstoffdioxids erfolgte durch ein auf CO_2 sensibilisiertes IR-Photometer, welches die IR-Aktivität des Kohlenstoffdioxids bei charakteristischen Wellenlängen für dessen quantitative Bestimmung nutzt.

Die Kalibration des Abgasanalysensystems erfolgte mit einem Prüfgas (Fa. Linde) folgender Zusammensetzung: 19 % O_2 , 2,0 % CO_2 , Rest N_2 .

6.7 KOH-Test zur Ermittlung des Gram-Verhaltens

Dieser Test wurde zur Identifizierung Gram-negativer und Gram-positiver Bakterienstämme eingesetzt. Hierbei wurden mit Hilfe einer sterilen Impföse Zellen von einer Reinkultur-Agar-Platte in einem 3%igen KOH-Tropfen auf einem Objektträger suspendiert. Nach einer Wartezeit von 60 s wurde durch Anheben der Impföse das Auftreten eines Fadens untersucht.

Bei Gram-negativen Bakterien beobachtet man dabei im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien ein Auftreten von Fäden, welches aus der Freisetzung von DNA und der damit verbundenen Viskositätserrhöhung der Suspension durch die KOH-Behandlung resultiert.

Als Referenzorganismen wurden *Paracoccus seriniphilus* (Gram-negativ) und *Streptomyces* sp. (B8300) eingesetzt (Gram-positiv).

6.8 Korrelation der Optischen Dichte mit der Biofeucht- bzw. Biotrockenmasse für *P. seriniphilus*

Für eine Umrechnung der im Rahmen der L-Serindehydratase-Expressionsoptimierung erhaltenen Enzymaktivitäten bezogen auf die Biofeuchtmasse bzw. Biotrockenmasse von *Paracoccus seriniphilus* können die in Abb. 6.1 und Abb. 6.2 dargestellten Linearen Regressionen für die Korrelation der Optischen Dichte mit dem jeweiligen Parameter genutzt werden.

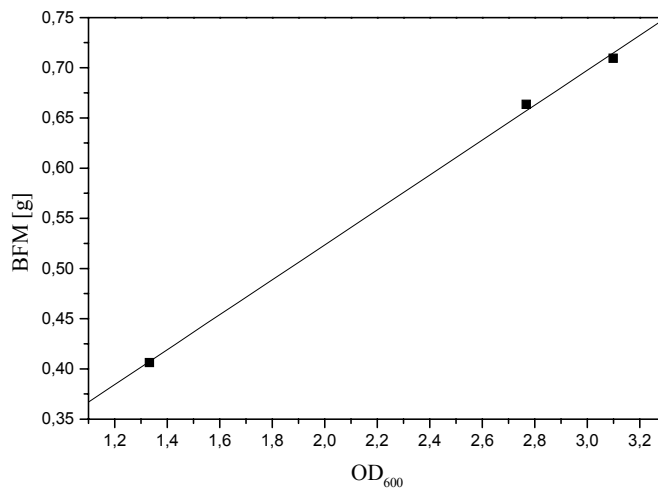


Abb. 6.1: Korrelation der Optischen Dichte mit der resultierenden Biofeuchtmasse von *Paracoccus seriniphilus*

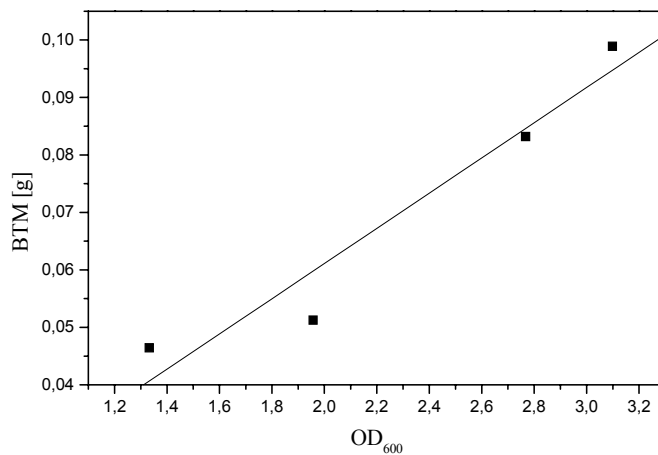


Abb. 6.2: Korrelation der Optischen Dichte mit der resultierenden Biotrockenmasse von *Paracoccus seriniphilus*

6.9 HPLC-Analytik der halogenierten Tryptophanderivate

Die Analytik der halogenierten Tryptophanderivate erfolgte nach Derivatisierung mit Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) und nachfolgender RP-Chromatographie. Bei der Derivatisierung reagiert die Aminosäure als primäres Amin bei RT und einem pH 9,5 mit Mercaptoethanol und OPA zu einem 2-alkylthio-2-alkylsubstituierten Isoindol. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors bei Ex./Em. 330 nm/420 nm.

Die Komponenten und Materialien sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Tab. 6.32: Verwendetes HPLC-System

Pumpe	Techlab LCP4100
Detektor	Fluoreszenzdetektor Shimadzu RF-10AxL
Autosampler	Triathlon, Spark Holland
Degasser	3-Kanal-Degasser, Sykam
Säulenofen	Techlab T-1
Datenaufnahme- und Steuerungssoftware	ANDROMEDA, DataApex Ltd.

Tab. 6.33: Herstellung Eluent A

- 13,6 g Natriumacetat Trihydrat
- 12 g Natriumdihydrogenphosphat
- in fast 2 L H₂O_{dest.} lösen; pH auf 7 einstellen
- auf 2 L auffüllen
- filtrieren
- 42 mL THF addieren
- 42 mL Methanol hinzufügen

Tab. 6.34: Zusammensetzung Eluent B

- 920 mL H₂O
- 1080 mL MeOH

Tab. 6.35: Herstellung OPA-Reagenz

- 270 mg ortho-Phthaldialdehyd in 5 mL Ethanol lösen
- 200 μ L Mercaptoethanol zufügen
- mit 0,4 M Boratpuffer (12,36 g Borsäure in 500 mL $H_2O_{\text{bidest.}}$) pH 9,5 auf 500 mL auffüllen
- Lösung 24 h altern lassen
- als Oxidationsschutz wöchentlich 20 μ L Mercaptoethanol hinzufügen

Tab. 6.36: Verwendete Laufbedingungen

Flussrate	1 mL/min
Temperatur	30 °C
Säule	Waters Resolve C18, 5 μ m, 3,9 x 150 mm
(linearer) Gradient	0-100 % Puffer B in 28 min

Die Derivatisierung erfolgte im Autosampler. Hierzu wurden 15 μ L Probe mit 50 μ L OPA-Reagenz gemischt und nach einer Inkubationszeit von 1,5 min automatisch auf die Säule aufgetragen.

Die Retentionszeit beträgt unter den gewählten Laufbedingungen 25,23 min für Tryptophan, 27,3 min für 5-Br-Tryptophan und 27,7 min für 5-Cl-Tryptophan.

6.10 Weitergehende Informationen zu den verwendeten Softwarepaketen

6.10.1 Parametereinstellungen für die Software MultiSimplex[®] Lite

In den Vorversuchen für die Anwendbarkeit der algorithmengestützten Optimierung mittels repetitiv geführter Batch-Betriebsart von Bioreaktoren kam das kommerziell verfügbare Softwarepaket MultiSimplex[®] Lite der Firma Grabitech Solutions AB zum Einsatz. Für dieses „proof of concept“ mit der Wachstumsratenoptimierung von *E. coli* 5K (pHM12) wurde eine Parametereinstellung, wie in Tab. 6.37 dargestellt, vorgenommen.

Tab. 6.37: Voreinstellung der variablen Parameter in der Software MultiSimplex[®] Lite

Parameter	Wert
„Step size“	2
„Decimals“	2
„Optimization objective“	maximization
Erwartungswert für μ	0-3 [h ⁻¹]

6.10.2 Programmcode für den in MATLAB[®] implementierten Simplex-Algorithmus

Das MATLAB[®]-Programm zur Optimierung mit Hilfe des Simplex-Algorithmus bestand insgesamt aus zwei Unterprogrammen. Zunächst wurden in einer ersten Datei die zu optimierenden Parameter festgelegt (Datei I). Anschließend wurden in einer zweiten Datei (Datei II) die Startbedingungen der Parameter für die Optimiersequenz definiert und die Datei in MATLAB[®] selbst ausgeführt. Da der Algorithmus hinsichtlich eines Minimums optimiert, wurden die Werte vor der Dateneingabe mit dem Faktor -1 multipliziert.

Datei I:

```
function E=ErrorKai(par)
```

```
global savehelp
```

```
pH=par(1)
```

```
T=par(2)
```

```
E = input('Ergebnis für die angegebene Parameterkombination: ');
```

```
savehelp=[savehelp; par E];
```

```
save paramAll.txt savehelp -ASCII;
```

Datei II:

```
global savehelp
```

```
P(1)=6.7; % z. B. Temperatur oder pH
```

```
P(2)=25; % z. B. Temperatur oder pH
```

```
savehelp = [P 0];

save paramAll.txt savehelp -ASCII;

[par, E] = fminsearch('ErrorKai2', P);

for i=1:size(par)
    par(i)
end
```

6.10.3 Programmcode für den in MATLAB[®] implementierten einfachen Genetischen Algorithmus

Der in dieser Arbeit verwendete einfache Genetische Algorithmus wurde in das Softwarepaket MATLAB[®] eingebunden und baut auf die Befehle der GA-Toolbox auf. Im Folgenden ist beispielhaft das Skript für die Optimierung der sechs Parameter aus Kap. 4.5.5 illustriert:

```
clear all
close all
%
%
NIND = input('Anzahl der Individuen einer Generation: ');
MAXGEN = input('Maximale Anzahl der Generationen, die durchlaufen werden soll: ');
NVAR = 6;
PRECI = input('Anzahl der Bits pro Variable: ');
GGAP = input('Größe der Generationslücke? [0-1]: ');
MUTR = input('Größe der Mutationsrate? [0-1]: ');
XoverWahr = input('Größe der Crossover-Wahrscheinlichkeit? [0-1]: ');
%
SEL_F = 'rws';
XOV_F = 'xovsp';
MUT_F = 'mut';
%
KatalaseI = input('Untere Katalase-Konzentration [U]: ');
```

```

Katalase2 = input('Obere Katalase-Konzentration [U]: ');
Katalase_Grenze = [Katalase1 Katalase2];
%
FLR1 = input('Untere FLR-Konzentration [mU]: ');
FLR2 = input('Obere FLR-Konzentration [mU]: ');
FLR_Grenze = [FLR1 FLR2];
%
NADH1 = input('Untere NADH-Konzentration [µM]: ');
NADH2 = input('Obere NADH-Konzentration [µM]: ');
NADH_Grenze = [NADH1 NADH2];
%
FAD1 = input('Untere FAD-Konzentration [µM]: ');
FAD2 = input('Obere FAD-Konzentration [µM]: ');
FAD_Grenze = [FAD1 FAD2];
%
Trp1 = input('Untere Trp-Konzentration [µM]: ');
Trp2 = input('Obere Trp-Konzentration [µM]: ');
Trp_Grenze = [Trp1 Trp2];
%
NaBr1 = input('Untere NaBr-Konzentration [mM]: ');
NaBr2 = input('Obere NaBr-Konzentration [mM]: ');
NaBr_Grenze = [NaBr1 NaBr2];
%
Grenzen = [Katalase_Grenze; FLR_Grenze; NADH_Grenze; FAD_Grenze;
Trp_Grenze; NaBr_Grenze]';
%
FieldD = [rep([PRECI], [1, NVAR]); Grenzen; rep([1;0;1;1], [1, NVAR])];
%
Chrom = crtbp(NIND, NVAR*PRECI);
%
Gen = 0 % Counter
%
Phen = bs2rv(Chrom, FieldD)
%
Messwertzaehler = 0;
%
```

```
dat = input('Eingabe der Messwerte, der einzelnen Versuche: ');
%
ObjVal = dat;
%
while Messwertzaehler < (NIND-1);
    %
    dat = input('Eingabe der Messwerte, der einzelnen Versuche: ');
    %
    ObjVal = [ObjVal; dat]; %
    %
    Messwertzaehler = Messwertzaehler + 1;
    %
end
%
ObjVal = -1.*ObjVal;
%
while Gen < MAXGEN
    %
    FitnV = ranking(ObjVal);
    %
    SelCh = select(SEL_F, Chrom, FitnV, GGAP);
    %
    SelCh = recomb(XOV_F, SelCh, XoverWahr);
    %
    SelCh = mut(SelCh, MUTR);
    %
    Phen2 = bs2rv(SelCh, FieldD);
    %
    Nachkommenzaehler = 0; % Nachkommencounter
    %
    datSel = input('Eingabe der Messwerte, der einzelnen Versuche: ');
    %
    ObjVsel = datSel; % Initialisiere den ObjVal-Vektor
    %
    while Nachkommenzaehler < ((NIND*GGAP)-1);
        %
```

```
datSel = input('Eingabe der Messwerte, der einzelnen Versuche: ');
%
ObjVsel = [ObjVsel; datSel]; % Daten an ObjVal anhängen
%
Nachkommenzaehler = Nachkommenzaehler + 1;
%
end
%
ObjVsel = -1.*ObjVsel;
%
[Chrom ObjVal] = reins(Chrom, SelCh, 1, 1, ObjVal, ObjVsel);
%
Gen = Gen + 1
end
```

Für andere Optimierungen wurde das Skript dementsprechend umgeschrieben.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Strukturformeln von Safracin B (aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>) und ET-743 (aus dem Manteltierchen <i>Ecteinascidia turbinata</i>).....	3
Abb. 3.1:	Mikrobieller Bewuchs von <i>Flustra foliacea</i> (Aufnahmen: Dr. Manfred Rohde, GBF, Braunschweig)	7
Abb. 3.2:	LuxI/LuxR QS-System Gram-negativer Bakterien. Das LuxI-homologe Protein ist die Autoinducer-Synthase, welche die Bildung der Acyl-HSL-Autoinducer katalysiert (schwarze Pentagone). Diese können frei durch die Zellmembran diffundieren und akkumulieren sich bei hohen Zelldichten. Ist die Konzentration des Autoinducers hoch genug, bindet das LuxR-homologe Protein das Signalmolekül und der entstandene LuxR-Autoinducer-Komplex bindet an die Promotoren der Zielgene und aktiviert die Transkription [51].	11
Abb. 3.3:	Grundgerüst der eingesetzten Homoserinlactone	13
Abb. 3.4:	Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Kultivierungstemperatur	17
Abb. 3.5:	Maximale Biomassekonzentration in Abhängigkeit von der Temperatur .	17
Abb. 3.6:	Wachstumsraten von <i>Halomonas marina</i> bei verschiedenen pH-Werten .	18
Abb. 3.7:	Wachstum von <i>Halomonas marina</i> auf unterschiedlich konzentrierten Marine Broth Kultivierungsmedien ohne Glucosezusatz	19
Abb. 3.8:	Wachstum von <i>Halomonas marina</i> auf unterschiedlich konzentrierten Marine Broth Kultivierungsmedien mit Glucosezusatz.....	20
Abb. 3.9:	Vergleich der Optischen Dichten von <i>Halomonas marina</i> nach 24 h Kultivierungszeit im MB20-Medium mit verschiedenen Mediumszusätzen bei 28 °C und 120 rpm; MB20+HSL (Zusatz von 1,6 mL der HSL-Stammlösung), Blindproben: MB20 sowie MB20+EE (Zusatz von 1,6 mL EE)	21
Abb. 3.10:	Hemmhofbildung der Testkeime gegen die erhaltenen Essigester-Extrakte nach einer Inkubationszeit von drei Tagen bei 28 °C (vgl. Kap. 6.4.1)	24
Abb. 3.11:	Komplettes Ablaufschema für die Isolierung und Kultivierung <i>Flustra</i> -assoziierter Bakterienstämme	26
Abb. 3.12:	Wachstumsverhalten der isolierten Gram-negativen Stämme F01-F04	28
Abb. 3.13:	Wachstumsverhalten der isolierten Gram-positiven Stämme F05-F07.....	29
Abb. 3.14:	Extraktmengen aus dem Überstand (EE-Extraktion) sowie des Pellets (DCM/Methanol-Extraktion).....	30
Abb. 3.15:	Hemmhofbildung der Testkeime gegen die EE-Extrakte der isolierten Bakterien F01–F04	32

Abb. 3.16:	Hemmhofbildung von <i>B. subtilis</i> gegen die Extrakte der Zellpellets der Gram-negativen Mikroorganismen; gegen die Testkeime <i>E. coli</i> , <i>Paracoccus seriniphilus</i> und <i>Streptomyces</i> sp. (B8300) konnte kein Effekt nachgewiesen werden	33
Abb. 3.17:	Ablaufschema für die Untersuchung des Einflusses eines HSL-Mediumszusatzes auf die Gesamtkeimzahl einer Mischkultur in einem Anreicherungsmedium.....	34
Abb. 3.18:	Effekt eines HSL-Mediumzusatzes auf die Gesamtzellzahl <i>Flustra foliacea</i> -assoziiertes Bakterien nach einer Kultivierungszeit von 24 h bzw. 48 h im MB20-Medium	35
Abb. 4.1:	Sukzessive Variation bei nicht-abhängigen Parametern (A) sowie korrelierenden Parametern (B); die one-factor-at-a-time-Strategie ist nur bei nichtkorrelierenden Parametern sinnvoll einsetzbar.....	39
Abb. 4.2:	Optimiersequenz des Simplex-Algorithmus am Beispiel einer zwei-parametrischen Optimierung; (b) bester Versuchspunkt, (n) zweitbestes Versuchspunkt, (s) schlechtestes Versuchspunkt des Startsimplexes; (p) Schwerpunkt der geometrischen Figur ohne den schlechtesten Wert, (r) neuer Versuchspunkt [91].....	42
Abb. 4.3:	Mögliche Schrittweitenvariation des Simplex-Algorithmus mit variabler Schrittweite [91]	43
Abb. 4.4:	Beispiel für eine fehlerhafte Optimierung unter Anwendung des Simplex-Algorithmus; dargestellt ist wegen der übersichtlicheren Darstellung nur der Simplex mit konstanter Schrittweite, wobei der Startsimplex rot dargestellt ist; gefunden würde unter den vorgegebenen Startbedingungen lediglich ein lokales Optimum.....	44
Abb. 4.5:	Analogie des Phänotyps und Genotyps von Molekulargenetik vs. GA ..	46
Abb. 4.6:	Darstellung eines „Chromosoms“ durch Transformation eines dekadischen Parametersatzes in den Binärcode	47
Abb. 4.7:	Fließschema für Genetische Algorithmen	50
Abb. 4.8:	Grafische Darstellung der Anzahl der Suchergebnisse >> „simplex algorithm“ AND optimization << (Stand 12/2006); Mehrfachnennungen sind möglich	54
Abb. 4.9:	Dehydratisierung von L-Serin durch den Fe-S-Cluster	56
Abb. 4.10:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>P. seriniphilus</i> nach Kultivierung in Marine Broth Medium [30].....	57
Abb. 4.11:	Ermittlung des optimalen Erntezeitpunkts zur Gewinnung der L-Serindehydratase (Kultivierung erfolgte in MB50 mit einem Zusatz von 1 g/L L-Serin) [30]	57
Abb. 4.12:	Darstellung der angewandten Gütefunktion (Produkt aus Biomasse und Enzymaktivität)	60

Abb. 4.13:	Darstellung der alternativen Gütefunktion (OD + Enzymaktivität).....	61
Abb. 4.14:	Zielfunktion der Generationsbesten im Vergleich zu den Mittelwerten der Generationen und zum Referenzwert (Ref.)	64
Abb. 4.15:	Konzentrationsverlauf der Mediumsbestandteile der Generationsbesten	66
Abb. 4.16:	Vergleich der Messwerte von Optischer Dichte, der Enzymaktivität und der aus diesen Werten gebildeten Zielfunktion.....	68
Abb. 4.17:	Sequenz der dem GA nachgeschalteten Simplex-Optimierung für fünf durchgeführte Versuche	69
Abb. 4.18:	Fermentationskolben mit angekoppelten CO ₂ - und O ₂ -Sensoren der Firma BlueSens [84]	72
Abb. 4.19:	Vergleich von Schüttelkolben und Bioreaktor	73
Abb. 4.20:	Mögliche dis- und semikontinuierliche Betriebsarten von Bioreaktoren; dabei ist S die Substratkonzentration, X die Biomassekonzentration und P die Produktkonzentration	74
Abb. 4.21:	Zellzahl des nichtmutierten Organismus im Verlauf einer Fermentation sowie Gesamtanteil mutierter Zellen im Verlauf einer Kultivierung unter der Annahme, dass I) die entstehenden Mutationen keine Reproduzierbarkeit besitzen, II) sich 1 % der bei der ersten Replikation entstandenen Mutationen exponentiell mit 1,1-facher Wachstumsrate wie die Ursprungskultur fortpflanzt; alle weiteren entstehenden Mutationen sind stoffwechsellinaktiv, III) sich alle entstehenden Mutationen exponentiell mit 1,1-facher Geschwindigkeit wie die Ursprungskultur fortpflanzen	78
Abb. 4.22:	Verlauf des Mutationsanteils bei repetitiver Batch-Fahrweise, wenn jede bei der Zellteilung entstehende Mutation mit 1,1-facher Geschwindigkeit wie der Ursprungsorganismus wächst; im Rahmen eines repetitiven Zyklusses werden dabei 20 Generationszyklen des Organismus durchlaufen.....	79
Abb. 4.23:	Verlauf des Mutationsanteils bei repetitiver Batch-Fahrweise, wenn I) keine Mutation zur Reproduktion befähigt ist bzw. II) ein Anteil von 1 % der beim ersten Replikationsschritt entstandenen Mutanten mit 1,1-facher wie der Ursprungsorganismus wachsen	79
Abb. 4.24:	Fermentersystem Biostat [®] Q zur parallelen Kultivierung in vier Bioreaktoren.....	81
Abb. 4.25:	Simplex-Sequenz für die Optimierung der Wachstumsrate von <i>E. coli</i> unter Anwendung der kommerziell erhältlichen Software MultiSimplex [®] Lite (im Rahmen der Übersichtlichkeit wurden an dieser Stelle die Fehlerbalken nicht in das Diagramm eingebunden).....	84

Abb. 4.26:	Überblick der Messwerte des Startsimplex, die im Verlauf eines Batch-Prozesses ermittelt wurden	85
Abb. 4.27:	Verlauf der Zielfunktion μ_{\max} für das repetitive Batch-Verfahren am Beispiel <i>Halomonas marina</i> ; Ausgangsbedingung für den Simplex-Algorithmus: pH = 6 / T = 22 °C	88
Abb. 4.28:	Verlauf der Zielfunktion μ_{\max} für das repetitive Batch-Verfahren am Beispiel <i>Halomonas marina</i> ; Ausgangsbedingung für den Simplex-Algorithmus: pH = 6,7 / T = 25 °C; ab dem vierten Schritt wurde die Optimierung mit neuer Vorkultur und frisch präpariertem Equipment weiterverfolgt.....	89
Abb. 4.29:	Beispielhafter Verlauf der Optischen Dichte während der repetitiven Batch-Zyklen der Fermentation von <i>Halomonas marina</i> sowie der hierbei gemessenen Gelöstsauerstoffkonzentration (pO ₂) im Reaktor bei den verwendeten Parametereinstellungen	90
Abb. 4.30:	Verlauf der Zielfunktion (μ_{\max}) für den Generationsbesten sowie des Mittelwerts der Generation für die Optimiersequenz	92
Abb. 4.31:	Simplex-Sequenz der weiteren Optimierung der Wachstumsrate	95
Abb. 4.32:	Strukturformeln zweier natürlich vorkommender Halometabolite mit antimikrobieller Wirksamkeit.....	98
Abb. 4.33:	Halogenierungsreaktion von Häm- bzw. Vanadium-enthaltenden Haloperoxidasen (I) und Perhydrolasen (II).....	99
Abb. 4.34:	Übertragung einer Methylgruppe auf ein Halogenidion durch eine S-Adenosylmethionintransferase	99
Abb. 4.35:	Erster Reaktionsschritt bei der Bildung halogener Metabolite in <i>S. cattleya</i> [147].....	100
Abb. 4.36:	Biosynthese des Pyrrolnitrins	101
Abb. 4.37:	Hypothetische Reaktionsmechanismen Flavin-abhängiger Halogenasen; a) nukleophiler Mechanismus nach Keller et al. [161], b) elektrophiler Mechanismus nach Yeh et al. [168], c) vorgeschlagener Mechanismus nach Dong et al. [166], basierend auf der Kristallstruktur von PrnA und biochemischen Daten des Enzyms; das umrandete Hypochlorit beschreibt ein an die Halogenase gebundenes HOCl-Molekül.....	104
Abb. 4.38:	Mögliche Reaktionssequenz zur Produktion von 5-Hydroxytryptophan [34].....	106
Abb. 4.39:	Elutionsprofil der Gelfiltration des FLR-Rohextrakts über einen Zeitraum von 8 h bei einer Flussrate von 0,12 mL/min, aufgetragen wurden 100 mL Gesamtprotein; die Flavinreduktase eluierte dabei über vier Fraktionen [179]	108

- Abb. 4.40: DCPIP-Test der Fraktionen aus der Gelfiltration auf einer 96er-Well-Platte; die Fraktionen 47–50 indizieren durch die Entfärbung der Lösung das Vorhandensein von Reduktasen [179]..... 108
- Abb. 4.41: SDS-PAGE-Gel der aktiven Fraktionen 47–50 der Gelfiltration; aufgetragen wurden 20 µL pro Bahn (zur Durchführung vgl. Kap. 6.5.3) [179]..... 109
- Abb. 4.42: Restriktionskarte des Expressionsvektors pSZexM2; Vektor zur Expression der Trp-5-Hal (PyrH) in *Pseudomonas fluorescens* 111
- Abb. 4.43: Teilstruktur von Sepharose™ 114
- Abb. 4.44: Teilstruktur des verwendeten, vorgepackten Sepharose-Säulenmaterials, an das Iminodiacetatgruppen kovalent gebunden sind [182]..... 114
- Abb. 4.45: FPLC-Chromatogramm der Aufreinigung der Trp-5-Halogenase zur Homogenität unter Verwendung einer HisTrap™ HP Säule (Säulenvolumen 1 mL); Elutionsbedingungen: Flussrate 4 mL/min; aufgetragene Proteinmenge 28 mg (Rohextrakt). Puffer A: 20 mM Natriumphosphat, 0,5 NaCl, 5 mM Imidazol, pH 7,4; Puffer B: 20 mM Natriumphosphat, 0,5 NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4 [179]..... 115
- Abb. 4.46: SDS-PAGE-Gel nach Coomassiefärbung; aufgetragen wurden Proteinfractionen der Aufreinigung der Halogenase bis zur Homogenität; Bahn 1–3: Auftragung von je 20 µL aus dem Begleitproteinpool; Bahn 4–5: Auftragung von je 20 µL aus dem Halogenasepool (zur Durchführung vgl. Kap. 6.5.3) [179]..... 116
- Abb. 4.47: Elutionsprofil bei der Aufreinigung der Trp-5-Halogenase mit einer 5-mL-HisTrap™-Säule (Fa. GE Healthcare), Elutionsbedingungen: Flussrate 4 mL/min; aufgetragene Proteinmenge 1,4 g (Rohextrakt); Puffer A: 20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 5 mM Imidazol, pH 7,4; Puffer B: 20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4 [179]..... 117
- Abb. 4.48: Anteil der halogenierten Trp-Derivate im Enzymtest bei Verwendung von NaCl bzw. NaBr als Halogenidquelle sowie eines jeweiligen Anteils von 50 % der Stammlösungen in der Vorlage (eingesetzte Konzentration je 3 M); die Summe beider halogenierter Derivate bildet den 100%-Wert 119
- Abb. 4.49: Verlauf der Halogenase-Aktivität im pH-Intervall von pH 2–12 121
- Abb. 4.50: Verlauf der pH-Wert-Abhängigkeit der Enzymaktivität im Intervall pH 6–8..... 121
- Abb. 4.51: Darstellung der relativen spezifischen Aktivität der Trp-5-Hal bei Variation der Temperatur im Intervall von 20–30 °C; als Referenz diente der bei 24 °C (und 28 °C) erhaltene Wert..... 122

Abb. 4.52:	Abhängigkeit der Halogenaseaktivität von der Lagerungstemperatur bei 0 °C, 18 °C und 30 °C	124
Abb. 4.53:	Wasserstoffperoxid-Toleranzkurve der Trp-5-Halogenase [179]	126
Abb. 4.54:	Nettoladung eines Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung	127
Abb. 4.55:	Silbernitrat gefärbtes Polyacrylamidgel nach der Auftrennung in der zweiten Dimension; gelb dargestellt sind die Markerproteine [179]	130
Abb. 4.56:	Verlauf der Optischen Dichte und der relativen Halogenase-Aktivität im Rohextrakt nach Ultraschallaufschluss und Verwendung des Standard-Enzymtests; als Referenz diente der nach Standard-Bedingungen bei 30 °C für 72 h inkubierte Fermentationskolben (1,5 L in 5 L-Erlenmeyerkolben)	132
Abb. 4.57:	Verlauf der Zellkonzentration von <i>P. fluorescens</i> , der zum jeweiligen Zeitpunkt ermittelten Aktivität der Halogenase im RE nach Ultraschallaufschluss sowie des pH- und des pO ₂ -Werts bzw. der Konzentrationen von Sauerstoff und Kohlendioxid im Abgas während der Bioreaktorkultivierung	134
Abb. 4.58:	Expressionsverhalten bzw. Aktivität der zu verschiedenen Zeiten isolierten Trp-5-Halogenase im Rohextrakt nach Ultraschallaufschluss von Schüttelkultur vs. Kultivierung im Bioreaktor, dargestellt durch die relativen Aktivitäten des Enzyms; als Referenzwert diente der ermittelte Wert der Halogenaseaktivität im Schüttelkolben nach 72 h.....	136
Abb. 4.59:	Ablaufschema der Optimierung der Enzymtestzusammensetzung	138
Abb. 4.60:	Werte der Zielfunktion für den Durchschnittswert der Generationen sowie des Generationsbesten	138
Abb. 4.61:	Werte der im Enzymtest erzielten Konzentration an 5-Br-Trp	139
Abb. 4.62:	Variationsbereiche der im Enzymtest zu optimierenden Komponenten im Vergleich mit der besten Einstellung der Parameter innerhalb der fünften Generation	141
Abb. 4.63:	Kalibriergerade für die Korrelation der Katalaseaktivität mit der scheinbar detektierten 5-Br-Trp-Konzentration; die Geradengleichung lautet: $y = 0,0348 x + 4,814$ ($R^2 = 0,9984$)	142
Abb. 4.64:	Verlauf der bei 340 nm detektierten Exktinktion des Enzymtests [179].....	143
Abb. 4.65:	Reaktionsgeschwindigkeit der Trp-5-Halogenase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration [179]	146
Abb. 4.66:	Lineweaver-Burk-Plot zur Ermittlung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und der Michaelis-Konstante [179].....	147
Abb. 4.67:	Zeit-Umsatz-Verhalten der Trp-5-Halogenase im Standard-Enzymtest	148

Abb. 4.68:	Zeit-Umsatz-Verhalten der Halogenase im optimierten Enzymtest bei 24 °C, $c(\text{Trp}) = 400 \mu\text{M}$, Katalasezusatz 1,5 mU, pH 6,2.....	149
Abb. 4.69:	Darstellung der erhaltenen Ausbeuten an 5-Br-Tryptophan im Pulsexperiment für verschiedene Totalkonzentrationen im Test; die jeweiligen Inkubationszeiten und Zeiten der Substratzugabe sind Tab. 4.21 zu entnehmen	152
Abb. 6.1:	Korrelation der Optischen Dichte mit der resultierenden Biofeuchtmasse von <i>Paracoccus seriniphilus</i>	183
Abb. 6.2:	Korrelation der Optischen Dichte mit der resultierenden Biotrockenmasse von <i>Paracoccus seriniphilus</i>	183

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1:	Übersicht zum diffusiven Stofftransport verschiedener Moleküle in Biofilmen, repräsentiert durch das Diffusionskoeffizientenverhältnis ($D_{\text{Biofilm}}/D_{\text{Wasser}}$) [33].....	9
Tab. 3.2:	Sequenzhomologien der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der PCR-generierten potentiellen pks-Genfragmente des untersuchten Stammes A011 im Vergleich zu publizierten Gensequenzen [75]	14
Tab. 3.3:	Erhaltene Extraktmengen aus dem Fermentationsüberstand (EE-Extrakt) sowie der Zellmasse (DCM-, MeOH-Extrakt).....	22
Tab. 3.4:	Erhaltene Extraktmengen in Relation zur Biomasse; als Referenz wurden die Extraktmengen der Kultivierung mit MB20+HSL verwendet.....	23
Tab. 3.5:	Gram-Verhalten der isolierten Bakterien F01-F07	27
Tab. 4.1:	Vergleich von Binär- und Gray-Code	48
Tab. 4.2:	Illustration der "Roulette-Rad-Methode"	49
Tab. 4.3:	Beispiele verschiedener Anwendungen von Genetischen Algorithmen in bioverfahrenstechnischen Prozessen.....	53
Tab. 4.4:	Konzentrationsbereiche der Parameter zur Optimierung der L-Serindehydrataseproduktion.....	62
Tab. 4.5:	Verwendete GA-Parametereinstellungen bei der Mediumsoptimierung zur L-Serindehydratase-Optimierung.....	63
Tab. 4.6:	Mediumszusammensetzungen und resultierende Werte der einzelnen Funktionen der Startgeneration vs. „Endgeneration“ (Abbruch erfolgte nach der Durchführung der Experimente zur 7. Generation).....	65
Tab. 4.7:	Vorgenommene Parameter-Einstellungen innerhalb des GA-Programms (MATLAB [®])	92
Tab. 4.8:	Parametereinstellungen und die jeweils erzielte maximale Wachstumsrate der Start- und Endgeneration.....	93
Tab. 4.9:	Resultierende Ausbeuten für die einzelnen Aufreinigungsschritte; die Angaben beziehen sich jeweils auf einen L Kultivierungsmedium	110
Tab. 4.10:	Vergleich der eingesetzten Aufschlussverfahren und der resultierenden Proteingehalte im Rohextrakt [179]	113
Tab. 4.11:	Zusammensetzung des Standard-Enzymtests [183].....	118
Tab. 4.12:	Ermittelte Parameter für die Deaktivierung der Tryptophan-5-Halogenase im Rohextrakt nach Ultraschallaufschluss	125
Tab. 4.13:	Ermittelte Arrhenius-Parameter der Trp-5-Halogenase aus <i>P. fluorescens</i>	125

Tab. 4.14:	Programm des Power Supply EPS 3501 für die Multiphor II (Fa. GE Healthcare).....	129
Tab. 4.15:	Programm des Netzteils bei der Durchführung der SDS-PAGE	129
Tab. 4.16:	Verwendete pI-Markerproteine in der 2-D-SDS-PAGE.....	130
Tab. 4.17:	Parametereinstellungen für den eingesetzten einfachen GA und Wertebereiche der im Test zu optimierenden Konzentrationen der Komponenten.....	137
Tab. 4.18:	Vergleich der Zusammensetzungen der ersten Generation („Startgeneration“) mit der fünften Generation („Endgeneration“).....	140
Tab. 4.19:	Mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Plots ermittelte kinetische Daten der Trp-5-Halogenase unter Verwendung des in Tab. 4.11 angegebenen Standard-Enzymtests	147
Tab. 4.20:	Gegenüberstellung der Zeit-Umsatz-Werte der eingesetzten Enzymtest-Varianten.....	150
Tab. 4.21:	Zusammensetzung der variablen Parameter im Enzymtest sowie Zeitangabe der Zupulsung	151
Tab. 4.22:	Zusammensetzung des Enzymtests für die Umsetzung des Tryptophans durch lebende, frisch kultivierte Zellen	154
Tab. 4.23:	Resultierende Produktkonzentration der Ganzzelltransformation bei Verwendung frisch kultivierter Zellen.....	155
Tab. 6.1:	Zusammensetzung des Basismediums Marine Broth 2216	163
Tab. 6.2:	Zusammensetzung der Kultivierungsmedien MB20, MB25, MB50.....	164
Tab. 6.3:	Zusammensetzung von Artificial Sea Water	164
Tab. 6.4:	Zusammensetzung Seawater Basal Medium (SwBasal).....	165
Tab. 6.5:	Zusammensetzung des Synthetic Seawater Mediums (SSM).....	165
Tab. 6.6:	Zusammensetzung YMA-Medium	166
Tab. 6.7:	Zusammensetzung des Pepton-Hefeextrakt-Mediums	166
Tab. 6.8:	Zusammensetzung des HNB-Mediums	167
Tab. 6.9:	Zusammensetzung des LB-Mediums.....	167
Tab. 6.10:	Zusammensetzung der Salinelösung.....	168
Tab. 6.11:	Zusammensetzung der eingesetzten KPP-Puffer.....	168
Tab. 6.12:	Zusammensetzung der HSL-Stammlösung	168
Tab. 6.13:	Zusammensetzung des Tris-EDTA-Puffers.....	169
Tab. 6.14:	Verwendete Testkeime im Plattendiffusionstest.....	170
Tab. 6.15:	Ablaufschema zur Bestimmung der L-Serindehydratase-Aktivität in Rohextrakten	171
Tab. 6.16:	Uvikon 940-Geräteeinstellungen für Flavinderduktase-Aktivitätsmessungen	172

Tab. 6.17:	Enzymtestzusammensetzung zur Bestimmung der Flavinreduktase-Aktivität.....	172
Tab. 6.18:	Zusammensetzung der Stammlösung des DCPIP-Tests	173
Tab. 6.19:	Zusammensetzung der SDS-PAGE-Puffer	176
Tab. 6.20:	Zusammensetzung der Coomassie-Lösung und des -Entfärbers.....	176
Tab. 6.21:	Rehydrierungspuffer für IPG-Streifen	177
Tab. 6.22:	SDS-Equilibrierungspuffer.....	177
Tab. 6.23:	Fixing Solution.....	177
Tab. 6.24:	Senzitizing Solution	177
Tab. 6.25:	Silver Solution.....	178
Tab. 6.26:	Developing Solution.....	178
Tab. 6.27:	Stop Solution	178
Tab. 6.28:	Preserving Solution	178
Tab. 6.29:	Methanol-Lösung (5 %, w/v)	178
Tab. 6.30:	Protokoll zur Silbernitratfärbung des 2-D-Gels	179
Tab. 6.31:	Verwendete Geräte und Materialien der Firma Amersham Biosciences .	179
Tab. 6.32:	Verwendetes HPLC-System.....	184
Tab. 6.33:	Herstellung Eluent A	184
Tab. 6.34:	Zusammensetzung Eluent B.....	184
Tab. 6.35:	Herstellung OPA-Reagenz	185
Tab. 6.36:	Verwendete Laufbedingungen	185
Tab. 6.37:	Voreinstellung der variablen Parameter in der Software MultiSimplex [®] Lite	186

9 Literaturverzeichnis

- [1] N. A. Campbell (Herausgeber J. Markl); Biologie; Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg (1997)
- [2] M. Watve, R. Tickoo, M. Jog, B. Bhole; How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?; Arch. Microbiol. 176 (2001) 386–390
- [3] W. Fenical; Chemical Studies of Marine Bacteria: Developing a new Resource; Chem. Rev. 93 (1993) 1673–1683
- [4] D. J. Faulkner; Marine Natural Products; Nat. Prod. Repts 18 (2001) 1–49
- [5] S. A. Pomponi; The bioprocess – technological potential of the sea; J. Biotechnol. 70 (1999) 5–13
- [6] P. Proksch, R. A. Edrada, W. H. Lin; Implications of marine biotechnology on drug discovery; in P. Proksch, W. E. G. Müller (Ed.), Frontiers in Marine Biotechnology, Horizon, Norfolk (2006) 1–20
- [7] R. K. Osenbach, S. Harvey; Neuraxial infusion in patients with chronic intractable cancer and noncancer pain; Curr. Pain Headache Rep. 5 (2001) 241–249
- [8] I. Wagner-Döbler, W. Beil, S. Lang, M. Meiners, H. Laatsch; Integrated Approach To Explore the Potential of Marine Microorganisms for the Production of Bioactive Metabolites; in: T. Scheper (Ed.), Advances in Biochemical engineering biotechnology, Vol. 74 Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (2002) 207–238
- [9] P. Proksch, R. Edrada-Ebel, R. Ebel; Apotheke am Meeresgrund; Biol. Unserer Zeit 36 (2006) 150–159
- [10] F. H. Blackhall, M. Ranson, J. A. Radford, B. W. Hancock, M. Soukop, A. T. McGown, A. Robbins, G. Halbert, G. C. Jayson; A phase II trial of bryostatin 1 in patients with non-hodgkin’s lymphoma; Br. J. Cancer 84 (2001) 465–469
- [11] M. L. Varterasian, P. A. Pemberton, K. Hulburd, D. H. Rodriguez, A. Murgo, A. M. Al-Katib; Phase II study of bryostatin 1 in patients with relapsed multiple myeloma; Invest. New Drugs 19 (2001) 245–247
- [12] S. Delalogue, A. Yovine, A. Taamma, M. Riofrio, E. Brain, E. Raymond, P. Cottu, F. Goldwasser, J. Jimeno, J. L. Misset, M. Marty, E. Cvitkovic; Ecteinascidin-743: a marine-derived compound in advanced, pretreated sarcoma-patients-preliminary evidence of activity; J. Clin. Oncol. 19 (2001) 1248–1255
- [13] D. J. Faulkner; Marine Pharmacology; Antonie van Leeuwenhoek 77 (2000) 135–145

- [14] D. Mendola; Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites-. Process developments and economics; *Biomol. Eng.* 20 (2003) 441–458
- [15] D. Mendola; Aquacultural production of bryostatin 1 and ecteinascidin 743; in: N. Fusetani (Ed.), *Drugs from the sea*, Karger, Basel (2000) 120–133
- [16] P. A. Wender, J. de Brabander, P. G. Harran, J.–M. Jiminez, M. F. T. Koehler, B. Lippa, C.–M. Park, M. Shiozaki; Synthesis of the first member of a new class of biologically active bryostatin analogues; *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 4534–4535
- [17] J. Vacelet, C. Donadey; Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria; *J. Exp. Mar. Ecol.* 30 (1977) 301–314
- [18] R. Pukall, I. Kramer, M. Rohde, E. Stackebrandt; Microbial diversity of cultivatable bacteria associated with the North Sea bryozoan *Flustra foliacea*; *System. Appl. Microbiol.* 24 (2001) 623–633
- [19] A. B. Friedrich, H. Merkert, T. Fendert, J. Hacker, P. Proksch, U. Hentschel; Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH); *Mar. Biol.* 134 (1999) 461–470
- [20] Y. Ikeda, H. Matsuki, T. Ogawa, T. Munakata; Safracins, new antitumor antibiotics. II. Physicochemical properties and chemical structures; *J. Antibiot* 36 (1983) 1284–1289
- [21] M. G. Haygood, S. K. Davidson; Small-subunit rRNA genes and in situ hybridization with oligonucleotides specific for the bacterial symbionts in the larvae of the bryozoan *Bugula neritina* and proposal of “*Candidatus* Endobugula sertula”; *Appl. Env. Microbiol.* 63 (1997) 4612–4616
- [22] M. G. Haygood, E. W. Schmidt, S. K. Davidson, D. J. Faulkner; Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology; *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1 (1999) 33–43
- [23] R. I. Amman, W. Ludwig, K. H. Schleifer; Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation; *Microbiol. Rev.* 59 (1995) 143–169
- [24] E. F. Delong; Marine microbial diversity: The tip of the iceberg; *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 203–207
- [25] J. G. Burgess, E. M. Jordan, M. Bregu, A. Mearns-Spragg, K. G. Boyd; Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research; *J. Biotechnol.* 70 (1999) 27–32

- [26] L. Yan, K. G. Boyd, D. R. Adams, J. G. Burgess; Biofilm-Specific Cross-Species Induction of Antimicrobial Compounds in Bacilli; *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 3719–3727
- [27] T. Heidorn; Bioprozessoptimierung und Scale-up der Tropodithiolsäure-Produktion durch das marine Bakterium *Ruegeria* sp. Stamm T5; Dissertation, Hannover 2002
- [28] P. Proksch, R. A. Edrada, R. Ebel; Drugs from the seas – current status and microbiological implications; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (2002) 125–134
- [29] U. Holzgrabe, A. Bechthold; Paradigmenwechsel in der Entwicklung antiinfektiver Chemotherapeutika; *Chemotherapie Journal* 8 (1999) 69–78
- [30] M. Laroche; Enzymscreening an marinen Mikroorganismen; Dissertation, Hannover 2003
- [31] S. L. Neidleman, J. Geigert; Biohalogenation: Principles, Basic Roles and Applications; Ellis Horwood Ltd. Chichester (1986)
- [32] B. Austin; *Marine Microbiology*; New York Cambridge Uni. Press (1988)
- [33] H. -C. Flemming, J. Wingender; Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien; *Biol. Unserer Zeit* 3 (2001) 169–180
- [34] R. Ulber; Biotechnologische Methoden zur effizienten Rohstoffnutzung; Habilitationsschrift, Universität Hannover 2002
- [35] D. K. Button, F. Schut, P. Quang, R. Martin, B. R. Robertson; Viability and Isolation of Marine Bacteria by Dilution Culture: Theory, Procedures, and Initial Results; *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 881–891
- [36] M. A. Hood, M. T. MacDonell; Distribution of ultramicrobacteria in a Gulf Coast estuary and induction of ultramicrobacteria; *Microb. Ecol.* 14 (1987) 113–127
- [37] M. T. MacDonnell, M. A. Hood; Isolation and characterization of ultramicrobacteria from a Gulf Coast estuary; *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (1982) 566–571
- [38] P. Martin, R. A. MacLeod; Observations on the distinction between oligotrophic and eutrophic marine bacteria; *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984) 1017–1022
- [39] M. Gledhill, C. M. G. van der Berg; Determination of complexation of iron (III) with natural organic complexing ligands in seawater using cathodic stripping voltammetry; *Mar. Chem.* 47 (1994) 41–54
- [40] P. D. Tortell, M. T. Maldonado, N. M. Price; The role of heterotrophic bacteria in iron-limited ocean ecosystems; *Nature* 383 (1996) 330–332
- [41] P. D. Tortell, M. T. Maldonado, J. Granger, N. M. Price; Marine bacteria and biogeochemical cycling of iron in the oceans; *FEMS Microbiol. Ecol.* 29 (1999) 1–11

- [42] J. B. Neilands; Siderophores: Structure and function of microbial iron transport-compounds; *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 26723–26726.
- [43] P. W. Boyd, C. S. Law, C. S. Wong, Y. Nojiri, A. Tsuda, M. Levasseur, S. Takeda, R. Rivkin, P. J. Harrison, R. Strzepek, J. Gower, M. McKay, E. Abraham, M. Arychuk, J. Barwell-Clarke, W. Crawford, D. Crawford, M. Hale, K. Harada, K. Johnson, H. Kiyosawa, I. Kudo, A. Marchetti, W. Miller, J. Needoba, J. Nishioka, H. Ogawa, J. Page, M. Robert, H. Saito, A. Sastri, N. Sherry, T. Soutar, N. Sutherland, Y. Taira, F. Whitney, S. K. Wong, T. Yoshimura; The decline and fate of an iron-induced subarctic phytoplankton bloom; *Nature* 428 (2004) 549–553
- [44] K. H. Coale, K. S. Johnson, F. P. Chavez, K. O. Buesseler, R. T. Barber, M. A. Brzezinski, W. P. Cochlan, F. J. Millero, P. G. Falkowski, J. E. Bauer, R. H. Wanninkhof, R. M. Kudela, M. A. Altabet, B. E. Hales, T. Takahashi, M. R. Landry, R. R. Bidigare, X. Wang, Z. Chase, P. G. Stratton, G. E. Friederich, M. Y. Gorbunov, V. P. Lance, A. K. Hilting, M. R. Hiscock, M. Demarest, W. T. Hiscock, K. F. Sullivan, S. J. Tanner, R. M. Gordon, C. N. Hunter, V. A. Elrod, S. E. Fitzwater, J. L. Jones, S. Tozzi, M. Koblizek, A. E. Roberts, J. Herndon, J. Brewster, N. Ladizinsky, G. Smith, D. Cooper, D. Timothy, S. L. Brown, K. E. Selph, C. C. Sheridan, B. S. Twining, Z. I. Johnson; Southern Ocean Iron Enrichment Experiment: Carbon Cycling in High- and Low-Si Waters; *Sci.* 304 (2004) 408–414
- [45] K. O. Buesseler, J. E. Andrews, S. M. Pike, M. A. Charette; The Effects of Iron Fertilization on Carbon Sequestration in the Southern Ocean; *Sci.* 304 (2004) 414–417
- [46] C. E. ZoBell; Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic species; *J. Mar. Res.* 4 (1941) 42–75
- [47] J. D. Buck; Effects of medium composition on the recovery of bacteria from sea water; *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* 15 (1974) 25–34
- [48] C. H. Oppenheimer, C. E. ZoBell; The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure; *J. mar. Res.* 11 (1952) 10–18
- [49] A. M. Stock, V. L. Robinson, P. N. Goudreau; Two-component signal transduction; *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 183–215
- [50] W. C. Fuqua, S. C. Winans, E. P. Greenberg; Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators; *J. Bacteriol.* 176 (1994) 296–275
- [51] S. Schauder, B. L. Bassler; The languages of bacteria; *Genes & Development* 15 (2001) 1468–1480

- [52] J. W. Hastings, K. H. Nealson; Bacterial bioluminescence; *Annu. Rev. Microbiol.* 31 (1977) 549–595
- [53] K. H. Nealson, J. W. Hastings; Bacterial bioluminescence: Its control and ecological significance; *Microbiol. Rev.* 43 (1979) 496–518
- [54] E. G. Ruby; Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: The *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis; *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996) 591–624
- [55] K. L. Visick, M. J. McFall-Ngai; An exclusive contract: Specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* partnership; *J. Bacteriol.* 182 (2000) 1779–1787
- [56] N. A. Whitehead, A. M. L. Barnard, H. Slater, N. J. L. Simpson, G. P. C. Salmond; Quorum-sensing in Gram-negative bacteria; *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (2001) 365–404
- [57] M. Kleerebezem, L. E. N. Quadri, O. P. Kuipers, W. M. de Vos; Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria; *Mol. Microbiol.* 24 (1997) 895–904
- [58] B. A. Lazazzera, A. D. Grossman; The ins and outs of peptide signaling; *Trends Microbiol.* 7 (1998) 288–294
- [59] J. A. Shapiro; Thinking about bacterial populations as multicellular organisms; *Annu. Rev. Microbiol.* 52 (1998) 81–104
- [60] J. Engebrecht, K. Nealson, M. Silverman; Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*; *Cell* 32 (1983) 773–781
- [61] J. Engebrecht, M. Silverman; Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 (1984) 4154–4158
- [62] C. Fuqua, S. C. Winans, E. P. Greenberg; Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators; *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996) 727–751
- [63] B. L. Bassler; How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing; *Curr. Opin. Microbiol.* 2 (1999) 582–587
- [64] T. R. de Kievit, B. H. Iglewski; Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships; *Infect. Immunol.* 68 (2000) 4839–4849
- [65] M. B. Miller, B. L. Bassler; Quorum Sensing in Bacteria; *Annu. Rev. Microbiol.* 55 (2001) 165–199
- [66] B. L. Hanzelka, E. P. Greenberg; Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis; *J. Bacteriol.* 178 (1996) 5291–5294
- [67] M. I. Moore, L. D. Finger, J. L. Stryker, C. Fuqua, A. Eberhard, S. C. Winans; Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates; *Sci.* 272 (1996) 1655–1658

- [68] D. L. Val, J. E. Cronan; *In vivo* evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases; *J. Bacteriol.* 180 (1998) 2644–2651
- [69] M. R. Parsek, D. L. Val, B. L. Hanzelka, J. E. Cronan, E. P. Greenberg; Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (1999) 4360–4365
- [70] J. W. Costerton, P. S. Stewart; Bekämpfung bakterieller Biofilme; *Spektrum der wissenschaft* 11 (2001) 58–65
- [71] H. C. Flemming; Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen, *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft*, Oldenbourg Verlag, München, Band 129, 1994
- [72] M. E. Callow, J. A. Callow; Marine biofouling – a sticky problem; *Biologist* 48 (2002) 1–8
- [73] S. Dobretsov, H. -U. Dahms, P. -Y. Qian; Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites; *Biofouling* 22 (2006) 43–54
- [74] I. Bussmann, B. Philipp, B. Schink; Factors influencing the cultivability of lake water bacteria; *J. Microbial Met.* 47 (2001) 41–50
- [75] D. Akkermann; Molekularbiologische und naturstoffchemische Untersuchungen ausgewählter Bakterienstämme; Dissertation, Bonn 2004
- [76] D. Akkermann, persönliche Mitteilung
- [77] B. Schulz, J. Sucker, H. J. Aust, K. Krohn, K. Ludewig, P. G. Jones, D. Döring; Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species; *Mycol. Res.* 99 (1995) 1007–1015
- [78] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer; *Biochemistry*; W. H. Freeman and Company, New York (2002)
- [79] G. Kirsch; Marine Makro- und Mikroorganismen als Quellen für HIV-1-RT- und p56lck-PTK-Inhibitoren; Dissertation, Braunschweig 1999
- [80] M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker; *Brock biology of microorganisms*; Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, New Jersey (2000)
- [81] H. G. Schlegel; *Allgemeine Mikrobiologie*; Thieme Verlag Stuttgart (1992)
- [82] R. Pukall, persönliche Mitteilung
- [83] F. Kensky, J. Büchs; Online-Monitoring von Mikrofermentationen; *Laborwelt* 7 (2006) 6–9
- [84] BlueSens gas sensor GmbH, Herten; BC preFerm; Online in Internet: <http://www.bluesens.de/Produkte/BCpreFerm/bcpreferm.html> [02.02.2006]
- [85] Precision Sensing GmbH, Regensburg; Bioprocess control; Online in Internet: <http://www.presens.de/html/start.html> [15.01.2006]

- [86] D. E. Goldberg; Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning; Addison-Wesley, Reading, Massachusetts (1989)
- [87] W. Spendley, G. R. Hext, F. R. Himsworth; Sequential application of simplex designs in optimisation and evolutionary operation; *Technometrics* 4 (1962) 441–461
- [88] J. A. Nelder, R. Mead; A simplex method for function minimization; *Comp. J.* 7 (1965) 308–313
- [89] E. R. Åberg, A. G. T. Gustavsson; Design and evaluation of modified simplex methods; *Anal. Chim. Acta* 144 (1982) 39–53
- [90] D. Betterbridge, A.P. Wade, A. G. Howard; Reflections on the modified simplex – II; *Talanta* 32 (1985) 723–734
- [91] M. Otto; *Chemometrie: Statistik und Computereinsatz in der Chemie*; VCH, Weinheim (1997)
- [92] C. Darwin; *The origin of Species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*; J. Murray, London (1859)
- [93] Programmdokumentation GALOP
- [94] D. Weuster-Botz; Experimental Design for Fermentation Media Development: Statistical Design or Global Random Search?; *J. Biosci. Bioeng.* 90 (2000) 473–483
- [95] S. Freyer; *Rechnergestützte Nährmedienoptimierung*; Dissertation, Köln 1996
- [96] S. Freyer, D. Weuster-Botz, C. Wandrey; Medienoptimierung mit Genetischen Algorithmen; *Bioengineering 5+6* (1992) 16–25
- [97] Technische Universität Ilmenau; Evolutionary Algorithms; Online in Internet: http://www.systemtechnik.tu-ilmenau.de/~pohlheim/GA_Toolbox/algselect.html#nameselectiontournament [20.01.2006]
- [98] J. H. Holland; *Adaptation in natural and artificial systems*; The University of Michigan Press Ann Arbor, Michigan (1975)
- [99] D. E. Golderg; *Genetic algorithms in search, optimisation, and machine learning*; Addison-Wesley Publishing Company Inc.; Reading, Massachusetts (1989)
- [100] J. H. Holland; Genetic Algorithms; *Sci. Am.* 7 (1992) 44–50
- [101] V. Venkatasubramanian, K. Chan, J. M. Caruthers; Computer-aided molecular design using genetic algorithms; *Comp. Chem. Eng.* 18 (1994) 833–844
- [102] A. S. McLeod, M. E. Johnston, L. F. Gladden; Development of a genetic algorithm for molecular scale catalyst design; *J. Catal.* 167 (1997) 279–285
- [103] D. B. Hibbert; *Genetic Algorithms in Chemistry*; *Chemometr. Intell. Lab.* 19 (1993) 277–293

- [104] D. B. Hibbert; A hybrid genetic algorithm for the estimation of kinetic parameters; *Chemometr. Intell. Lab.* 19 (1993) 319–329
- [105] S. J. Wu, P. T. Chow; Genetic algorithms for solving mixed-discrete optimisation problems; *Journal of the Franklin Institute-Engineering and Applied Mathematics* 331B (1994) 381–401
- [106] D. Wolf, R. Moros; Estimating rate constants of heterogeneous catalytic reactions without supposition of rate determining surface steps – An application of a genetic algorithm; *Chem. Eng. Sci.* 52 (1997) 1189–1199
- [107] M. Ranganath, S. Renganathan, C. Gokulnath; Identification of bioprocesses using genetic algorithm; *Bioprocess Eng.* 21 (1999) 123–127
- [108] S. R. M. Pereira, F. Clerc, D. Farrusseng, J. C. van der Waal, T. Maschmeyer, C. Mirodatos; Effect of the Genetic Algorithm Parameters on the Optimisation of Heterogeneous Catalysts; *QSAR Comb. Sci.* 24 (2005) 45–57
- [109] A. Ohrenberg, C. von Törne, A. Schnuppert, B. Knab; Application of Data Mining and Evolutionary Optimization in Catalyst Discovery and High-Throughput Experimentation – Techniques, Strategies, and Software; *QSAR & Comb. Sci.* 24 (2005) 29–37
- [110] D. Weuster-Botz, V. Pramatarova, G. Spassov, C. Wandrey; Use of a genetic algorithm in the development of a synthetic growth medium for *Arthrobacter simplex* with high hydrocortisone Δ^1 -dehydrogenase activity; *J. Chem. Technol. Biot.* 64 (1995) 386–392
- [111] D. Weuster-Botz, C. Wandrey; Medium optimisation by genetic algorithm for continuous production of formate dehydrogenase; *Process Biochem.* 30 (1995) 563–571
- [112] H. Böhling, H. Voss; Optimisation of protein-synthesis in recombinant *E. coli* BL21; *Bioforum International* 2/97 (1997) 86–91
- [113] H. Beste, M. Fackeldey, M. Willems, L. Stockmann, D. Weuster-Botz; Optimisation of fermentation medium composition in substrate controlled continuous stirred tank reactors; *Chem. Eng. Technol.* 20 (1997) 403–413
- [114] Z. Findrik, M. Poljanac, D. Vasić-Rački; Modelling and Optimization of the (R)-(+)-3,4-dihydroxyphenyllactic Acid Production Catalyzed with D-lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus leishmannii* Using Genetic Algorithm; *Chem. Biochem. Eng. Q.* 19 (2005) 351–358
- [115] H. Hofer, T. Mandl, W. Steiner; Diketone cleaving enzyme Dke1 production by *Acinetobacter johnsonii* – optimization of fermentation conditions; *J. Biotechnol.* 107 (2004) 73–81

- [116] C. Hoh, G. Dudziak, A. Liese; Optimization of the Enzymatic Synthesis of *O*-Glycan Core 2 Structure by Use of a Genetic Algorithm; *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 1031–1034
- [117] Y. Dharmadi, R. Gonzales; A better global resolution function and a novel iterative stochastic search method for optimization of high-performance liquid chromatographic separation; *J. Chromatogr. A* 1070 (2005) 89–101
- [118] E. J. Klein, S. L. Rivera, J. E. Porter; Optimization of ion-exchange protein separations using a vector quantizing neural network; *Biotechnol. Progr.* 16 (2000) 506–512
- [119] C. Mongay, A. Pastor, C. Olmos; Determination of carboxylic acids and inorganic anions in wines by ion-exchange chromatography; *J. Chromatogr. A* 736 (1996) 351–357
- [120] J. Pramanik, J. D. Keasling; Stoichiometric model of *Escherichia coli* metabolism: Incorporation of growth-rate dependent biomass composition and mechanistic energy requirements; *Biotechnol. Bioeng.* 56 (1997) 398–421
- [121] H. Guterman, S. Ben-Yaakov; On-Line Optimisation of Biotechnological Processes: I. Application to Open Algal Pond; *Biotechnol. Bioeng.* 35 (1990) 417–426
- [122] L. Nyeste, L. Szigeti, A. Veres, E. Pungor, I. Kurucz, J. Holló; Automated Fermentation Equipment. II. Computer-Fermentor System; *Biotechnol. Bioeng.* 23 (1981) 405–417
- [123] H. Vahidi, B. Shafagi, Z. Mirzabeigi; Culture Medium Optimization of α -Amylase Producing Organism *Mocur spp.* Using the Variable Size-Simplex Algorithm; *DARU* 13 (2005) 20–22
- [124] A. E. M. Hofmeister, R. Grabowski, D. Linder, W. Buckel; L-Serine and L-threonine dehydratase from *Clostridium propionicum*. Two enzymes with different prosthetic groups; *FEBS* 215 (1993) 341–349
- [125] D. H. Flint, R. M. Allen; Iron-Sulfur Proteins With Nonredox Functions; *Chem. Rev.* 96 (1996) 2315–2334
- [126] E. Chargaff, D. B. Sprinson; Studies on the mechanism of Deamination of serine and threonine in biological systems; *J. Biol. Chem.* 151 (1943) 273–280
- [127] J. Büchs; Introduction to advantages and problems of shaken cultures; *Biochem. Eng. J.* 7 (2001) 91–98
- [128] R. Schmid; Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik; Wiley-VCH, Weinheim (2002)
- [129] AC Biotec GmbH, Jülich; COSBIOS – kontinuierlich betriebener, geschüttelter Bioreaktor; Online in Internet: http://www.acbiotec.de/german/5_cosbios.htm [20.06.2006]

- [130] CD Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Sixth Edition (2002)
- [131] W. Storhas; Bioverfahrensentwicklung; Wiley-VCH, Weinheim (2003)
- [132] J. W. Drake; A constant rate of spontaneous mutation in DNA microbes; Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991) 7160–7164
- [133] D. M. Wloch, K. Szafraniec, R. H. Borts, R. Korona; Direct estimate of the mutation rate and the distribution of fitness effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; Genetics 159 (2001) 441–452
- [134] K. Mutzall; Einführung in die Fermentationstechnik; Behr's Verlag, Hamburg (1993)
- [135] H. Chmiel; Bioprozesstechnik; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (2005)
- [136] A. S. Bommarius, B. R. Riebel; Biocatalysis – Fundamentals and Applications; Wiley-VCH, Weinheim (2004)
- [137] N. Kosaric, A. Wieczorek, Z. Duvnjak; Proceedings of the First Bioenergy Specialists' Meeting on Biotechnology, Waterloo, Ontario (1984) 262–271
- [138] T. Schwarz, P. Bartholmes, M. Kaufmann; Large-scale production of algal biomass for protein purification: tryptophan synthase from *Euglena gracilis*; Biotechnol. Appl. Biochem. 22 (1995) 179–190
- [139] M. J. R. Nout; Ecology of accelerated natural lactic fermentation of sorghum-based infant food formulas; Int. J. Food Microbiol. 12 (1991) 217–224
- [140] J. E. Bailey, D. F. Ollis; Biochemical Engineering Fundamentals; McGraw-Hill, Singapur (1986)
- [141] FU Berlin; Generationszeiten und ihre Bedeutung; Online in Internet: <http://www.vetmed.fu-berlin.de/online/musch/Lite2.htm> [09.09.2002]
- [142] D. Solle; Analyse und Optimierung eines industriellen Biotransformationsprozesses zur Herstellung von Tryptophan; Dissertation, Hannover 2003
- [143] M. A. Petty; An introduction to the origin and biochemistry of microbial halometabolites; Bacteriol. Rev. 25 (1961) 111–130
- [144] G. W. Gribble; The diversity of naturally produced organohalogenes; Chemosphere 52 (2003) 289–297
- [145] G. W. Gribble; Umweltgifte vom Gabentisch der Natur; Spektrum der Wissenschaft Juni (2005) 38–45
- [146] K. Naumann; Chlorchemie der Natur, Chem. Unserer Zeit 27 (1993) 33–41
- [147] C. D. Murphy; New frontiers in biological halogenation; J. Appl. Microbiol. 94 (2003) 539–548
- [148] P. D. Shaw, L. P. Hager; Biological chlorination. IV. Peroxidative nature of enzymatic chlorination; J. Am. Chem. Soc. 81 (1959) 6527–6528

- [149] K.-H. van Pée, E. P. Patallo; Flavin-dependent halogenases involved in secondary metabolism in bacteria; *Appl. Microbiol. Biot.* 70 (2006) 631–641
- [150] M. Sundaramoorthy, J. Turner, T. L. Poulos; Stereochemistry of chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies; *Chem. Biol.* 5 (1998) 461–473
- [151] R. Wever, W. Hemrika; Vanadium enzymes. In: J. O. Nriagu (ed) Vanadium in the environment. Part1: chemistry and biochemistry; Wiley, New York (1998) 285–305
- [152] J. Zhang, C. Roberge, J. Reddy, N. Connors, M. Chartrain, B. Buckland, R. Greasham; Bioconversion of indene to *trans*-2*S*, 1 *S*-bromoindanol and 1*S*, *R*-indene oxide by a bromoperoxidase/dehydrogenase preparation from *Curvularia protuberata* MF5400; *Enzyme Microb. Tech.* 24 (1999) 86–95
- [153] A. M. Wuosmaa, L. P. Hager; Methyl chloride tranferase: a carbocation route for biosynthesis of halometabolites; *Sci.* 249 (1990) 160–162
- [154] D. Saxena, S. Aouad, J. Attieh, H. S. Sani; Biochemical characterisation of chloromethane emission from the wood-rotting fungus *Phellinus pomaceus*; *Appl. Environ. Microb.* 64 (1998) 2831–2835
- [155] A. F. Hollemann, N. Wiberg; Lehrbuch der anorganischen Chemie, 101. Auflage, de Gruyter, Berlin (1995)
- [156] H. Deng, S. L. Cobb, A. R. McEwan, R. P. McGlinchey, J. H. Naismith, D. O'Hagan, D. A. Robinson, J. B. Spencer; The Fluorinase from *Streptomyces catleya* Is also a Chlorinase; *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 759–762
- [157] D. L. Zechel, S. P. Reid, O. Nashiru, C. Mayer, D. Stoll, D. L. Jakemann, R. A. J. Warren, S. G. Withers; Enzymatic synthesis of carbon-fluorine bonds; *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 4350–4351
- [158] T. Dairi, T. Nakano, K. Aisaka, R. Katsuma, M. Hasegawa; Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (1995) 1099–1106
- [159] P. E. Hammer, D. S. Hill, S. T. Lam, K.-H. van Pée, J. M. Ligon; Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin; *Appl. Environ. Microb.* 63 (1997) 2147–2154
- [160] K. Hohaus, A. Altmann, W. Burd, I. Fischer P. E. Hammer, D. S. Hill, J. M. Ligon, K.-H. van Pée; NADH-dependent halogenases are more likely to be involved in halometabolite biosynthesis than haloperoxidases; *Angew. Chem. Int. Ed.* 36 (1997) 2012–2013
- [161] S. Keller, T. Wage, K. Hohaus, M. Hölzer, E. Eichhorn, K.-H. van Pée; Purification and partial characterization of tryptophan 7-halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens*; *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 2300–2302

- [162] K.-H. van Pée, S. Zehner; Enzymology and molecular genetics of biological halogenation. In: G. Gribble (Hrsg.) Natural Production of organohalogen compounds, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (2003) 171–199
- [163] S. Kirner, P. E. Hammer, D. S. Hill, A. Altmann, I. Fischer, L. J. Weislo, M. Lanaham, K.-H. van Pée, J. M. Ligon; Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*; J. Bacteriol. 180 (1998) 1939–1943
- [164] S. Unversucht, F. Hollmann, A. Schmid, K.-H. van Pée; FADH₂-dependence of tryptophan 7-halogenase; Adv. Synth. Catal. 347 (2005) 1163–1167
- [165] V. Massey; Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins; J. Biol. Chem. 268 (1994) 22459–22462
- [166] C. Dong, S. Flecks, S. Unversucht, C. Haupt, K.-H. van Pée, J. H. Naismith; Tryptophan 7-Halogenase (PrnA) Structure Suggests a Mechanism for Regioselective Chlorination; Sci. 306 (2005) 2216–2219
- [167] E. Kling, C. Schmid, S. Unversucht, T. Wage, S. Zehner, K.-H. van Pée; Enzymatic incorporation of halogen atoms into natural compounds; In: W. Wohlleben, T. Spelling, B. Müller-Tiemann (Hrsg.) Biocombinatorial approaches for drug finding; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (2005) 165-194
- [168] E. Yeh, S. Garneau, C. T. Walsh; Robust in vitro activity of RebF and RebH, a two component reductase/halogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebaccamycin biosynthesis; Proc. Natl. Acad. Sci. 102 (2005) 3960–3965
- [169] S. Zehner, B. Bister, R. D. Süßmuth, C. Méndez, J. A. Salas, K.-H. van Pée; A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-42D005; Chem. Biol. 12 (2005) 445–452
- [170] I. Wynands, K.-H. van Pée; A novel halogenase gene from the pentachloropseudilin producer *Actinoplanes* sp. ATCC 33002 and detection of in vitro halogenase activity; FEMS Microbiol. Lett. 237 (2004) 363–367
- [171] CD Römpp Chemie Lexikon, 9. Auflage des Römpp Chemie Lexikons auf CD-ROM, Version 1.0 (1995)
- [172] A. P. Simonenkov, V. D. Fedorov; Common clinical manifestations of serotonin deficiency and intoxication syndrome; B. Exp. Biol. Med. 123 (1997) 525–533
- [173] W. Poldinger, B. Calanchini, W. Schwarz; A Functional-Dimensional Approach to Depression – Serotonin Deficiency as a Target Syndrome in a Comparison of 5-Hydroxytryptophan and Fluvoxamine; Psychopathology 24 (1991) 53–81
- [174] L. E. Fellows, E. A. Bell; 5-Hydroxy-L-Tryptophan, 5-Hydroxytryptamine and L-Tryptophan-5-Hydroxylase in *Griffonia simplicifolia*; Phytochemistry 9 (1970) 2389–2396

- [175] A. J. Morris, M. D. Armstrong; Preparation of 5-Hydroxy-L- and D-Tryptophan; *J. Org. Chem.* 22 (1957) 306–308
- [176] K. Irie, A. Ishida, T. Nakamura, T. Oh-Ishi; Syntheses of Substituted L- and D-Tryptophans; *Chem. Pharm. Bull.* 32 (1984) 2126–2139
- [177] C. Mitoma, H. Weissbach, S. Udenfriend; Formation of 5-Hydroxytryptophan from tryptophan by *Chromobacterium violaceum*; *Nature* 175 (1955) 994–995
- [178] J. Daum, K. Kieslich; Process for the preparation of 5-Hydroxy-L-Tryptophan; U.S. Patent 3,830,696 (1974)
- [179] M. Retzlaff; Prozessoptimierung biokatalytischer Reaktionen; Diplomarbeit, Universität Hannover 2004
- [180] M. Fontecave, R. Eliasson, P. Reichard; NAD(P)H: Flavin Oxidoreductase of *Escherichia coli*; *J. Biol. Chem.* 25 (1987) 12325–12330
- [181] S. Zehner; Molekulargenetische und biochemische Untersuchungen zur Tryptophan-5-Halogenase aus der Biosynthese von Pyrroindomycin B in *Streptomyces rugosporus*, Dissertation, Dresden 2003
- [182] Amersham Biosciences; Affinity Chromatography – Principles and Methods, 18-1022-29 (2002)
- [183] A. Kotsch; Reinigung und teilweise Charakterisierung einer Tryptophan-5-Halogenase aus *Streptomyces rugosporus*; Diplomarbeit, Dresden 2003
- [184] P. M. Doran; Bioprocess Engineering Principles; Academic Press, London (1995)
- [185] Amersham Biosciences; 2-D-Electrophoresis – using immobilized pH-gradients 80-6429-60 (2002)
- [186] S. Heinrich; Biochemische Charakterisierung einer Tryptophan-5-Halogenase aus *Streptomyces rugosporus*; Diplomarbeit, Dresden 2004
- [187] L. Michaelis, M. L. Menten; Die Kinetik der Invertinwirkung; *Biochem. Z.* 49 (1913) 333–369
- [188] K. J. Laidler, P. S. Bunting; The Chemical Kinetics of Enzyme Action; Oxford University Press, London (1973)
- [189] J. H. Rushton, E. W. Costich, H. J. Everett; Power Characteristics of Mixing Impellers; *Chem. Eng. Prog.* 46 (1950) 467–476
- [190] S. Aiba, A. E. Humphrey, N. F. Millis; Biochemical Engineering; Univ. Tokyo Press, Tokyo (1973)
- [191] R. Hörner; Untersuchungen zum Einsatz der Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis* für die Herstellung enantiomerenreiner L-Aminosäuren; Dissertation, Clausthal-Zellerfeld 1997
- [192] M. Laroche, persönliche Mitteilung

- [193] V. Kadiyala, J. C. Spain; A two-component monooxygenase catalyzes both the hydroxylation of p-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus spaericus* JS905, *Appl. Environ. Microb.* 64 (1998) 2479–2484
- [194] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall; Protein measurement with the Folin phenol reagent; *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275
- [195] J. R. Whitaker, P. E. Granum; An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm; *Anal. Biochem.* 109 (1980) 156–159

10 Angaben zur Person

10.1 Betreute Studien- und Diplomarbeiten

- Claudia Wendt: Quorum-Sensing Analysen durch Cokultivierung mariner Bakterienstämme; Studienarbeit, Hannover 2002
- Öznur Kökpınar: Untersuchung des Einflusses von N-Acyl-L-Homoserinlactonen auf das bakterielle Verhalten; Studienarbeit, Hannover 2003
- Marc Bouillon: Versuche zur Isolierung und Charakterisierung der Tryptophan-5-Halogenase aus rekombinanten *Pseudomonas aureofaciens*; Studienarbeit, Hannover 2004
- Marco Retzlaff: Prozessoptimierung biokatalytischer Reaktionen; Diplomarbeit, Hannover 2004

10.2 Tagungsbeiträge

- F. Irtel, K. Muffler, F. Menzel, C. Harbeck, R. Ulber, T. Scheper, *Fully automatic reversible immobilization on membranes for the application in biosensors*, Posterbeitrag, Biotechnology, Berlin 2000
- K. Muffler, A. Oberbremer, R. Ulber, *Mikrobieller Abbau von EDTA*, Posterbeitrag, DECHEMA-Jahrestagung, Wiesbaden 2002
- K. Muffler, R. Ulber, *Investigation of the influence of different marine microorganisms on the growth of Halomonas marina*, Posterbeitrag, Natural products from marine microorganisms, Greifswald 2002
- M. Laroche, K. Muffler, R. Pukall, R. Ulber, *Enzymes from marine microorganisms for biosensor applications*, Posterbeitrag, 3rd European Conference on Marine Natural Products, Elmau 2002
- K. Muffler, G. Liebezeit, R. Pukall, E. Stackebrandt, R. Ulber, *Optimisation of growth and secondary metabolite production of marine bacteria using different algorithms*, Vortrag, Marine biotechnology: Basics and applications, Matalascanas (E) 2003
- K. Muffler, R. Ulber, *Wachstumsoptimierung mariner Bakterien*; Vortrag, DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, München 2003
- K. Muffler, R. Ulber, *Gewinnung von Biokatalysatoren marinen Ursprungs*, Vortrag, Norddeutscher Forschungsverbund Katalyse, Hannover 2003
- K. Muffler, R. Ulber, *Applications of different algorithms for optima search in marine biotechnology*, Posterbeitrag, Marine Biotechnology Conference, Chiba (JP) 2003

- K. Muffler, R. Ulber, *Einsatz von Algorithmen zur Optimierung der L-Serin-dehydratase-Produktion des marinen Bakteriums Paracoccus seriniphilus*, Posterbeitrag, BioPerspectives – DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden 2004
- K. Muffler, R. Ulber, *Optimierung mariner Kultivierungen durch den Einsatz von Algorithmen*, Vortrag, 3. Workshop der Fachgruppe Meeresbiotechnologie, Hannover 2004
- K. Muffler, M. Retzlaff, A. Kotzsch, K.-H. van Pée, R. Ulber, *Optimization of enzyme activity of a recombinantly produced tryptophan-5-halogenase*, Vortrag, Biocat 2004, Hamburg 2004
- K. Muffler, M. Retzlaff, K.-H. van Pée, R. Ulber, *Optimisation of enzymatic assays using genetic algorithms*, Posterbeitrag, BioPerspectives – DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden 2005
- K. Muffler, M. Retzlaff, K.-H. van Pée, R. Ulber, *Optimisation of halogenase enzyme activity*, Posterbeitrag, 12th European Congress on Biotechnology, Kopenhagen (DK) 2005

10.3 Veröffentlichungen

- R. Ulber, M. Arndt, K. Muffler, M. Laroche, *Enzymes from marine microorganisms; in: Marine biotechnology an overview of leading fields*, Ifremer, Nantes (2003) 9-16
- K. Muffler, R. Ulber, *Application of Different Algorithms for Optima Search in Marine Biotechnology*; Journal of Marine Biotechnology 6 (2004) S262-S267
- R. Ulber, K. Muffler, *Downstream Processing in Marine Biotechnology*; in: Y. LeGal, R. Ulber (Eds.); Marine Biotechnology II; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer Verlag 2005; 63-103
- K. Muffler, R. Ulber, *Prozessanalysetechnik in der Biotechnologie*, Bioforum 3 (2006), 23-25
- K. Muffler, M. Retzlaff, K.-H. van Pée, R. Ulber, *Optimisation of halogenase enzyme activity by application of a genetic algorithm*, Journal of Biotechnology 127 (2007) 425-433
- T. Becker, B. Hitzmann, K. Muffler, R. Pörtner, K. F. Reardon, F. Stahl, R. Ulber, *Future Aspects of Bioprocess Monitoring*, in: D. Sell, R. Ulber (Eds.); White Biotechnology; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer Verlag 2007; 249-293
- K. Muffler, R. Ulber, *Fed-batch cultivation of the marine bacteria Sulfitobacter pontiacus using immobilized substrate and purification of sulfite oxidase by application of membrane adsorber technology*, Biotechnology and Bioengineering, (eingereicht)

10.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kai Muffler
Geburtsdatum/-ort: 22.5.1976 in Bremen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1982-1986 GS Sudweyhe, Weyhe
1986-1988 OS Lahausen, Weyhe
1988-1992 KGS-Leeste Realschulzweig, Weyhe
1992-1995 KGS-Leeste Gymnasialzweig, Weyhe
22.05.1995 Allgemeine Hochschulreife KGS-Leeste, Weyhe

Hochschulausbildung

10/1995-09/1997 Grundstudium der Chemie an der Universität Bremen;
Abschluss: Vordiplom
10/1997-02/2001 Hauptstudium der Chemie an der Universität Hannover
Abschluss: Diplom

Berufstätigkeit

04/2001-07-2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Technische Chemie
der Universität Hannover
08/2004-03/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik
der Technischen Universität Kaiserslautern